

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Brugmansia suaveolens*
(Willd.). Bercht. & J. Presl**

CLEUZA APARECIDA DA ROCHA MONTANUCCI

MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PARANÁ – BRASIL
2011

CLEUZA APARECIDA DA ROCHA MONTANUCCI

**CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA, AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Brugmansia suaveolens*
(Willd.). Bercht. & J. Presl**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia de Moraes Echer

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane C.G.Vendruscolo

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PR
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

Montanucci, Cleuza Aparecida da Rocha M765c	Caracterização botânica, avaliação da germinação de sementes e regeneração de plantas de <i>Brugmansia suaveolens</i> (Willd.). Bercht. & J. Presl / Cleuza Aparecida da RochaMontanucci. - Marechal Cândido Rondon, 2011. 79 p.
	Orientador: Prof ^a . Dr ^a . Márcia de Moraes Echer Co-Orientadora: Prof ^a . Dr ^a . Eliane C.G.Vendruscolo
	Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2011.
	1. <i>Brugmansia suaveolens</i> (Willd.). Bercht.& J. Presl.2. Trombeteira. 3. <i>B. suaveolens</i> - Caracterização morfológica. 4. <i>B. suaveolens</i> - Sementes - Avaliação do comportamento germinativo. 5. <i>B. suaveolens</i> - Protocolo de indução à calogênese. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.
	CDD 21.ed. 635.9 CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborado por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46

Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - http://www.unioeste.br

Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000

Marechal Cândido Rondon - PR.



Estado do Paraná

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Geógrafa **Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci**. Aos vinte dias do mês de março de 2011, às 14:00 horas, sob a presidência da Profª. Drª. Márcia de Moraes Echer, em sessão pública reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa da Dissertação da Geógrafa Cleuza Aparecida da Rocha Montanucci, discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agronomia - Nível Mestrado e Doutorado com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Profª. Drª. Luciane Márcia Scherer, Profª. Drª. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi e a Prof. Dr. Márcia de Moraes Echer (Orientadora).

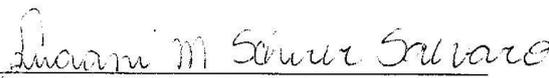
Iniciados os trabalhos, a candidata apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua Dissertação, intitulada: **"Caracterização botânica, avaliação da germinação de sementes e regeneração de plantas de *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht & J. Presl"**.

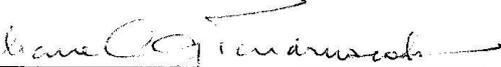
Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

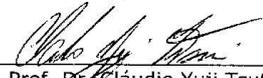
Profª. Drª. Luciane Márcia Scherer.....Aprovada
Profª. Drª. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.....Aprovada
Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi.....Aprovada
Profª. Drª. Márcia de Moraes Echer (Orientadora).....Aprovada

Apurados os resultados, verificou-se que a candidata foi habilitada, fazendo jus, portanto, ao título de **"MESTRE EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 20 de maio de 2011.


Profª. Drª. Luciane Márcia Scherer Salvaro


Profª. Drª. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo


Prof. Dr. Cláudio Yuji Tsutsumi


Profª. Drª. Márcia de Moraes Echer (Orientadora)

A Deus e

Ao meu marido Edson e meu filho Vitor, os maiores incentivadores desta jornada,

Dedico.

AGRADECIMENTO

A UFPR - *Campus* Palotina, em especial a professora Marivone Valentim Zabott pelo apoio, amizade e possibilidade de desenvolvimento do trabalho.

Ao Labiogen por fornecer uma excelente infra-estrutura que nos possibilitou realizar diversos experimentos.

Ao Curador do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Osmar dos Santos Ribas, pelas valiosas informações.

As amigas da Biblioteca do Campus Palotina, Margarida Maria da Silva e Elisângela Lupatini, pelos empréstimos constantes.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Márcia de Moraes Echer, pela paciência e orientação e dedicação.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliane C.G. Vendruscolo, pela dedicação, orientação e pelo aprendizado proporcionado.

Ao Prof. Dr. Isaac Romani, meu 2º co-orientador, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela orientação, amizade e cumplicidade.

Ao prof. Dr. Eurides Kuster Macedo Júnior por representar um exemplo de homem e de profissional, por ter me despertado o prazer de ser uma eterna aprendiz.

Aos pesquisadores: Dra. Carina Kozera, Dra. Suzana Stefanello, Dra. Marise Fonseca dos Santos, Sidnei Francisco Muller, Deise Dalazen Castagnara pelas valiosas conversas e sugestões e principalmente apoio.

Aos meus companheiros de sala: Mara Zadinello, Aline Gonzales, Taiomara Butzke, Vander Silva Alves, Suziana Galli, Juliane Kafka Bilha e Ademir Heldt, pela alegre convivência e incentivo constante.

Em especial aos amigos: Izabel Zadinelo, Raquel M. Sereniski, Aislan Ewerton Henrique Marta da Rocha, Pedro Argel Zadinelo Moreira, Walquiria Neiverth, Daiane Maldonado, Kira Agostini, Daiana Pauletti e Éderson Klein pela ajuda e incentivo nas várias etapas do curso.

Um agradecimento especial a Fernando Furlan e Adeline Neiverth por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo apoio, pelas lágrimas compartilhadas e principalmente por serem amigos em todas as horas. Á vocês muito obrigada!

Aos meus pais, Luigy Nilo da Rocha e Salvina Pereira da Rocha, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e por sempre torcerem por mim.

Eu fortemente agradeço ao meu marido Edson Montanucci, por sua extensa paciência, pelo seu amor, e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

A meu filho Vitor Luigy da Rocha Montanucci, que sempre me recebeu com um abraço caloroso, minha certeza de amor verdadeiro.

E finalmente a Deus por sempre me iluminar e me guiar...

“Procure ser um homem de valor, em vez de ser um homem de sucesso”.

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. *Brugmansia suaveolens* - A –Branca; B- Amarela; C-Rosa..... 17
- FIGURA 2. Fruto e semente da *Brugmansia suaveolens*. A - Fruto; B-Fruto seccionado; C- Sementes 17
- FIGURA 3. Acessos de *Brugmansia suaveolens* em habitat natural. 18
- FIGURA 4. Caracteres morfológicos da folha de *Brugmansia suaveolens*. A-Acesso de flores amarela. B - Acesso de flores Branca. C - Acesso de flores rosa 39
- FIGURA 5. Caracteres morfológicos do caule da *Brugmansia suaveolens*. A-Acesso de flores amarela. B - Acesso de flores Branca. C - Acesso de flores rosa 40
- FIGURA 6. Caracteres morfológicos das flores da *Brugmansia suaveolens*. A-Acesso de flores amarela. B - Acesso de flores Branca. C - Acesso de flores rosa 41
- FIGURA 7. Fruto da *Brugmansia suaveolens* 42
- FIGURA 8. Sementes da *Brugmansia suaveolens*. A – semente intacta apresentando tegumento. B – Semente sem tegumento (retirado mecanicamente) 43
- FIGURA 9. Números de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens* submetidas aos seguintes tratamentos: T1 - Controle. T2 - Sementes a 4 °C por 24 horas. T3 – Sementes submetidas 4 °C por 48 horas. T4- Sementes submetidas 4°C por 72. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5% 44
- FIGURA 10. Números de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens* submetidas aos seguintes tratamentos: T1 - Controle. T2 - Sementes submetidas a 50 °C por 5 minutos. T3 - Sementes submetidas a 50 °C por 10 minutos. T4 - Sementes submetidas a 50 °C por 15 minutos. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5% 45
- FIGURA 11. Números de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens* submetidas aos seguintes tratamentos: T1 - Controle. T2 – Sementes tratadas em ácido Sulfúrico 50% por 5 minutos. T3 – Sementes tratadas em Ácido Sulfúrico 50% por 10 minutos. T4 - Sementes tratadas em Ácido Sulfúrico 50% por 15 minutos. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5% 47
- FIGURA 12. Números de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens* submetidas aos seguintes tratamentos: T1 - Controle. T2 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 24 h. T3 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 48 h. T4 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 72 h. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5% 48

FIGURA 13. A) embrião inteiro com cerca de 3 mm; (B) calo induzido; (C) calo embriogênico; (D) calos apresentando pontuações verdes (E) Plântula após ser transferida para meio de regeneração. (F) Plântula regenerada.....57

FIGURA 14. Embriões Germinados de *B. suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. Valores são apresentados como média± desvio padrão (n=50)..... 60

FIGURA 15. Tamanho médio de *B. suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. Valores são apresentados como média± desvio padrão (n=50) 61

FIGURA 16. Ponto embriogênicos de *B. suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. Valores são apresentados como média± desvio padrão (n=50) 62

FIGURA 17. Plantas regeneradas de *B. suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. Valores são apresentados como média± desvio padrão (n=50) 63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Locais de coletas de Acessos de <i>Brugmansia suaveolens</i> no município de Palotina	35
TABELA 2. Tratamentos aplicados a sementes de <i>Brugmansia suaveolens</i>	37
TABELA 3. Características biométricas dos frutos de <i>Brugmansia suaveolens</i>	42
TABELA 4. Características e massa média de 40 sementes(g) de <i>Brugmansia suaveolens</i>	43
TABELA 5. Diferentes concentrações de 2,4D e KIN para a avaliação no estabelecimento de protocolo de regeneração <i>in vitro</i> de embriões maduros de <i>B. suaveolens</i>	55
TABELA 6. Dados relativos ao índice regenerativo nos diferentes tratamentos.	59

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	viii
1.INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BILIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Brugmansia suaveolens</i> (Willd.) Bercht. & j. Presl	16
2.2 Cultura de Tecidos	19
2.3 Germinação.....	22
2.3.1 Dormência e Quiescência	24
2.4 Reguladores de Crescimento Vegetais	27
2.5 Biofábricas.....	29
3 CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Brugmansia Suaveolens</i> SOB DIFERENTES TRATAMENTOS	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
3.1 INTRODUÇÃO	33
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.2.1 Caracterização Morfológica de Acessos de <i>Brugmansia suaveolens</i>	35
3.2.2 Avaliação da germinação <i>in vitro</i>	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.3.1 Caracterização Morfológica de Acessos de <i>Brugmansia suaveolens</i>	39
3.3.2 Avaliação da Germinação <i>in vitro</i>	43
3.4 CONCLUSÕES	49
4 CAPÍTULO II - ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO À CALOGÊNESE E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Brugmansia Suaveolens</i> A PARTIR DE EMBRIÕES MADUROS	50
RESUMO.....	50
ABSTRACT	51
4.1 INTRODUÇÃO	52
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	54

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.4 CONCLUSÕES	65
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

O conhecimento das características morfológicas e ecofisiológicas de plantas de *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl é o primeiro passo para o uso desta espécie com finalidade biotecnológica. Este trabalho teve como objetivos: 1) a caracterização morfológica de acessos da *B. suaveolens*; 2) avaliação do comportamento germinativo das sementes *in vitro* sob diferentes condições de tratamento e 3) o estabelecimento de protocolo de regeneração eficiente de *B. suaveolens*. Foram avaliados os índices de regeneração, além das porcentagens de indução e tamanho de calos, da germinação de embriões, o número de pontuações verdes e o número de plântulas regeneradas. Como resultados obtidos, 22 indivíduos de *B. suaveolens* foram coletados e agrupados em três grupos, diferindo apenas nas cores das flores. Os frutos apresentaram valores médios de: 975 mm de comprimento, 189 mm de largura e 6,99 g de massa, as sementes de 7 mm de comprimento, 6 mm de largura, 3,04mm e espessura e massa de 0,39 g. O período estimado para o início do processo germinativo sem a presença do tegumento foi de 14 dias. Em todos os tratamentos observou-se uma germinação acumulada aumentada. Em relação ao efeito dos tratamentos pode-se observar que temperaturas de 4 °C e 50 °C não propiciaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. A exposição ao ácido sulfúrico e a embebição das sementes em água por períodos maiores que 24 horas, reduziram a germinação. A presença do ácido giberélico promoveu a inibição do desenvolvimento dos embriões *in vitro*. No desenvolvimento do protocolo de regeneração para o estabelecimento de plantas a partir de embriões maduros para esta espécie, a porcentagem de indução de calos variou de 26 a 100%, a razão plântula/calco induzido variou de 0 a 0,84 e a eficiência de regeneração variou de 0 a 32%. As dosagens de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ KIN foram as mais eficientes nas respostas para indução de calos, no tamanho de calos, no número de pontos embriogênicos e plântulas regeneradas. Altas concentrações de reguladores de crescimento (1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ KIN) inibiram a calogênese e regeneração; a ausência destes reguladores promoveram a formação de calos mas não a regeneração de plantas de *B. suaveolens*.

Palavras chave: calogênese, indução, embriogênico, morfologia, protocolo.

ABSTRACT

The knowledge of morphological and ecophysiological features of *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl is the first step towards the use of this species with biotechnological purpose. This study aimed to: 1) the morphological characteristics of specimens of *B. suaveolens*, 2) evaluation of *in vitro* germination rates under different conditions of seed's treatment. 3) the establishment of an efficient regeneration protocol in *B. suaveolens*. We evaluated the rates of regeneration, the percentages of calli induction and calli size, germination of embryos, the number of embryogenic spots and the number of regenerated plantlets. As results, 22 individuals were collected and grouped into three different groups, differing only by flowers colors. The fruits showed mean values of: 975 mm long, 189 mm wide and 6.99 g of weight. Seeds presented mean values of 7 mm long, 6.00 mm width, 3.04 mm thickness and mass of 0.39 g. The estimated period for initiation of the germination process without the presence of the tegument was 14 days. In all treatments there was an increased cumulative germination. Regarding the effect of pre-treatments can be observed that temperatures of 4 °C and 50 °C did not promote differences between treatments. Exposure to sulfuric acid and soaking the seeds in water for longer periods of reduced germination. The presence of gibberellic acid caused inhibition of embryo development *in vitro*. In the development of regeneration protocols, the establishment of plants from mature embryos of this species, the percentage of calli induction ranged from 26 to 100%, the ratio seedling / callus induced ranged from 0 to 0.84 and the efficiency of regeneration ranged from 0 to 32%. The dosages of 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ KIN were more efficient regarding to calli induction, calli size, number of green spots points and regenerated plantlets. High concentrations of growth regulators (1 mg L⁻¹ 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ KIN) were inhibitory to calli formation and regeneration, the absence of these regulators promoted the formation of calli but any plantlets of *B. suaveolens* were gotten.

Keywords: callus, induction, embryogenic, morphology, protocol.

1 INTRODUÇÃO

A *Brugmansia suaveolens* (Willd). Bercht. & J. Presl é uma planta ornamental e medicinal, considerada tóxica, da Família das *Solanaceae*, conhecida popularmente como, trombeteira, babado, trombeta de anjo, copo de leite, zabumba branca, saia-branca, sete-saias, *datura*, trombeta-rosa, trombeta-cheirosa, entre outras (CORREA, 1984; OLIVEIRA et al., 1991).

É um arbusto semi-lenhoso, grande e ereto, que atinge de 2-3 m de altura com facilidade, e apresenta folhas grandes, alongadas e finas. Flores grandes, pendentes, brancas, róseas ou amarelas, em forma de funil com 5 dentes no cálice dilatado (CORREA, 1984).

As plantas medicinais e aromáticas são importantes fontes de metabólitos secundários, que são importantes para a saúde humana. O aumento na produtividade e qualidade destes produtos vegetais naturais através do melhoramento clássico é ainda um grande desafio. Todavia, recentes avanços na área de genética e biotecnologia têm gerado um conhecimento avançado na compreensão da biossíntese destes metabólitos.

Espécies do gênero *Brugmansia* apresentam os alcalóides atropina e escopolamina. Ambos são ésteres orgânicos formados pela combinação de um ácido aromático, o ácido trópico, e das bases complexas tropina e escopina (GILMAN et al., 1980) possuindo atividades estimulantes, alucinógenas, antiespasmódicas, calmantes, diaforéticas e diuréticas (WALLER e NOVACKI, 1978; PITTA-ALVAREZ et al., 2000).

Muitas espécies de solanáceas são empregadas na indústria farmacêutica para a extração dos seus alcalóides, principalmente a escopolamina, que entra na fabricação de fármacos como: Buscopan, Buscoveran, Hioscina, Sedobion, entre outros (MUHTADI et al., 1990).

Os primeiros passos para a produção destes alcalóides por meio de biotécnicas é o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração da espécie. Uma série de fatores pode influenciar o potencial regenerativo de uma espécie, como o genótipo utilizado, concentrações de reguladores de crescimento, tipo de explante, meios de cultura e as condições de cultivo (PERES, 2002; PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010). Diversas fontes de explantes já foram usadas

na embriogênese somática: anteras, folhas, caules, hipocótilos, raízes, inflorescências, gemas entre outros (GUERRA et al., 1999; NITHIYA e AROCKIASAMY, 2007; AMIRI et al., 2011). Porém, na literatura, são escassos os trabalhos que tenham avaliado o uso de embriões maduros como fonte de explante em *B. suaveolens*. O uso de embriões maduros (sementes) tem como vantagem o fato de estar disponível ao longo do ano, podendo ser armazenado sem necessidade de plantio de plantas estoque (RAHMAN et al., 2008).

Diante do exposto, as ações precursoras do uso desta espécie em biofábricas, para a produção comercial destes metabólitos secundários seriam a realização da caracterização morfológica de plantas, frutos e sementes de *B. suaveolens*, uma vez que este estudo caracteriza-se por ser o primeiro a ser realizado com esta espécie na região do município de Palotina - Pr. Num segundo momento, e em continuidade ao primeiro, a avaliação do comportamento germinativo de suas sementes onde os efeitos de agentes físicos e químicos foram avaliados na germinação de embriões maduros, com vistas ao terceiro objetivo que é o estabelecimento de protocolo de regeneração eficiente de *B. suaveolens* usando embrião como explante na cultura de tecidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Brugmansia Suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl

A *Brugmansia suaveolens* foi descrita e publicada, originalmente, com o nome de *Datura suaveolens* por Humboldt, Bonpland e Willdenow, no periódico *Enumeratio Plantarum Horti Botanici Berolinensis* no ano de 1809. Em 1823, 14 anos depois, Bercht. & C. Presl chegaram à conclusão de que os caracteres desta espécie se enquadravam melhor ao gênero *Brugmansia* ao invés do gênero *Datura*, fazendo então a respectiva modificação, que persiste até hoje - *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & C. Presl. A publicação onde consta essa atualização se encontra no periódico da Cidade de Praga, República Checa, de 1823: *O Pirozenosti rostlin 1: Solanac.* 45. 1823 (MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA, 2011).

O nome do gênero *Brugmansia*, segundo Lopes, (2008), foi atribuído em homenagem a Sebastian J. Brugmans, professor de História Natural em Leyden. *Suaveolens* vem do latim “suavis” (doce, agradável) e “olens” (cheiro, aromático).

A espécie *B. suaveolens* é originária das Américas, provavelmente do México (GONÇALVES e LORENZI, 2007), e é conhecida como trombeteira, babado, trombeta de anjo, copo de leite, zabumba branca, saia-branca, sete-saias, *datura*, trombeta-rosa, trombeta-cheirosa (CORREA, 1984; OLIVEIRA et al., 1991). Também foi descrita na bibliografia europeia com os nomes populares trombetão, cornucópia, chamico e rainha da noite (COSTA, 1994).

Segundo o Museu Botânico Municipal de Curitiba (2011), antigamente, até meados de 1809, existia apenas o gênero *Datura*, apresentando flores eretas e frutos com espinhos. Em 1823 o gênero *Datura*, foi reclassificado e dividido em dois gêneros onde *B. suaveolens* teria como características morfológicas o fato de terem flores grandes, pêndulas ou inclinadas e seus frutos não possuírem espinhos.

É uma planta que possui hábito arbustivo de até 2-3 m de altura, caule lenhoso e ramificado, folhas alternas, pecioladas, limbo ovalado a elíptico, margem inteira ou sinuosa, com a base obtusa e geralmente assimétrica e o, ápice agudo ou acuminado com até 0,3 m de comprimento por 0,14 m de largura, pilosas em ambas as faces quando novas e geralmente sem pêlos na face superior quando mais velhas (LOPES, 2008).

A *Brugmansia suaveolens* é um arbusto de vasta dispersão, sendo encontrado pela zona da mata pluvial da encosta atlântica, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, podendo, ser distinguida pelas corolas simples ou múltiplas e pela coloração das mesmas (LOPES, 2008).

É cultivada para fins ornamentais, mas pode se tornar indesejável devido a sua toxicidade, quando cresce em áreas de pastagens e terrenos baldios, aos animais em geral (LORENZI, 2002). Geralmente se multiplica vegetativamente.

As flores são aromáticas, campanuladas e pendentes, com até 0,3 m de comprimento (Figura 1). O cálice é tubuloso, inflado e caduco, com até 0,12 m de comprimento, possui cinco pequenos lobos na parte terminal, glabro e verde. A corola possui lobos longamente caudados, de coloração geralmente branca, amarelas ou róseas (LOPES, 2008).



Figura 1. *Brugmansia suaveolens*, A - Branca B - Amarela C – Rosa

Fonte: Cleuza Montanucci /Fernando Furlan- Palotina–2009.

Segundo Reitz (1966), os estames encontram-se inseridos na base da corola, inclusos, sendo as anteras conglutinadas. Os frutos são delgados fusiformes, medindo de 100 a 150 mm de comprimento, e cerca de 20 mm de diâmetro, lisos, biloculares e indeiscentes (Figura 2). As sementes são angulosas e rugosas.



Figura 2. Fruto e semente da *Brugmansia suaveolens*. A- Fruto; B-Fruto seccionado; C- Sementes

Fonte: Cleuza Montanucci /Fernando Furlan- Palotina–2010.

A propagação por sementes, conforme Reitz (1966) em geral não é preferencial por ter grande variabilidade genética e desenvolvimento lento, enquanto que por estacas, o desenvolvimento é mais homogêneo, garantindo maior uniformidade até mesmo quanto à composição química da planta.

A *B. suaveolens* pode ser encontrada em terrenos baldios, orla de matas e nas proximidades das habitações. Desenvolve-se melhor em regiões de clima temperado até subtropical úmido, crescendo freqüentemente em lugares úmidos, como beira de rios e em várzeas úmidas. Geadas podem ser prejudiciais, mas a planta rebrota após o período mais crítico (LOPES, 2008).

Segundo Reitz (1966) o trombeteiro tem preferência por lugares onde o solo é rico em nitrogênio, por isso, o mesmo é encontrado na natureza principalmente em locais destruídos, por exemplo, após destruição do “tapete de plantas” por deslizamento de terra ou vendavais. Na maioria das vezes, são culturas secundárias em lugares onde há influência humana, ou em regiões de impacto pela atividade humana, por exemplo, locais planos, ao redor de plantações, beira de estradas ou em locais de despejo.



Figura 3. *Brugmansia suaveolens* em habitat natural. A- Área alagada. B - Área ornamental.

Fonte: Cleuza Montanucci /Izabel Zadinelo- Palotina–2009

Segundo Lopes (2008), na região que envolve os municípios de Pelotas, Rio Grande, São Lourenço do Sul, Jaguarão, Canguçu e Tapes, no RS, observa-se que *B. suaveolens* está associada com vegetação onde domina a mamona (*Ricinus communis* L. - Euphorbiaceae), espécie exótica, e ipoméias (*Ipomea purpurea* Lam. - Convolvulaceae).

A *B. suaveolens* deve ser cultivada, em solo fértil, arenoso e enriquecido com matéria orgânica, regado a intervalos regulares. As adubações devem preceder a floração e as podas devem ser realizadas após a floração. *B. suaveolens* aprecia o calor e a umidade, e é comum observá-lo naturalmente na beira de riachos. Pode-se plantá-la sob meia-sombra, mas as flores podem se tornar esparsas nesta situação de luminosidade. Não tolera o frio intenso, mas podem ser cultivadas em estufas. Multiplica-se por sementes e estaquia (OLIVEIRA, 2009).

2. 2 Cultura de Tecidos

“A cultura de tecidos é um processo, por meio do qual, fragmentos vegetais e suas partes denominadas explantes são isoladas dos organismos ou obtidas a partir destes, sendo assepticamente cultivados em meio de cultura apropriado sob condições adequadas” (AMARAL e SILVA, 2003).

A cultura de tecidos é também denominada propagação de plantas *in vitro*. Esta biotécnica pode ser usada com diversas finalidades: na conservação e avaliação do germoplasma; multiplicação de genótipos para análise em experimentos replicados; na obtenção de variantes somaclonais; no intercâmbio de germoplasma em condições assépticas; na obtenção de transformantes via engenharia genética; na introgressão de genes de interesse para espécies-alvo; na quebra de barreiras de incompatibilidade genética; na aceleração de programas de melhoramento; na clonagem de genótipos para teste de capacidade de combinação; na obtenção de duplo-haplóides, na obtenção de plantas bioarreatoras e na recuperação de plantas livres de vírus (FERREIRA et al., 1995).

A cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotencialidade, onde cada célula vegetal possui o potencial genético para reproduzir um organismo inteiro (GUERRA, 2006). Tal característica permite aos tecidos, células e órgãos vegetais serem mantidos indefinidamente em cultura. Vasil et al.,(1979) relatam que algumas células eram capazes de serem separadas do organismo e continuaram a crescer independentemente, o que permite também a cultura de células *in vitro*.

A embriogênese somática pode ser definida pelo processo pela qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas e nem conexões vasculares com os tecidos maternos (GUERRA et al.,1999;

SANTANA et al., 2010). A embriogênese somática pode ser usada para regenerar cópias da planta mãe e na recuperação de plantas geneticamente transformadas entre outras e se caracteriza por ser uma das técnicas aplicadas na cultura de tecidos (GUERRA e NODARI,2006).

A embriogênese somática pode ser dividida em: Direta - na qual os embriões se originam diretamente dos tecidos, sem a proliferação de calos; Indireta- na qual ocorre a formação de calos (calogênese), que é mantido e proliferado antes do desenvolvimento dos embriões. Em ambos os casos, os embriões passam pelo estado globular, cordiforme e torpedo seguido pela formação da planta (COLLIN e GROSSER, 1984).

A iniciação e o desenvolvimento de embriões somáticos em sistemas *in vitro* foi obtida quase simultaneamente por Steward et al.,(1958) e por Reinert (1959), em *Daucus carota*. No final dos anos 70, a ocorrência deste padrão morfo genético já era relatada para 32 famílias, 81 gêneros e 132 espécies vegetais (GUERRA et al.,1999).

Diversas fontes de explantes já foram usadas na embriogênese somática: anteras, folhas, caules, hipocótilos, raízes, inflorescências, gemas e embriões entre outros (GUERRA et al., 1999; NITHIYA e AROCKIASAMY, 2007; AMIRI et al.,2011).

Alguns autores relatam que a embriogênese somática seria favorecida pela presença de uma auxina forte no meio de cultura. Segundo Vasil (1982), a competência embriogenética é aparentemente adquirida durante o período inicial em cultura na presença de altos níveis de auxina, onde potencialmente o 2,4-D seria o agente. Contudo, a expressão da embriogênese somática somente ocorreria na presença de baixos níveis deste regulador, pois a auxina inibiria o desenvolvimento subsequente dos embriões (GUERRA et al.,1999). Outros autores relatam que várias combinações destes hormônios, em diferentes espécies ou mesmo dentro de cultivares de uma espécie promoveriam o desenvolvimento de embriões somáticos em plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; DAMIÃO FILHO, 1995).

Diversos trabalhos na literatura já foram realizados com embriogênese somática em *Datura*: *Datura stramonium* L. (REDDY e DHAMAYANTHI, 2001; PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010; SUNDAR e JAWAHAR, 2010; AMIRI et al., 2011); *Datura insignis* (DOS SANTOS et al.,1990; FIGUEREDO e ESQUIBEL.,1989; NITHIYA e AROCKIASAMY, 2007); *Datura metel* (DE et al., 2003; MUTHUKUMAR et al., 2000); *Datura innoxia* (ZAYEDA et al., 2006). Em *Brugmansia spexistem*

relatos de trabalhos com a transformação genética de raízes (*Agrobacterium rhizogenes*) visando a produção de alcalóides (NINO et al., 2003; ZAYED e WINK, 2004), porém trabalhos na literatura sobre protocolos de embriogênese somática nesta espécie não foram encontrados.

Vários fatores podem afetar a performance de diferentes espécies em cultivo *in vitro*: composição de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos ou outras fontes suplementares, açúcares, compostos orgânicos, agentes geleificantes e reguladores de crescimento (PERES, 2002; PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010). Várias formulações de meios de cultura são comumente utilizadas, mas costumeiramente utiliza-se sacarose como fonte de glicose e uma auxina e/ou citocinina para a indução à multiplicação celular (MURASHIGE e SKOOG, 1962; SHOO, 1972; WHITE, 1963).

Além destes, outros fatores também são determinantes na performance de plantas em cultura de tecido: a desinfestação das sementes para evitar a contaminação pela presença de micro-organismos externos e internos à superfície das sementes e às condições de incubação onde luz, temperatura e transplante são os mais importantes (FERREIRA e HU, 1998; AMIRI et al., 2011).

Diversos tipos de desinfetantes podem ser usados na cultura de tecidos. O mais usualmente citado é a desinfecção por imersão em hipoclorito de sódio a 20% e em seguida o álcool a 70%, variando-se o tempo de imersão do explante dependendo da espécie (PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010, AMIRI et al., 2011).

Embora a temperatura tenha um maior efeito no crescimento e desenvolvimento em ambos os tipos de crescimentos: *in vivo* e *in vitro*, este fator não tem sido examinado minuciosamente, pois a maioria dos trabalhos descreve protocolos de regeneração com temperaturas constantes de 20 a 30°C (TAMÁS et al., 2004). A luz, outro fator determinante no desenvolvimento vegetal, aparece descrita de modo generalizado em relação às necessidades ótimas de cada espécie para crescimento e diferenciação (TAMÁS et al., 2004). Porém, diferentes espécies podem apresentar temperaturas e condições de luminosidade ótimas peculiares, principalmente na fase de indução, crescimento e regeneração de plantas (CHALUPA, 1987).

Uma maneira arbitrária de determinar a necessidade de luz para a espécie é a observar a natureza da cobertura *in situ* que envolvem o embrião e adotar a incubação no escuro se a espessura dos tecidos envolventes for suficiente para

barrar a maior parte da penetração da luz incidente e usar a incubação na luz, caso os tecidos envolventes sejam translúcidos (FERREIRA e HU, 1998). Usualmente, nas câmaras de cultivo a intensidade luminosa é de 3 a 5 W m⁻²(ORTOLAN et al.,2007).

A maioria dos pesquisadores arbitrariamente escolhe a temperatura de incubação de 25°C, não importando o tipo de planta. Esta temperatura parece possibilitar a embriogênese e a germinação, embora não seja necessariamente ótima para o desenvolvimento da espécie (FERREIRA e HU,1998).

A total compreensão dos fatores que afetam o processo de embriogênese somática nesta espécie e a elaboração de protocolo eficiente de regeneração de plantas é imprescindível para a aplicação de biotécnicas com o objetivo de produzir metabólitos secundários para uso comercial.

2.3 Germinação

Entende-se por germinação a capacidade da semente de produzir uma plântula que, pelas características de suas estruturas essenciais demonstre sua aptidão para produzir planta normal sob condições favoráveis de campo. A germinação é avaliada pelo teste de germinação no qual são oferecidas às sementes, as mais favoráveis condições ambientais de modo a obter a máxima germinação possível (POPINIGIS, 1985).

A germinação é uma seqüência de eventos fisiológicos influenciada por fatores externos (ambientais) e internos (dormência, inibidores e promotores da germinação) às sementes: cada fator pode atuar por si ou em interação com os demais. Em síntese, tendo-se uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência,quando são satisfeitas uma série de condições externas (do ambiente) e internas (intrínsecas do indivíduo), ocorrerá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à germinação. Por isso, do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (NASSIF et al., 2011).

Entre os fatores extrínsecos, a luz, disponibilidade de água, o oxigênio e a temperatura são de grande importância para a germinação de sementes, sendo esta também afetada pelos fatores intrínsecos, como: impermeabilidade do tegumento,

imaturidade fisiológica e presença de substâncias inibidoras (BEWLEY e BLACK, 1982; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

A primeira condição para a germinação de uma semente viável e não dormente é a disponibilidade de água para sua reidratação. O aumento das atividades respiratórias da semente a um nível capaz de sustentar o crescimento do embrião, com fornecimento suficiente de energia e de substâncias orgânicas, depende do aumento do grau de hidratação dos seus tecidos. A embebição é um tipo de difusão que ocorre quando as sementes absorvem água. Difusão é o movimento, ao acaso, de partículas de determinada substância, distribuindo-se uniformemente num espaço disponível. As características do processo de embebição são o aumento do volume da semente e liberação de calor, pelo processo exotérmico (POPINIGIS, 1985).

A velocidade de absorção de água varia com a espécie, com o número de poros distribuídos sobre a superfície do tegumento, disponibilidade de água, temperatura, pressão hidrostática, área de contato semente/água, forças intermoleculares, composição química e qualidade fisiológica da semente (POPINIGIS, 1985). O movimento da água para o interior da semente é devido tanto ao processo de capilaridade quanto de difusão e ocorre do sentido do maior para o menor potencial hídrico. Assim sendo, a embebição é essencialmente um processo físico relacionado às características de permeabilidade do tegumento e das propriedades dos colóides que constituem as sementes, cuja hidratação é uma de suas primeiras conseqüências (NASSIF et al., 2011).

Outro fator de importância é a luz e a sensibilidade das sementes à luz varia com a espécie (BENVENUTI e MACHIA, 1997). Para Bewley e Black (1994), dependendo da espécie, as sementes podem germinar somente após longas exposições à luz ou apenas com breve exposição no escuro ou com períodos de luz e escuro, sendo muitas sementes indiferentes à luz. A percepção, interpretação e transdução dos sinais luminosos são captados por fotorreceptores, sendo o fitocromo o principal deles (KENDRICK e KRONENBERG, 1994). A resposta das sementes à luz é variável, podendo ser fotoblásticas positivas, negativas ou neutras (MANCINELLI, 1994; SILVA et al., 1997).

O fitocromo é o pigmento envolvido nas respostas fotoblásticas, ocorrendo basicamente sob duas formas interconvertíveis: a forma Fv, que é considerada fisiologicamente inativa, com pico de absorção na região do vermelho (660 nm), e a

forma Fve, cujo pico de absorção se encontra na faixa do vermelho extremo (ao redor de 730 nm), sendo considerada a forma ativa do fitocromo (BORTHWICK et al., 1972).

Com relação à temperatura, esta pode afetar as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo. As sementes apresentam capacidade germinativa em limites bem definidos de temperatura, variável de espécie para espécie, que caracterizam sua distribuição geográfica. Assim, a germinação de uma semente depende da temperatura. No estudo dessa dependência, é de grande interesse ecofisiológico a determinação das temperaturas mínima, ótima e máxima. A temperatura ótima pode ser aquela em que a maior germinação é alcançada no menor tempo. As temperaturas extremas (abaixo e acima da temperatura ótima) são aquelas onde as sementes não conseguem germinar mais.

Para a maioria das espécies tropicais a temperatura ótima de germinação encontra-se entre 15 e 30°C. A máxima varia entre 35 e 40°C, podendo a mínima chegar ao ponto de congelamento. De maneira geral, temperaturas abaixo da ótima reduzem a velocidade de germinação, resultando em alteração da uniformidade de emergência, talvez em razão do aumento do tempo de exposição ao ataque de patógenos. Por outro lado, temperaturas acima da ótima aumentam a velocidade de germinação, embora somente as sementes mais vigorosas consigam germinar (NASSIF et al., 2011).

2.3.1 Dormência e Quiescência

As sementes da maioria das espécies germinam prontamente quando lhe são dadas condições ambientais favoráveis. Nestas, o processo de germinação não ocorre tão somente por que um fator ambiental encontra-se desfavorável, ou seja, geralmente por que a semente é mantida seca (insuficiente disponibilidade de água). Nestas condições são denominadas no estado quiescente. Tão logo este fator torna-se favorável (por exemplo, a reidratação da semente) a semente quiescente abandona este estado e germina. Quando as sementes não germinam, embora colocadas sob condições ambientais favoráveis à sua germinação elas são denominadas dormentes (POPINIGIS, 1985; BASKIN e BASKIN, 2004).

As sementes dormentes apresentam alguma restrição interna ou sistêmica à germinação, restrição essa que deve ser superada por intermédio de um processo

conhecido como pós-maturação ou quebra de dormência, para que a semente fique apta a germinar. Assim, enquanto a dormência seria causada por um bloqueio situado na própria semente ou unidade de dispersão, a quiescência seria provocada pela ausência ou insuficiência de um ou mais fatores externos (particularmente, condições atmosféricas, temperatura e água), necessários à germinação (CARDOSO, 2004).

Em linhas gerais, existem bloqueios de natureza fotoquímica ou bioquímica (a chamada "dormência fisiológica"), de natureza difusiva ("dormência física", relacionada à resistência do tegumento e/ou envoltórios da semente à difusão de substâncias) e de natureza morfológica ("dormência morfológica", quando a semente é dispersa com o embrião ainda subdesenvolvido). A maior parte das discussões sobre dormência refere-se à dormência fisiológica, ao passo que as dormências física e morfológica - ainda que respondam por uma parcela expressiva dos casos conhecidos de dormência, especialmente em espécies tropicais - são muitas vezes tratadas de maneira ambígua, ou nem são reconhecidas como tipos de dormência (CARDOSO, 2004).

Labouriau (1983) dividiu os tipos de dormência em dois tipos: a dormência induzida ou primária que se estabeleceria na semente antes de sua dispersão; e a secundária, que se instalaria na semente após a dispersão. No primeiro caso, portanto, a semente é dispersa da planta-mãe já em estado dormente, exigindo tratamentos ou condições específicas para se tornar uma semente quiescente, isto é, capaz de germinar em condições ambientais favoráveis. No segundo caso, duas situações podem ocorrer: a semente com dormência primária perde a dormência após a dispersão, mas, sob uma condição desfavorável à germinação, adquire novamente dormência; ou a semente é dispersa sem qualquer tipo de dormência, passando a dormente sob uma condição desfavorável ou estressante. Em circunstâncias naturais, parece que a primeira alternativa para a instalação da dormência secundária é a mais freqüente, contribuindo para o aparecimento de um fenômeno conhecido como "dormência cíclica". Esse fenômeno, descrito principalmente em espécies invasoras de clima temperado, refere-se à alternância gradual entre os estados de não-dormência e dormência em sementes enterradas, ao longo do ano.

Além das dormências primária e secundária, Vegis (1964) definiu uma terceira modalidade: a dormência imposta, quando a semente não germina por uma

condição adversa do ambiente. Baskin e Baskin (2004) utilizam a expressão "quiescência imposta", ao invés de "dormência imposta", já que a ausência de germinação estaria relacionada à insuficiência de fatores como disponibilidade de água, temperatura e/ou aeração, o que seria mais apropriadamente descrito como quiescência, e não como dormência.

Vegis (1964) relacionou dormência - especificamente, dormência fisiológica - com a capacidade de uma semente germinar em resposta à temperatura. Essa resposta é normalmente limitada pelas chamadas "temperaturas cardiais", a saber, as temperaturas mínima (T_{min}), temperatura ótima (T_o) e temperatura máxima (T_{max}) para que uma semente germine. Assim, a germinação ocorrerá desde que a temperatura ambiente esteja situada em um intervalo que vai de T_{min} a T_{max} . Então, quanto mais dormente a semente, mais estreita deve ser a amplitude térmica na qual ela germina, ou seja, menor a diferença entre T_{min} e T_{max} , até a condição de dormência total ou absoluta, quando T_{min} tende a se igualar à T_{max} .

A expressão "dormência relativa" também tem sido utilizada para descrever a variação na sensibilidade da semente a fatores ambientais. Assim, uma semente pode ter sua dormência térmica quebrada (há um alargamento da "janela" térmica dentro da qual a semente está apta a germinar), mas continua necessitando de outros fatores (luz, por exemplo) para transformar-se em uma plântula. Casos em que a semente necessita de luz para germinar em uma dada temperatura, mas é indiferente à luz em outra temperatura, são exemplos de dormência relativa (LABOURIAU, 1983). Baskin e Baskin (2004) definem a dormência relativa (ou condicional) como um estágio intermediário entre dormência primária e não-dormência, ou entre este último estado e a dormência secundária, sendo que a semente em dormência relativa não conseguiria germinar em uma faixa de condições ambientais tão amplas como o faria a semente quiescente. Por sua vez, a resposta ao ambiente depende intrinsecamente de flutuações endógenas no embrião (i.e., da capacidade de resposta da semente).

Os testes avaliando o potencial germinativo nas diferentes espécies são de grande valor por compararem lotes de sementes para a comercialização, para o cálculo de densidade de semeadura e na produção de mudas onde a seleção prévia da planta matriz for essencial além de outros (POPINIGIS, 1985; FERREIRA et al., 2004). Na cultura de tecidos *in vitro*, o conhecimento da performance de germinação de sementes se constitui no primeiro passo para a elaboração de

protocolos de regeneração de plantas usando embriões maduros com vistas a aumentar a eficiência do processo (OLIVEIRA et al., 2006).

2.4 Reguladores do crescimento vegetal

A forma e a função dos organismos multicelulares não poderiam ser mantidas sem uma eficiente comunicação entre células, tecidos e órgãos. Nos vegetais superiores, a regulação do metabolismo, o crescimento e morfogênese muitas vezes dependem de sinais químicos de uma parte da planta para outra. Esta idéia surgiu no século XIX com o botânico alemão Julius Von Sachs (1832-1897) (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os autores propuseram que mensageiros químicos são responsáveis pela formação e pelo crescimento de diferentes órgãos vegetais. Sugeriram também que os fatores externos, como gravidade, poderiam afetar a distribuição dessas substâncias na planta. Embora não se soubesse a identidade desses mensageiros químicos, estas idéias levaram à descoberta definitiva desses compostos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Muitos dos conceitos atuais sobre comunicação intercelular em plantas derivaram de estudos semelhantes em animais. Nestes mensageiros químicos que funcionam como mediadores na comunicação intercelular são chamados de hormônios, os quais interagem com proteínas específicas, denominadas receptores (JIMENEZ et al., 2001; GUERRA e NODARI, 2006).

Os vegetais também produzem moléculas sinalizadoras, os hormônios, responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento em concentrações bastante pequenas. Até pouco tempo, acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por apenas cinco tipos de hormônios: auxinas, giberilinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (LIZT e JARRET, 1993). Entretanto, atualmente, há fortes evidências indicando a existência de hormônios vegetais esteróides, os brassinoesteróides, que produzem uma ampla gama de efeitos morfológicos no desenvolvimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Outro conceito importante é o dos reguladores vegetais que são substâncias químicas sintéticas com efeito sobre o metabolismo vegetal, agindo de forma similar aos hormônios vegetais. Seu uso na agricultura tem mostrado grande potencial no

aumento da produtividade e na melhora do manejo cultural (HESS e CARMAN,1998; TAIZ e ZEIGER, 2004).

A aplicação dos reguladores pode ser diretamente nas plantas (folhas, semente, frutos, caules e raízes) interferindo em processos como germinação, enraizamento, floração, frutificação e senescência, e também pode ser utilizado na organogênese somática, embriogênese zigótica e embriogênese somática, com o objetivo de obter calogênese e regeneração de plantas (LIZT e JARRET, 1993; LAMAS, 2001; GUERRA e NODARI, 2006).

As auxinas foram o primeiro tipo de regulador de crescimento identificado. As auxinas mais usadas são: 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), AIA (ácido indol-3-acético), IBA (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalnoacético), 2,4,5-T (2,4,5-triclorofenoxiacético),4-CPA (ácido clorofenoxiacético) e picloran (AMAMIRATO et al.,1971; LIZT e JARRET, 1993;GUERRA e NODARI, 1999).

O balanço de auxinas/citocininas (alto/baixo)favorecem o enraizamento e o balanço inverso promove a formação de parte aérea. Concentrações iguais promovem a produção de calos (GUERRA e NODARI, 2006). Nos embriões imaturos e maduros, uma alta concentração de auxinas (2,4-D ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é necessária para a germinação ou indução à formação e calos e tem o efeito de supressão da morfogênese (EVANS et al.,1981).

As citocininas são derivadas da adenina (aminopurina) e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies (Santiago, 2001). Induzem a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (KIN), benziladenina (BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ) (GUERRA e NODARI, 2006). Fijimura et al.,(1980) sugeriram que as citocininas são essenciais para a maturação e germinação de embriões somáticos em diversas espécies vegetais.

O ácido giberélico (GA_3) é usado, algumas vezes, em cultura de meristemas, na recuperação de plantas livres de vírus. Alguns autores relataram o uso de GA_3 para ajudar na maturação normal e na germinação de embriões somáticos em gramíneas (LU et al.,1981). O ácido abscísico (ABA) descrito por estar envolvido na dormência e abscisão de folhas e frutos ou redução do crescimento vegetal (HESS e CARMAN, 1998). Na cultura de tecidos o papel deste composto está envolvido principalmente na maturação de embriões obtidos na embriogênese somática.

Na maioria das espécies, já estão descritos protocolos e informações sobre concentrações adequadas de reguladores de crescimento com objetivo da cultura de tecidos (LITZ e JARRET, 1993; GUERRA e NODARI, 1999, 2006). Em *Datura* sp. são relatados na literatura diversos estudos sobre cultura *in vitro* visando a organogênese, embriogênese e regeneração de plantas (ZAYEDA et al., 2006; NITTHIYA e AROCKIASAMY, 2010; SUNDAR e JAWAHAR, 2010). Quanto ao tipo e concentração de reguladores de crescimento, as concentrações de reguladores de crescimento nos meios podem variar de 0,01 a 10 mg/L com concentrações variando de 1 a 3 mg L⁻¹ de 2,4-D (PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010) e 0-1 mg L⁻¹ de KIN e 1-2 mg L⁻¹ (AMIRI et al., 2011). Outros ainda, avaliaram o efeito de outros reguladores de crescimento: 2,26–3,98 mg L⁻¹ (2,4-D) e 3,36 mg L⁻¹ BAP em *Datura stramonium* (SUNDAR e JAWAHAR, 2010); 1- 4 mg L⁻¹ (BAP, IAA e GA₃) combinados em *Datura metel* (NITTHIYA e AROCKIASAMY, 2010), 1-5 mg L⁻¹ (NAA, BA, KIN e 2,4-D) (EI-RAHMAN et al., 2008).

Especificamente para *Brugmansia suaveolens* há poucas informações sobre o uso de reguladores de crescimento, na cultura de tecidos para a regeneração de plantas, pela embriogênese somática. Alguns autores relatam concentrações de 3 mg L⁻¹ de NAA em *Brugmansia candida* (NIÑO et al., 2003), e 0,5 de BA 1 mg L⁻¹ de IAA (ZAYEDA et al., 2006), ambos visando a cultura de raízes *in vitro*.

A obtenção de um protocolo, com definições corretas quanto ao tipo e concentrações de reguladores adequadas a esta cultura, são pertinentes pois, representam o passo inicial para a aplicação de estratégias biotecnológicas para qualquer cultura.

2.5 Biofábricas

Na atualidade, denomina-se biofábricas, ao processo de obtenção de moléculas a partir de plantas de onde serão extraídas e purificadas para a aplicação medicinal, petrolífera ou agrônômica, depois de realizados todos os testes e experimentos científicos, além, de rigorosa avaliação da biossegurança, segundo a legislação específica vigente no país (PEEBLES, 2007).

As plantas que produzem estas moléculas, denominados de metabólitos secundários, para propósitos específicos que incluem mecanismos de defesa contra insetos e patógenos, proteção contra dano da radiação UV, para atração de

polinizadores, sobrevivência a condições de estresses abióticos entre outras (BOUGAUD et al., 2001; KIM et al., 2002).

Os metabólitos secundários são classificados geralmente de acordo com a sua via biossintética (HARBONE, 1999; BOUGAUD et al., 2001). Três grandes famílias são consideradas: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Em especial, os alcalóides têm distribuição cosmopolita no reino animal e devido às suas grandes aplicações farmacêuticas, tem sido utilizado por séculos na medicina tradicional. Os alcalóides correspondem a compostos valiosos usados como fármacos, cosméticos, química fina e ultimamente nutracêuticos (BOUGAUD et al., 2001).

A produção da hioscina ocorre nas raízes enquanto a transformação desta em escopolamina ocorre no periciclo em algumas espécies (KANEGAE et al., 1994) e nas partes aéreas em outras (PARR et al., 1990; HASHIMOTO et al., 1991; FLORES et al., 1993). Outros autores sugerem que a produção ocorreria nas raízes e depois migraria para as partes aéreas (YUKIMUNE et al., 1994; YONG et al., 2008).

A produção em escala industrial de biofármacos iniciou-se entre 1976 a 1986 (ZRYD, 1988). Bougaud et al., (2001) citam vários gargalos no uso na produção comercial destes metabólitos secundários: 1) a obtenção de protocolos eficientes de cultivo *in vitro* de células, calos, raízes, partes vegetais; 2) o uso de moléculas recombinantes depende do conhecimento totalizado das vias metabólicas e das enzimas envolvidas e 3) o alto custo de biorreatores e a manutenção da assepsia nestes durante o processo de produção de metabólitos.

A obtenção destas moléculas por muito tempo foi por plantio convencional de plantas medicinais. Todavia, as plantas originárias de acessos particulares não podem ser cultivados em tal sistema devido à presença de pragas e doenças (VERPOORTE, 2000). Outro fator é a baixa produtividade do metabólito por massa fresca obtida por fatores como estresses abióticos e bióticos que podem alterar a produção pela planta destas moléculas

Estudos envolvendo a transformação genética de plantas com *Agrobacterium rhizogenes* ainda são escassos em *B. suaveolens*. Esta biotécnica teria como vantagem transformar plantas cujos princípios ativos se encontram em suas partes subterrâneas, como ocorre com a hioscina e escopolamina (AMARAL e SILVA, 2003).

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl SOB DIFERENTES TRATAMENTOS

RESUMO

Brugmansia suaveolens é uma planta ornamental, de interesse biotecnológico, e considerada tóxica, da família das *Solanaceae*, conhecida popularmente como trombeteira. O conhecimento das características morfológicas e a “performance” de germinação e viabilidade de sementes se constituem no primeiro passo para a adoção de técnicas biotecnológicas em qualquer espécie. Este trabalho teve como objetivos: a caracterização morfológica de acessos e a avaliação do comportamento germinativo das sementes *B. suaveolens* ategumentadas *in vitro* sob diferentes condições de tratamento: acondicionamento a 4°C e 50°C, ácido sulfúrico a 50%, embebição em água e ácido giberélico em meio de cultura. A germinação acumulada foi avaliada após 14, 21, 28, 35 e 42 dias. Como resultados obtidos, 22 indivíduos foram coletados e agrupados em três diferentes grupos, diferindo apenas nas cores das flores. Os frutos apresentaram características biométricas, com valores médios de 975 mm de comprimento, 189 mm de diâmetro e 6.99 g de massa, as sementes de 789 mm de comprimento, 6,00 mm de diâmetro, 3,04 mm de espessura e massa de 0.39 g. O período estimado para o início do processo germinativo sem a presença do tegumento foi de 14 dias. Em todos os tratamentos observou-se uma germinação acumulada aumentada. Em relação ao efeito dos tratamentos pode-se observar que temperaturas de 4°C e temperaturas de 50°C não propiciaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. A exposição ao ácido sulfúrico e a embebição das sementes em água por períodos maiores reduziram a germinação. A presença do ácido giberélico promoveu a inibição do desenvolvimento dos embriões *in vitro*.

Palavras chave: Ácido sulfúrico, embebição de sementes, ácido giberélico, tegumento, altas temperaturas

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl SEED'S GERMINATION IN DIFFERENT TREATMENTS

ABSTRACT

Brugmansia suaveolens is an ornamental plant, of biotechnological interest, and considered toxic, the family *Solanaceae*, commonly known as trumpet. Knowledge of the morphological features and the performance of seeds germination is the first step towards adopting biotechnology in any species. This study aimed to characterize the morphological evaluation of specimens and *in vitro* germination indices in *B. suaveolens* under different conditions of treatments: packaging at 4 °C and 50 °C, 50% sulfuric acid, soaking in water and gibberellic acid in the culture medium. The cumulative germination was evaluated after 14, 21, 28, 35 and 42 days. In treated seeds, the teguments were removed and the seeds were cultured *in vitro*. As results, 22 individuals were collected and grouped into three different groups, differing only in the flowers colors. Fruits had as biometric characteristics mean values of 975 mm in length, 189 mm in diameter and 6.99 g of weight. Seeds presented 7.89 mm length, 6.00 mm in diameter, 3.04 mm in thickness and mass of 0.39 g in average. The estimated period for germination initiation process without the presence of the tegument was 14 days. In all treatments there was an increase in cumulative germination. Regarding the effect of treatments it was observed that temperatures of 4 °C and 50 °C did not promote differences among treatments. Exposure to sulfuric acid and soaking the seeds in water for longer periods reduced germination. The presence of gibberellic acid caused inhibition of embryo development *in vitro*.

Keywords: Sulfuric acid, soaked seed, gibberellic acid, tegument, high temperatures

3.1 INTRODUÇÃO

A *Brugmansia suaveolens* é uma planta ornamental, medicinal, de interesse biotecnológico e considerada tóxica, da família das *Solanaceae*, conhecida popularmente como saia-branca copo de leite, trombeteira, babado, zabumba branca, sete-saias, entre outras. É um arbusto semi-lenhoso, de 2-3 m de altura, com folhas grandes, alongadas e finas (CORREA, 1984).

Espécies do gênero *Brugmansia* apresentam os alcalóides atropina e escopolamina. Ambos são ésteres orgânicos formados pela combinação de um ácido aromático, o ácido trópico, e das bases complexas tropina e escopina, utilizados na produção de medicamentos (GILMAN et al., 1980).

A indústria de medicamentos tem grande interesse pelas plantas medicinais e na pesquisa da biotecnologia para a obtenção de compostos ou moléculas de interesse industrial (CHAND et al., 1997).

O conhecimento das características morfológicas e ecofisiológicas de plantas da espécie *B.suaveolens* que ocorrem na região oeste do Paraná-Brasil é o primeiro passo para o uso desta espécie com finalidade biotecnológica. A falta de informações básicas sobre as espécies nativas dificulta o aproveitamento destas em programas de uso biotecnológicos (OLIVEIRA et al., 2006). Na região oeste do Paraná, até o momento nenhum estudo foi conduzido com o intuito de realizar a caracterização das espécies de *Brugmansia* nativas.

A semente é o principal meio para a reprodução da maioria das espécies lenhosas e suas características morfológicas externas, por não variarem com as condições ambientais são importantes para auxiliar a identificação da família, gênero e espécie, além de seu conhecimento poder auxiliar os estudos de germinação e armazenamento e os métodos de cultivo (GROTH, 1985; AMORIM et al., 1997).

Como a produção de sementes é limitada no tempo, o estudo da sua “performance” frente à germinação é de fundamental importância, pois quando conservadas por determinados períodos e condições podem perder sua capacidade germinativa. Para verificar a qualidade das sementes é necessário aplicar o teste de germinação, realizado em laboratório, que determina em uma amostra a proporção de sementes vivas e capazes de produzir plantas normais sob condições favoráveis.

Quando se trabalha com espécies nativas, os resultados são mais complexos em relação à germinação para serem interpretados (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O conhecimento das características morfológicas e a “performance” de germinação e viabilidade de sementes se constituem no primeiro passo para a adoção de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos *in vitro* e a transformação genética para a produção de metabólitos secundários em escala comercial (VERPOORTE, 2000).

Levando-se em consideração a necessidade do melhor conhecimento das espécies nativas de *Brugmansia suaveolens* na região oeste do Estado do Paraná, este trabalho teve como objetivos a caracterização morfológica de acessos do município de Palotina-PR e a avaliação do comportamento germinativo de suas sementes *in vitro* sob diferentes condições.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) e no Laboratório de Taxonomia e Sistemática da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina, no período janeiro a novembro de 2010.

3.2.1 Caracterização morfológica de acessos coletados de *Brugmansia suaveolens*

Para a realização do estudo, acessos de *B.suaveolens* foram coletados em propriedades particulares, rurais e urbanas no município de Palotina, Paraná -Brasil, conforme Tabela 01.

Tabela 1. Locais de coletas da *Brugmansia suaveolens* no município de Palotina – PR.

	Proprietários	Localidade	Área	Variedade	Ambiente
1	Alcideo Lupenowo	Linha São Camilo	Rural	Rosa	Ornamental
2	Alcideo Lupenowo	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
3	Izabel Montanucci	Linha São Camilo	Rural	Amarela	Ornamental
4	Izabel Montanucci	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
5	Izabel Montanucci	Linha São Camilo	Rural	Rosa	Ornamental
6	Orlanda Grows	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
7	Olinda Strhoer	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
8	Aliane Camilo Mendonça	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
9	Rita Ap. Silva Souza	Linha São Camilo	Rural	Branca	Ornamental
10	Dirce Ritter	Centro	Urbana	Rosa	Ornamental
11	Rio Santa Fé	Centro	Urbana	Amarela	Barranco de Rio
12	Rio Santa Fé	Centro	Urbana	Rosa	Barranco de Rio
13	Ivone Bernardi	Centro	Urbana	Rosa	Ornamental
14	Ivone Bernardi	Centro	Urbana	Amarela	Ornamental
15	Cristina dos S. Rech	Centro	Urbana	Branca	Ornamental
16	Benedita Veloso	Centro	Urbana	Branca	Ornamental
17	Cristina Brandt	Centro	Urbana	Amarela	Ornamental
18	Luis Miotto	Centro	Urbana	Amarela	Ornamental
19	Valle Cruz	Centro	Urbana	Branca	Ornamental
20	Rio Pioneiro	Linha Pioneiro	Rural	Branca	Barranco de Rio
21	Abel Zadinelo	Linha Dois Irmãos	Rural	Branca	Barranco de Rio
22	Salvador De Bordoli	Linha Santa Luzia	Rural	Branca	Barranco de Rio

Para a coleta, foram utilizadas tesoura de poda e prensas de campo. Após a coleta, o material devidamente prensado foi colocado em estufas, onde permaneceu sob temperatura constante próxima a 50 °C até completa desidratação. Após a secagem, as plantas foram fixadas em cartolinas brancas, tamanho padrão de exsicatas, acompanhadas das fichas de identificação, que contém as informações referentes a cada um dos acessos coletados. Os procedimentos de coleta e de herborização seguiram as recomendações do Instituto de Botânica de São Paulo, (FIDALGO E BONONI, 1989). Todo o material herborizado foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

A caracterização morfológica dos acessos e as características biométricas dos frutos e das sementes foram realizadas seguindo o protocolo proposto por Gonçalves e Lorenzi (2008).

Para a caracterização dos frutos foram coletados 12 acessos de *B.suaveolens* do biótipo branco (por existir em maior quantidade na região), e foram considerados os seguintes aspectos: comprimento e largura; número de sementes por fruto; massa seca em estufa do fruto obtida após 72 h a 50°C; massa seca em estufa das sementes contidas no respectivo fruto. Estas avaliações e observações foram feitas mediante uma amostragem aleatória dos frutos.

Foram observadas características externas das sementes como comprimento, diâmetro, espessura e massa de 40 sementes. Para esta quantificação realizou-se a pesagem de 40 sementes, divididas em quatro amostras de 10 sementes. O comprimento, o diâmetro dos frutos e o comprimento, diâmetro e espessura das sementes foram medidos, utilizando-se um paquímetro de precisão de 0,1 mm.

Os dados da caracterização morfológica e biométrica foram submetidos à análise estatística descritiva, onde a média e o desvio padrão foram estabelecidos.

3.2.2 Avaliação da germinação *in vitro*.

Para a verificação do efeito dos tratamentos na germinação das sementes, foram avaliadas as porcentagens de germinação *in vitro*. As sementes de *B.suaveolens* do biótipo branco tiveram seus tegumentos retirados mecanicamente. Esse biótipo foi usado por produzir um maior número de frutos e sementes na região pesquisada. Foram avaliados ao todo 17 diferentes condições de danos ao embrião, uma vez que sementes com tegumentos não responderam aos tratamentos

aplicados em teste preliminar e o objetivo é a utilização do embrião como explante para a cultura de tecidos (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos aplicados a sementes de *Brugmansia suaveolens*

Grupo	Tratamento	
I	T1	- Controle
	T2	- 4°C por 24 horas
	T3	- 4 °C por 48 horas
	T4	- 4°C por 72 horas
II	T1	- Controle
	T5	- 50°C por 5 minutos
	T6	- 50°C por 10 minutos
	T7	- 50°C por 15 minutos
III	T1	- Controle
	T8	- Ácido Sulfúrico 50% por 5 minutos
	T9	- Ácido Sulfúrico 50% por 10 minutos
	T10	- Ácido Sulfúrico 50% por 15 minutos
IV	T1	- Controle
	T11	- Ácido Giberélico (20 mg L ⁻¹)
	T12	- Ácido Giberélico (30 mg L ⁻¹)
	T13	- Ácido Giberélico (40 mg L ⁻¹)
	T14	- Ácido Giberélico (50 mg L ⁻¹)
V	T1	- Controle
	T15	- Embebição em água à temperatura ambiente por 24 horas
	T16	- Embebição em água à temperatura ambiente por 48 horas
	T17	- Embebição em água à temperatura ambiente por 72 horas

O meio utilizado em todos os tratamentos foi o MS (MUSHARIGE e SKOOG, 1962) com metade da concentração de macro e micronutrientes, acrescido de 1% de sacarose, sem a presença de reguladores de crescimento, com carvão vegetal ativo a 1,0 gL⁻¹ solidificado com 7,0 gL⁻¹ de ágar e com o pH do meio ajustado para 5,8. O tratamento controle foi composto somente pelo meio MS como descrito acima.

Os tratamentos avaliando o efeito de baixas temperaturas (Grupo I) consistiram em submeter às sementes à 4 °C por 24,48 e 72 horas. As sementes

foram acondicionadas dentro de um erlenmeyer de 50 ml fechado com papel filme e dispostas na geladeira (4°C). Para avaliar o efeito de altas temperaturas sobre o embrião e sua germinação, sementes de *B. suaveolens* foram submetidas a 50 °C em banho-maria por 5; 10 e 15 minutos (Grupo II).

Com o intuito de verificar o efeito do Ácido Sulfúrico à 50% sobre o embrião, uma solução foi aplicada às sementes e estas foram mantidas submersas por 5, 10 e 15 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada (Grupo III) .

O efeito do regulador de crescimento GA₃ (ácido giberélico) foi avaliado adicionando-se 20, 30, 40 e 50 mgL⁻¹ ao meio MS e dispondo as sementes sem tegumento já assepticamente tratadas neste meio (Grupo IV).

O efeito da embebição em água foi avaliado e deixando as sementes mergulhadas em um becker contendo 50mL de água destilada e autoclavada por 24, 48 e 72 horas em temperatura ambiente (Grupo V).

Após a aplicação dos grupos de tratamentos, todas as sementes ategumentadas foram submetidas ao tratamento asséptico em fluxo laminar. Estas foram submersas por 10 minutos em álcool 70% e em seguida, em hipoclorito de sódio a 2% acrescido com 2 gotas de TWEEN 80 por 20 minutos. Subseqüentemente foram lavadas três vezes em água destilada/autoclavada. Após a assepsia, as sementes foram secas em papel filtro e com auxílio de uma pinça, foram inoculadas em vidros contendo meio MS com metade da concentração de micro e macronutrientes. As sementes sem tegumento permaneceram por uma semana no escuro e em seguida, foram transferidas para a sala de cultivo onde o fotoperíodo foi de 16 h luz e 8 h escuro em temperatura controlada a 23°C.

A percentagem de germinação foi avaliada em termos da germinação acumulada, medida em dias para a germinação após 14, 21, 28, 35 e 42 dias. As avaliações realizadas levaram em consideração a emissão de raiz, emissão da parte aérea e desenvolvimento normal da plântula.

O delineamento experimental usado para a avaliação da germinação foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, onde a unidade experimental consistiu de cinco sementes. Em todos os tratamentos avaliados, foram usadas ao todo 20 sementes de *B. suaveolens*. Os resultados obtidos para as variáveis avaliadas foram transformados em arcoseno^{1/2} para fins de análise de variância e

para a comparação entre tratamentos foi realizado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização morfológica de acessos de *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl.

Todas as plantas apresentaram folhas simples, inteiras, curto-pecioladas, com filotaxia alterna, penínérveas (Figura 4).

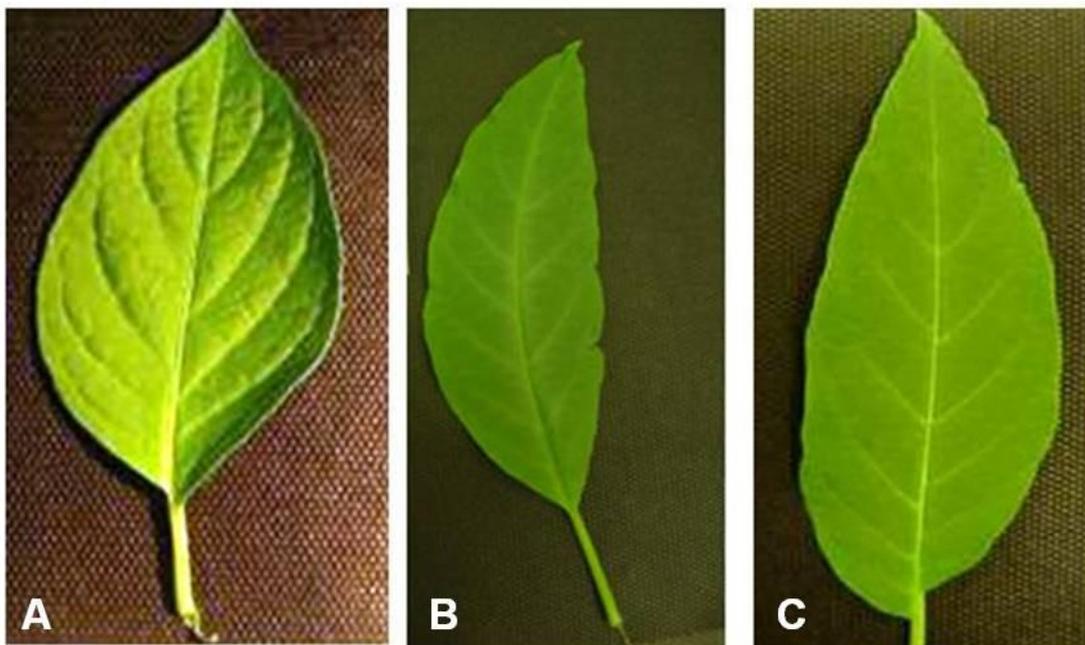


Figura 4. Caracteres morfológicos da folha da *Brugmansia suaveolens*. A - Acesso de flores amarelas. B - Acesso de flores brancas. C - Acesso de flores rosas.

Foto: Cleuza Montanucci/Fernando Furlan-Palotina-2011

Os acessos com flores amarelas apresentam folhas ovadas, ápice agudo, base obtusa, margem inteira. As plantas com flores brancas possuem folhas lanceoladas, ápice agudo a acuminado, base cuneada (as margens juntam-se em um ângulo de 45°C com a nervura central), margem levemente ondulada (repanda). Por outro lado, as folhas da plantas que produzem flores de cor rosa são assimétricas, com base oblíqua e ápice agudo a acuminado e margem levemente

repanda. As características morfológicas observadas concordam com as descritas por Reitz (1966), Lopes (2008) e Ribas (2011).

As diferenças morfológicas foliares encontradas não foram determinantes para a diferenciação entre acessos. Smith(1966) e Ribas (2011) não consideram a variação das características morfológicas da folha para diferenciar subespécies ou mesmo outras espécies de *Datura*, gênero ao qual pertencia *B. suaveolens*. Estes mesmos autores, inclusive, citam que muitas vezes as folhas de *B. suaveolens* são desiguais pela base.

Os caules dos acessos de *B. suaveolens* coletados apresentaram-se como arbustivos, com caule lenhoso e ramificado, simpodialmente distribuídos e apresentando uma gema axial (Figura 5).



Figura 5. Caracteres morfológicos do caule da *Brugmansia suaveolens*. A - Acesso de flores amarela. B - Acesso de flores branca. C - Acesso de flores rosa.

Foto: Cleuza Montanucci/Fernando Furlan-Palotina-2011

As plantas coletadas apresentaram flores de coloração rosa, branca e amarela e apresentaram características morfológicas semelhantes. As flores apresentaram-se pedunculadas. Quanto à disposição da peças florais, tiveram uma distribuição cíclica, diclamídea, quanto ao número de peças do perianto. Em relação à homogeneidade do perianto, as plantas apresentaram-se heteroclamídeas (Figura 6).



Figura 6: Coloração da corola da *Brugmansia suaveolens*. A - Acesso de flores amarela. B - Acesso de flores brancas. C - Acesso de flores rosa.

Foto: Cleuza Montanucci/Fernando Furlan-Palotina-2011

Em relação ao cálice, os acessos coletados apresentaram-se gamossépalas, actimorfas e pentâmeras. As corolas apresentaram - se amarelas, brancas e rosas, com dentes lineares e apresentaram ainda, flores pendentes com até 30 cm de comprimento, pedicelo com 3 - 5 cm de comprimento, cálice insuflado-tubular, de aproximadamente 10 - 11 cm de comprimento e de 5 a 6 dentes oblongos, largos e arredondados.

Quanto à posição relativa do gineceu, todas as plantas foram classificadas como hipóginas, os estames foram inclusos e anteras conglutinadas, sendo considerada uma flor hermafrodita.

Os frutos imaturos coletados foram classificados como cápsulas indeiscentes e apresentaram-se delgados fusiformes medindo em média 975 mm de comprimento e seu diâmetro médio de 189 mm, com textura lisa bilocular indeiscente, apresentando semelhanças com os dados apresentados por Reitz (1966), que afirma que os frutos são delgados fusiformes, medindo 100 a 150 mm de comprimento, com 20 mm de diâmetro, liso bilocular indeiscente (Figura 7).

A *B. suaveolens* é uma espécie que cresce freqüentemente em lugares úmidos, como beira de rios e em várzeas úmidas. Também pode ser encontrada em terrenos baldios, orla de matas e nas proximidades das habitações (REITZ, 1966). As diferentes condições de solo, disponibilidade de água, fertilidade entre outras, podem ter contribuído para a grande variabilidade e desvio padrão acentuados dos dados apresentados na Tabela 3.



Figura 7. Fruto imaturo da *Brugmansia suaveolens* provenientes do acesso branco.

Fonte: Cleuza Montanucci-Palotina-2010

A massa seca de frutos imaturos foi em média de 9,43 g apresentando grande variação entre os frutos analisados. Com relação à massa e número de sementes contidas no fruto, foram observadas em média 6,99 g e 201 sementes por fruto em média (Tabela 3).

Tabela 3. Características biométricas dos frutos de *Brugmansia suaveolens* do biótipo branco.

Frutos	Comprimento --mm--	Diâmetro --mm--	Massa seca --g--	Massa das sementes --g--	Número de sementes
	975 ± 273	189 ± 147	9,43 ± 5,6	6,99 ± 4,22	201,92 ± 79,38

As sementes apresentaram formato anguloso e textura rugosa, com tegumento de coloração variando de creme escuro para ocre escuro pela presença de um espesso revestimento rugoso-tuberculado semelhante a uma cortiça (Figura 8).

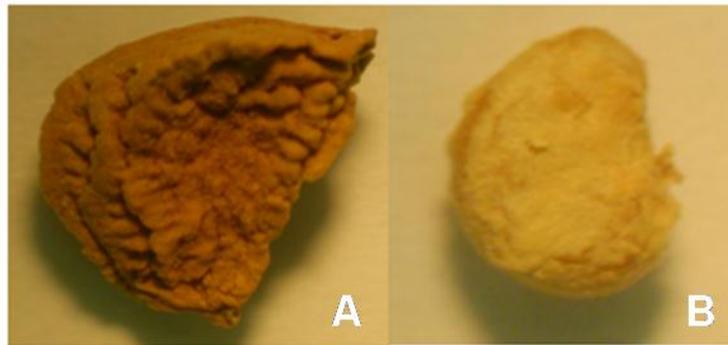


Figura 8: Sementes de *Brugmansia suaveolens* do biótipo branco. A - Semente intacta apresentando tegumento. B - Semente sem tegumento (retirado mecanicamente).

Fonte: Cleuza Montanucci-Palotina–2010

O comprimento das sementes foi em média de 7,89 mm, o diâmetro foi de 6,00 mm enquanto que a espessura foi em média de 3,04 mm. A variação para estas três características foi mínima. Em relação à massa de 40 sementes observamos uma média de 0,39 g (Tabela 4).

Tabela 4. Características biométricas e massa média de 40 sementes (g) de *Brugmansia suaveolens*.

Sementes	Comprimento --mm--	Diâmetro --mm--	Espessura --mm--	Massa (g)
	7,89 ± 0,96	6,00 ± 0,78	3,04 ± 0,46	0,39 ± 0,19

Tais observações concordam com Smith (1991) que descreveram as sementes de *B. suaveolens* como relativamente grandes e apresentando entre 7-12 mm de comprimento e 5-8 mm de largura.

3.3.2 Avaliação da germinação *in vitro*

Não foram encontradas referências até o momento, de estudos realizados para avaliar quais os fatores ambientais externos às sementes e que possuem maior influência sobre a taxa de germinação e à viabilidade do embrião nesta espécie. Em experimento preliminar (com as mesmas condições de cultivo) foi demonstrado que sementes tegumentadas não germinaram em condições *in vitro* num período de até 42 dias (dados não mostrados). Devido a este fato e com objetivo de acelerar o

processo de estudos germinativos nesta espécie, optou-se por retirar os tegumentos. Os dados obtidos neste experimento permitiram concluir que o período mínimo estimado para o início do processo germinativo sem a presença do tegumento foi de no mínimo 14 dias, antes disso, não houve germinação das sementes em nenhum dos tratamentos e períodos avaliados.

Alves (2003) observou que sementes de *B.suaveolens* levaram de 20-40 dias para germinar em ambiente com alta umidade. Tais resultados obtidos demonstram que as sementes desta espécie apresentam-se normalmente com uma dormência física.

O controle (T1) composto somente pelo meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), mostrou que a condição *in vitro* foi por si só indutora da germinação, provavelmente pela presença de água e nutrientes. Porém, a taxa de germinação máxima para o controle em todos os tempos avaliados foi de 75%. Na Figura 9 estão os resultados obtidos para o efeito da temperatura de 4°C e o tempo de tratamento sobre a germinação de sementes de *Brugmansia suaveolens*.

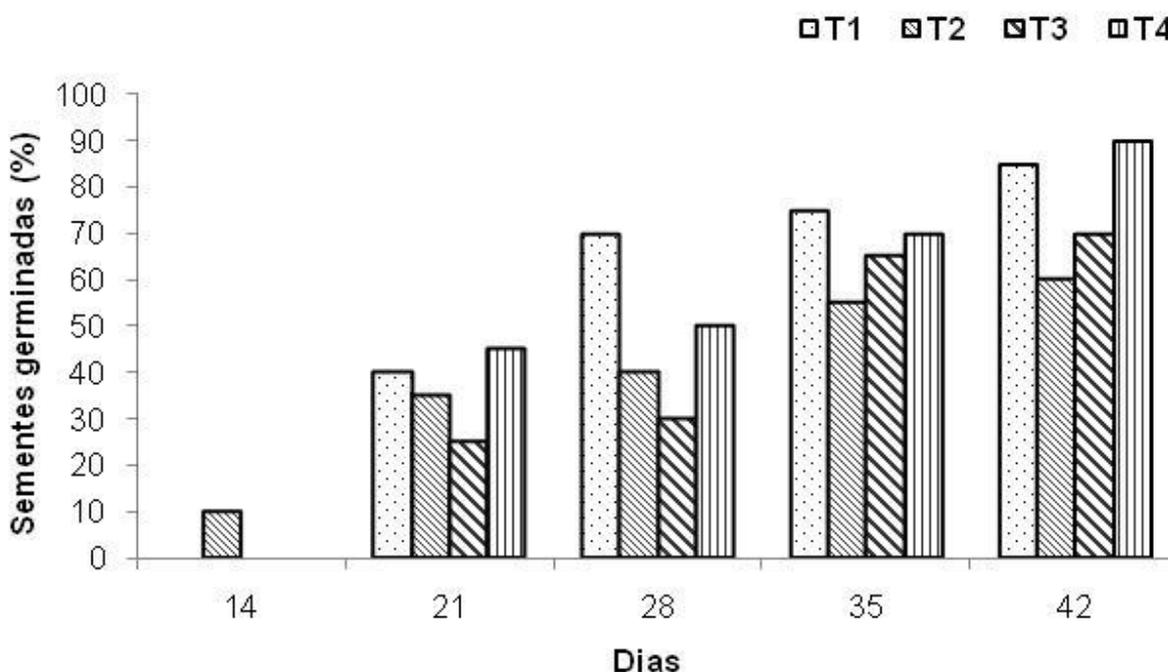


Figura 9. Porcentagem de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens*. T1- Controle: (MS); T2 - Sementes submetidas a 4°C por 24 horas; T3 - Sementes submetidas a 4 °C por 48 horas; T4 - Sementes submetidas a 4 °C por 72 horas.

Os dados obtidos demonstram que sementes de *B.suaveolens* tiveram sua germinação aumentada à medida que o tempo acumulado para a germinação foi maior, sendo assim, as melhores respostas de sementes germinadas foram com 42 dias de cultivo, porém aos 28 dias de cultivo o controle mostrou-se com alto potencial de germinação (70%). Em todas as épocas de avaliação, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos aplicados, embora as porcentagens de germinação nas diferentes épocas de exposição às baixas temperaturas variaram numericamente entre os dias de germinação.

Outro grupo de tratamentos avaliados foram os de sementes submetidas a 50° C por diferentes tempos de exposição(Figura10). Os dados obtidos concluem, que a taxa de germinação foi aumentando juntamente com os dias. A maior germinação ocorreu a partir de 28 dias, independentemente do tratamento aplicado, apesar de não diferirem estatisticamente entre si. O T1 (controle, composto por meio MS)por si só promoveu a germinação de sementes de *B. suaveolens*.

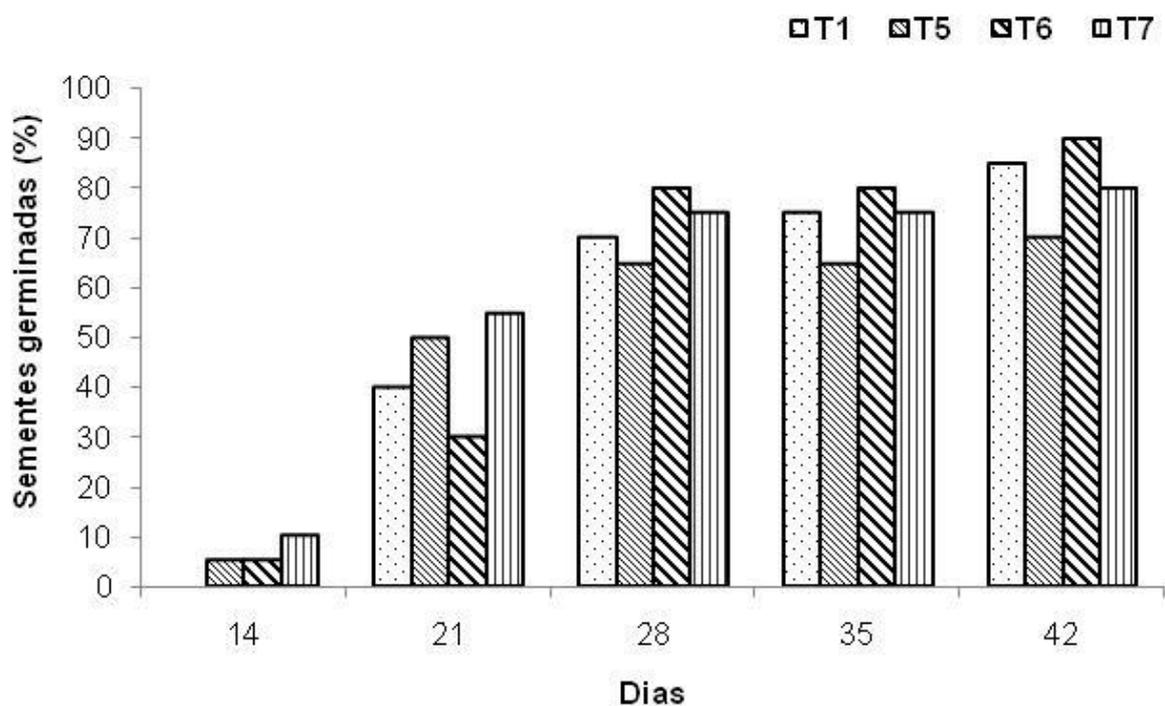


Figura 10. Porcentagem de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens*. T1 Controle (MS); T5 - Sementes submetidas a 50 °C por 5 minutos; T6 - Sementes submetidas a 50 °C por 10 minutos; T7 - Sementes submetidas a 50 °C por 15 minutos.

Os dados obtidos concordam com Ledo (1977), que verificou que o uso de água em altas temperaturas foi adequado para superar a dormência do Guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). Por outro lado, Perez et al., (1999) observaram que o tratamento das sementes de algarobeira (*Prosopis juliflora*) incubadas à 55°C em estufa, inibiu a germinação nesta espécie, porém neste estudo com a devida espécie, a germinação mostrou-se adequada à 50°C com maior superioridade aos 10 minutos, concordando com Carneiro et al., (2010) onde os tratamentos com água quente à 50°C por 10 minutos, promoveram uma maior porcentagem de germinação e maior uniformidade na solanaceae *Capsicum baccatum* L. Estes resultados seriam explicados pelo fato de que altas temperaturas poderiam interagir com reguladores de crescimento, de modo a alterar seus níveis endógenos e, por conseguinte, influenciar na regulação do processo germinativo (PAUL et al., 1973; GUALTIERI et al., 1990).

Em relação ao efeito da exposição ao ácido sulfúrico na concentração de 50% (Figura 11), os dados obtidos demonstram que sementes de *B. suaveolens* tiveram uma tendência de redução na porcentagem de germinação com aplicação do ácido, demonstrando que os embriões provavelmente sofreram injúrias. Apenas o tratamento (T8) com ácido sulfúrico por 5 minutos foi o que apresentou respostas estatisticamente diferentes ao controle nos dias de germinação de 28; 35 e 42 dias.

Francoe Ferreira (2002) observaram a morte das sementes da espécie de nome comum mandioqueira (*Didymopanax morototoni*) após o tratamento das sementes com ácido sulfúrico. Os mesmos autores citam que a utilização do ácido sulfúrico seria mais adequada para sementes em que há a impermeabilidade à água e não aquelas em que há resistência ao crescimento do embrião. O ácido sulfúrico atuaria no enfraquecimento do tegumento pela remoção da cutícula e na dissolução de suas células macroesclereídicas (MARTINS-CORDER et al., 1999). Freitas e Candido (1972) encontraram resultados positivos para o aumento da taxa de germinação em sementes de guapuruvu (*Schizolobium parahyba*) e mamoeiro (*Tachigalia mutlijuge*) com a imersão em ácido sulfúrico concentrado.

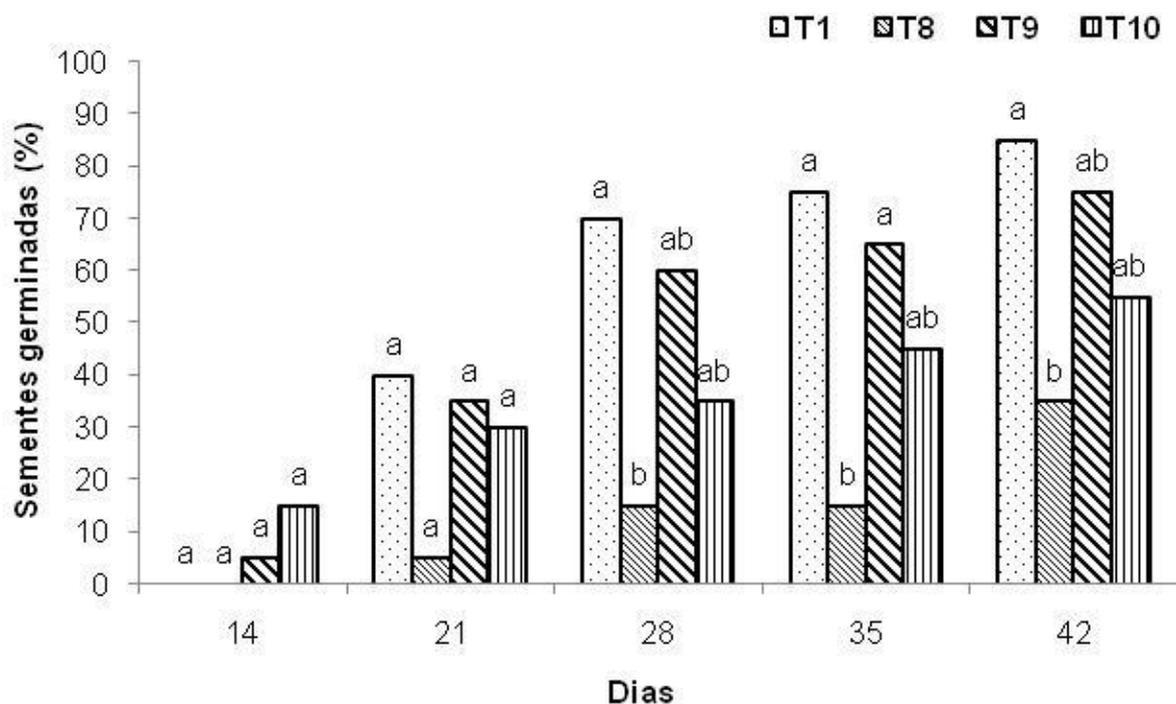


Figura 11. Porcentagem de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens*. T1 – Controle (MS); T8 - Sementes tratadas em Ácido Sulfúrico 50% por 5 minutos; T9 - Sementes tratadas em Ácido Sulfúrico 50% por 10 minutos; T10 - Sementes tratadas em Ácido Sulfúrico 50% por 15 minutos. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5%.

Foi aplicado também, como tratamento para eventual quebra de dormência o ácido giberélico, que é um potente regulador de crescimento, indutor da quebra de dormência. As concentrações avaliadas foram de 20; 30; 40 e 50 mgL⁻¹. Como resultado obtido, não foi observado germinação dos embriões em nenhuma das concentrações avaliadas (dados não demonstrados). Tais resultados demonstram que possivelmente a alta concentração do ácido giberélico promoveu a inibição do desenvolvimento dos embriões nas sementes cultivadas *in vitro*. Na literatura, foram citadas concentrações de ácido giberélico, porém em menores concentrações com efeito positivo no desenvolvimento de embriões do cafeeiro (CARVALHO et al., 1998). Moreira (2010), na *solanacea* Camapu (*Physalis sp*), observou que doses de 1500ppm de ácido giberélico inibiu a germinação de sementes *in vitro*. No

experimento com *B. suaveolens*, observou-se que, provavelmente as concentrações usadas foram altas e tiveram um efeito inibidor sobre a germinação nesta espécie.

Avaliando o tempo de embebição das sementes em água sob temperatura ambiente (Figura 12), observou-se que o tratamento (T17) de 72 horas de embebição em água promoveu uma rápida germinação, observada aos 14 dias, porém à medida que os dias de germinação aumentaram, o efeito ficou estabilizado e os tratamentos não diferiram das testemunhas.

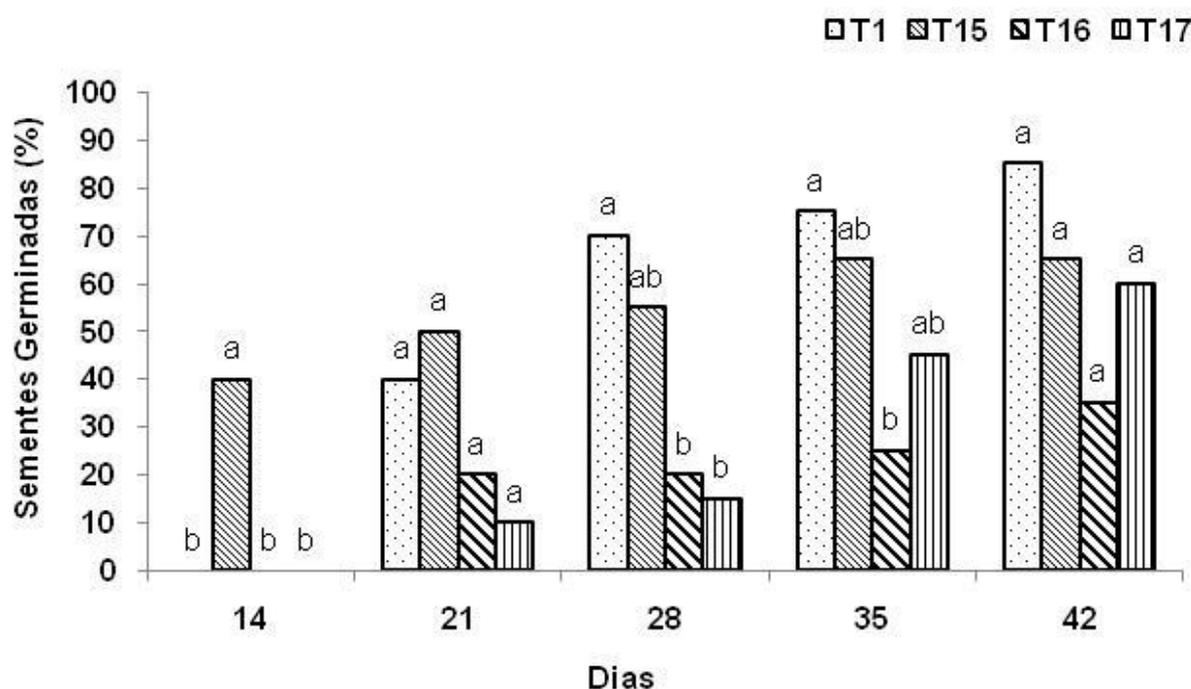


Figura 12. Porcentagem de sementes germinadas de *Brugmansia suaveolens*. T1 – Controle (MS); T15 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 24h; T16 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 48h; T17 - Sementes embebidas em água à temperatura ambiente por 72 h. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, dentro da época de cada avaliação pelo Teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos por este estudo permitirão a adequação de protocolos com a finalidade do estabelecimento da cultura de tecidos *in vitro* e a transformação genética de *B. suaveolens* para a produção de metabólitos secundários em escala comercial.

3.4 CONCLUSÕES

Os acessos pertencem à mesma espécie de *Brugmansia suaveolens*, e foram agrupados em acessos amarelo, branco e rosa.

O Meio MS com metade da concentração de micro e macronutrientes foi por si só indutor da germinação.

O período de máxima germinação é de 35 dias em sementes sem tegumento.

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE INDUÇÃO À CALOGÊNESE E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl A PARTIR DE EMBRIÕES MADUROS

RESUMO

A *Brugmansia suaveolens* é uma planta medicinal pertencente à família das *solanaceae* que produz metabólitos secundários da classe dos alcalóides com grande importância industrial. Na literatura, são escassos os trabalhos com a indução à calogênese e regeneração de plantas em *Brugmansia suaveolens*. Este trabalho teve como objetivo, o estabelecimento de protocolo de regeneração eficiente de *Brugmansia suaveolens* com a cultura de calos e regeneração de plantas a partir de embriões maduros. Foram usados para indução, manutenção e regeneração o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com a metade da concentração de macro e micronutrientes com concentrações crescentes e combinadas de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) (0; 0.5 e 1.0 mg L⁻¹) e Cinetina (KIN) (0; 0.5 e 1.0 mg L⁻¹), totalizando nove diferentes combinações de reguladores de crescimento. Foram avaliados os índices de regeneração, além das porcentagens de indução e tamanho de calos, de germinação de embriões, o número de pontuações verdes e o número de plântulas regeneradas. Como conclusões obtidas, um protocolo eficiente de regeneração de plantas a partir de embriões maduros para esta espécie foi desenvolvido. A porcentagem de indução de calos variou de 26 a 100%, a razão entre plântula e calo induzido variou entre 0 a 0,84 e a eficiência de regeneração variou de 0 a 32%. As dosagens de 0.5 mg L⁻¹ de 2,4 D e 1.0 mg L⁻¹ KIN mostraram-se ser as mais eficientes com as melhores respostas para indução de calos, maior tamanho de calos, maior número de pontos embriogênicos e plântulas regeneradas. Altas concentrações de reguladores de crescimento (1.0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1.0 mg L⁻¹ KIN mostraram-se inibidoras da calogênese e regeneração e a ausência destes reguladores promoveram a formação de calos mas não a regeneração de plantas de *Brugmansia suaveolens*.

Palavras chave: pontuações verdes, reguladores de crescimento, metabólitos secundários, indução

ESTABLISHMENT OF A CALLOGENESIS AND PLANT REGENERATION PROTOCOL IN *Brugmansia suaveolens* (Willd.) Bercht. & J. Presl FROM MATURE EMBRYOS

ABSTRACT

The *Brugmansia suaveolens* is a medicinal plant belonging to the Solanaceae family that produces secondary metabolites named alkaloids with great industrial importance. In literature, there are few studies about callus induction and plant regeneration in *Brugmansia suaveolens*. This study aimed to establish an efficient regeneration protocol in *Brugmansia suaveolens* with calli culture and plant regeneration from mature embryos. It was used for induction, maintenance and regeneration, the MS medium (Murashige and Skoog, 1962), with half macro and micronutrients concentration and combined with increasing concentrations of 2,4-D (0, 0,5 and 1,0 mgL⁻¹) and KIN (0,0,5 and 1,0 mgL⁻¹), in a total of nine different combinations of growth regulators. We evaluated the rates of regeneration, the percentages of calli induction and calli size, germination of embryos, the number of green spots and the number of regenerated plantlets. As conclusions, an efficient protocol for plant regeneration from mature embryos of this species was developed. The percentage of calli induction varied from 26-100%, the ratio of seedling and calli induced ranged from 0 to 0.84 and efficiency of regeneration ranged from 0 to 32%. The dosages of 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D and 1.0 mgL⁻¹ KIN proved to be the most efficient with the best answers to calli induction, higher calli size, higher number of embryogenic points and regenerated plantlets. High concentrations of growth regulators (1.0 mgL⁻¹ 2,4-D and 1.0 mgL⁻¹ KIN) were inhibitory to callus formation and regeneration and the absence of these regulators promoted the formation of calli but no plant regeneration in *Brugmansia suaveolens*.

Keywords: green spots, growth regulators, secondary metabolites, callus induction

4.1 INTRODUÇÃO

A *Brugmansia suaveolens*, é uma planta medicinal pertencente à família das *solanaceae* que produz metabólitos secundários da classe dos alcalóides. Na literatura, são escassos os trabalhos com a indução à calogênese e regeneração nessa planta.

Outro ponto é que, pela importância farmacêutica desta espécie, o estabelecimento de um eficiente sistema de cultura de tecidos e regeneração de plantas é pré-requisito fundamental para a engenharia genética, principalmente utilizando-se o sistema *Agrobacterium* para inserção de genes e obtenção de cultura de raízes (hairy roots) com a finalidade de obter sistemas *high scale* comerciais (ROBINS et al., 1991; KIERAN, 2001; SHELUDKO, 2010) e prover um grande número de regenerantes em pouco espaço de tempo (NITHIYA e AROCKIASAMY, 2007).

Para se conseguir a transformação genética é necessário se conhecer diversos fatores como a resposta da espécie frente à cultura de tecidos *in vitro* e a sua regeneração (NIÑO et al., 2003). Vários fatores podem afetar o desempenho de diferentes espécies em cultivo *in vitro*: composição de macro e micronutrientes, vitaminas, aminoácidos ou outras fontes suplementares, açúcares, compostos orgânicos (suco de laranja, água de coco), agentes geleificantes e reguladores de crescimento (PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010). Várias formulações de meios de cultura são comumente utilizadas, mas costumeiramente utiliza-se sacarose como fonte de glicose e uma auxina e/ou citocinina para a indução à multiplicação celular (MUSHARIGE e SKOOG, 1962; SHOO, 1972; WHITE, 1963; PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010, AMIRI et al., 2011).

Vários trabalhos na literatura avaliaram o desempenho do explante frente à cultura de tecidos e regeneração de plantas produtoras de alcalóides: anteras (*Datura stramonium*) (SUNDAR e JAWAHAR, 2010); caules adventícios e folhas (*Datura metel*) (DE et al., 2003); caule (*Datura innoxia*) (ZAYEDA et al., 2006); hipocótilos (*Datura metel*) (MUTHUKUMAR et al., 2000); gemas (*Datura insignis*) (DOS SANTOS et al., 1990). Na literatura, são escassos os trabalhos que tenham avaliado o uso de embriões maduros como fonte de explante nestas espécies em *B. suaveolens*. O uso de embriões maduros (sementes) tem como vantagem o fato de

estar disponível ao longo do ano, podendo serem armazenados sem necessidade de plantio de plantas estoque (RAHMAN et al.,2008).

Considerando-se a necessidade de realização de trabalhos básicos que auxiliem os programas de melhoramento genético da *Brugmansia suaveolens*, o objetivo, foi o estabelecimento de protocolo de regeneração eficiente da espécie, com a cultura de calos e regeneração de plantas a partir de embriões maduros.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN), da Universidade Federal do Paraná - *Campus* Palotina, durante o período de março de 2009 a dezembro de 2010.

Neste estudo foram utilizadas sementes de *Brugmansia suaveolens* do biótipo branco, oriundas de propriedades particulares rurais e urbanas do município de Palotina-PR. As sementes foram coletadas de uma mesma planta e tiveram os tegumentos retirados mecanicamente. Para a assepsia, estas foram submergidas em álcool 70% por 5 minutos e em hipoclorito de sódio 2% acrescido com 2 (duas) gotas de TWEEN 80, por 20 minutos, em câmara de fluxo laminar.

Após o tratamento asséptico, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, os embriões foram excisados com auxílio de uma pinça e um bisturi, em um estereomicroscópio, com um corte longitudinal.

Foram usados para indução, manutenção e regeneração o meio MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), com a metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes com concentrações decrescentes de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e KIN (cinetina) solidificados com 8,0g L⁻¹ de agar, contendo 30g L⁻¹ de sacarose e com pH ajustado para 5,8 e carvão ativado (Tabela 5). Na fase de regeneração não houve a adição de reguladores de crescimento.

Tabela 5. Concentrações de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e KIN (cinetina) para avaliação no estabelecimento de protocolo de regeneração *in vitro* de embriões maduros de *Brugmansia suaveolens*.

Concentração de Reguladores de Crescimento		
Tratamentos	2,4-D (mgL ⁻¹)	KIN (mgL ⁻¹)
INDUÇÃO		
T1	0,0	0,0
T2	0,0	0,5
T3	0,0	1,0
T4	0,5	0,0
T5	0,5	0,5
T6	0,5	1,0
T7	1,0	0,0
T8	1,0	0,5
T9	1,0	1,0
MANUTENÇÃO		
T2	0,00	0,25
T3	0,00	0,50
T4	0,25	0,00
T5	0,25	0,25
T6	0,25	0,50
T7	0,50	0,00
T8	0,50	0,25
T9	0,50	0,50

Em todas as etapas do cultivo, a temperatura permaneceu em torno de 25°C. Nas fases de indução os embriões permaneceram no escuro por 7 dias e nas fases de manutenção e regeneração, à luz com fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro.

Após 30 dias de cultivo em meio indutor, os embriões foram avaliados quanto à formação de calos. Houve sub-cultivo dos calos a cada sete dias e foram realizadas avaliações quanto ao número e tamanho de calos e de embriões germinados. Decorridos 15 dias (45º dia) na fase de manutenção, o número de pontuações verdes foi avaliado. O número de plântulas regeneradas foi avaliado no 60º dia. Para a quantificação do tamanho dos calos utilizou-se de um paquímetro de precisão (0,1 mm). A massa seca (g) dos calos foi obtida pesando-se os calos após

sete dias em estufa a 50°C. O número de embriões germinados foi também quantificado.

Como índices regenerativos foram obtidos: a porcentagem de indução de calos. Esta foi calculada em função do número de calos induzidos a partir do número de embriões dispostos. Foi calculada também, a razão entre o número de plântulas obtidas e o número de calos induzidos. A eficiência de regeneração foi calculada pela multiplicação entre as porcentagens de indução e razão de plântulas obtidas por tratamento. Para fins de análise, utilizaram-se 5 embriões por placa e 10 repetições em cada tratamento. A análise de variância foi realizada considerando as diferentes combinações de reguladores como tratamentos, com 5 embriões por placa Petri e 10 repetições, aplicando-se o teste Tukey a 5% para diferenciar as médias por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 1999).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As etapas de indução de calos e obtenção de plântulas regeneradas estão demonstradas na Figura 13. Os explantes utilizados foram embriões maduros com cerca de 2 à 3 mm (Figura 13A). Alguns embriões germinaram com sete dias de escuro (Figura 13 B). A iniciação da formação de calos foi observada a partir de 30 dias após os embriões terem sido dispostos no meio de cultura (Figura 13 C). Os calos embriogênicos foram observados no meio de manutenção a partir do 40º dia (Figura 13D). As plântulas com um sistema radicular bem desenvolvido foram observadas no meio de regeneração após 55 dias de cultivo (Figura 13 E). Plântulas regeneradas e aclimatadas em vaso (Figura 13 F).

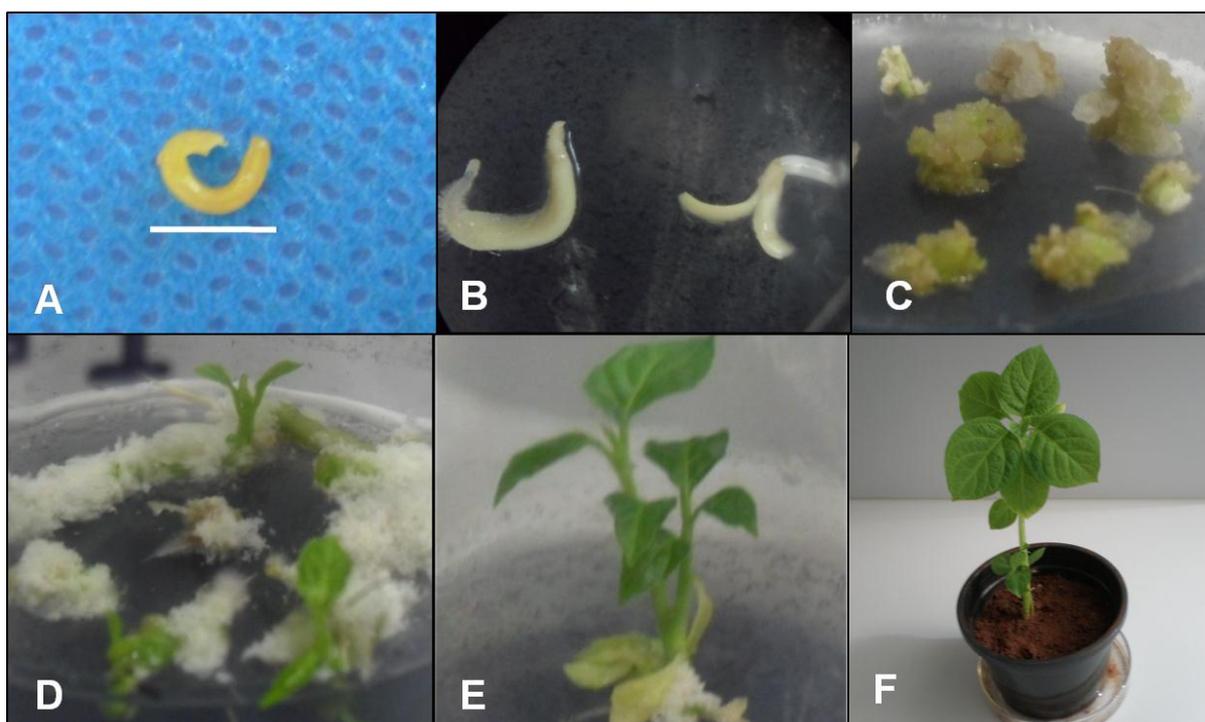


Figura 13. (A) embrião inteiro com cerca de 3 mm; (B) embriões germinados; (C) calo embriogênico; (D) calos apresentando pontuações verdes; (E) Plântula após ser transferida para meio de regeneração; (F) Planta regenerada após aclimação.

Fonte: Cleuza Montanucci-Palotina-2010

Os calos formados tinham aspecto leitoso e eram friáveis. Os calos que apresentavam pontuações verdes apareciam na superfície e então eram convertidos em primórdios foliares subsequentemente em brotações (Figura 13 D).

Um dos requisitos básicos de um protocolo eficiente é a sua rapidez em obter plântulas regeneradas. Os dados permitem concluir que em *Brugmansia suaveolens*, o tempo médio requerido para a obtenção de plântula é de 60 dias ou oito semanas. Em *Datura innoxia*, Rahman et al.,(2008), comentam sobre o período mínimo de seis semanas; Zayeda et al., (2006), dez meses sem a adição de hormônios. Em *Scopolia porniflora*, Yong et al., (2008) relataram o período de seis semanas.

As concentrações de 2,4-D e KIN avaliadas foram 0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. Outros autores, avaliando o efeito da concentração destes reguladores na cultura *in vitro* de embrião maduro de *Datura stramonium*, testaram concentrações variando de 1 a 3 mg L⁻¹ (PARSAEIMEHR e ALIZADEH, 2010) e 0-1 mg L⁻¹ de KIN e 1-2 mg L⁻¹ (AMIRI et al., 2011) outros ainda, avaliaram o efeito de outros reguladores de crescimento: 2,26–3,98 mg L⁻¹(2,4-D) e 3,36 mg L⁻¹BAP em *Datura stramonium* (SUNDAR e JAWAHAR, 2010); 1-4 mg L⁻¹ (BAP, IAA e GA) combinados em *Datura metel* (NITHIYA e AROCKIASAMY, 2007); 3 mg L⁻¹ de NAA em *Brugmansia candida* (NIÑO et al.,2003) e 0,5 de BA e 1 mg L⁻¹ de IAA (ZAYEDA et al., 2006).

Na Tabela 6 estão dispostos os dados relativos ao índice regenerativo nos diferentes tratamentos. Os dados permitem concluir sobre diferenças na indução de calos, capacidade regenerativa e regeneração de plantas entre os tratamentos avaliados, o que sugere uma atuação indutora no crescimento celular pela presença/ausência dos reguladores de crescimento no meio de cultura.

Os tratamentos 2,3,6 e 7apresentaram os melhores porcentagem de indução de calos (100%), porém somente os tratamentos 6 e 7 apresentaram as melhores eficiências de regeneração (32%). Estes resultados concordam com os encontrados por Amiri et al., (2011) que observaram que para manter a regeneração de plantas em *Datura stramonium* o efeito mais importante foi o de 2,4-D (tratamento 7) e que a presença de 2,4-D e KIN juntos, poderiam ser explicados pelo fato de que a cinetina encorajaria o efeito do 2,4-D, mas ele por si só não seria capaz da formação de calos e regeneração (tratamentos 2, 3 e 6).

Tabela 6. Índices regenerativos nos diferentes tratamentos

Tratamento	IC %	NPRC	ER%
T1	58	0,0	0,0
T2	100	0,17	17
T3	100	0,13	13
T4	74	0,24	18
T5	66	0,22	15
T6	100	0,32	32
T7	100	0,32	32
T8	96	0,20	19
T9	26	0,84	22

IC: Indução de Calo – NPRC: Número de plantas regeneradas/ Calos Induzidos - EF: Eficiência de Regeneração - T1: Controle (MS) - T2: 2,4-D=0/KIN=0,5 - T3: 2,4-D= 0/KIN=1,0 - T4: 2,4-D= 0,5/KIN=0 - T5: 2,4-D= 0,5/KIN=0,5 - T6: 2,4-D= 0,5/KIN=1,0 - T7: 2,4-D= 1,0/KIN=0- T8: 2,4-D= 1,0/KIN=0,5 - T9: 2,4-D= 1,0 /KIN= 1,0.

O tratamento 9, apresentando as maiores dosagens de auxina e citocinina, embora apresentando uma baixa porcentagem de calos induzidos(21%), teve proporcionalmente a maior razão para número de plântulas por calo induzido (0,84). Os resultados permitem concluir que concentrações elevadas de 2,4-D e KIN foram inibidores para a formação de calos nesta espécie.

O tratamento controle apresentando uma porcentagem de calos de 58%, mas não formou plântulas regeneradas, o que evidencia o efeito dos reguladores de crescimento sobre a regeneração de planta.

Amiri et al., (2011) observaram que em *Datura stramonium* dosagens de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D combinada com 0, 25 e 0,5 mg L⁻¹ de KIN foram as melhores para a formação de calogênese nesta espécie e que, ao aumentar as dosagens de KIN para 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ houve um efeito negativo sobre a calogênese.

Os dados obtidos neste trabalho discordam de Brasileiro et al., (1999), que em tomate (*Lycopersicon esculentum*) e sob as mesmas condições, não observaram calogênese e regeneração de plantas.

Os dados obtidos para a porcentagem de germinação estão demonstrados na Figura 14.

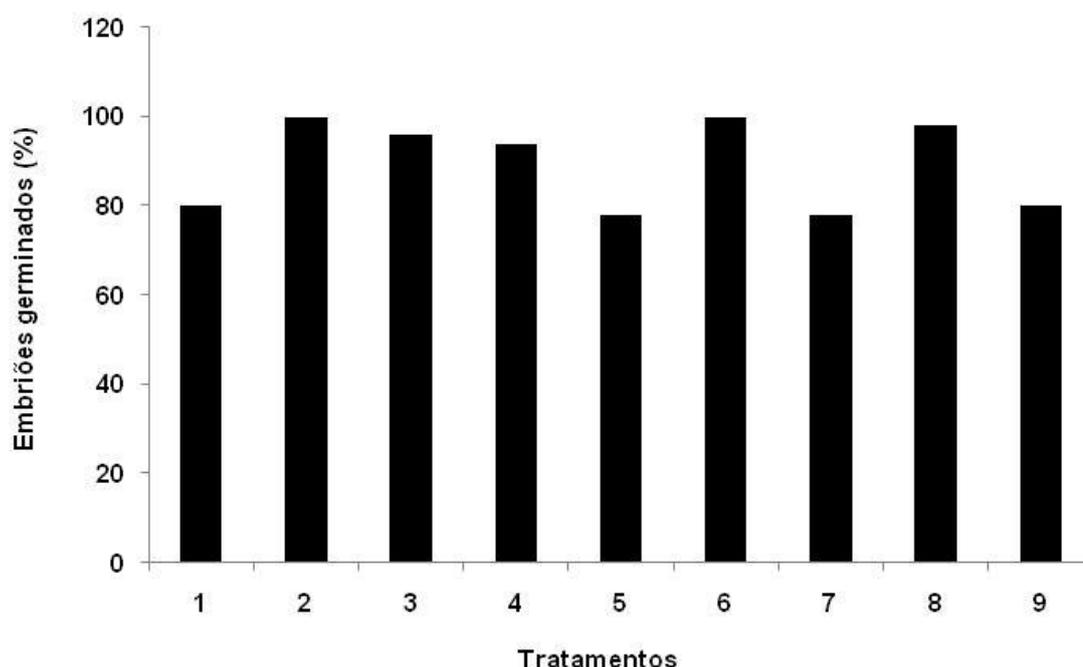


Figura 14. Embriões germinados de *Brugmansia suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. -T1: Controle (MS) - T2: 2,4-D=0/KIN=0,5 -T3:2,4-D=0/KIN=1,0 - T4: 2,4-D=0,5/KIN=0 - T5: 2,4-D=0,5/KIN=0,5 - T6: 2,4-D=0,5/KIN=1,0 - T7: 2,4-D=1,0/KIN=0- T8: 2,4-D=1,0/KIN=0,5 - T9: 2,4-D=1,0/KIN= 1,0.

As percentagens de germinação dos embriões nos diferentes tratamentos foram similares estatisticamente e variaram de 78 a 100%. O tratamento 1 (controle) apresentou 80% de germinação, o que demonstra que o meio MS pela metade é por si só indutor da germinação *in vitro*, possivelmente explicado pela presença de água e nutrientes. O controle apresentou a formação de calos organogênicos e embriogênicos, evidenciando que não há necessidade do regulador de crescimento para a formação de calos, possivelmente explicado pelo fato de que um desbalanço hormonal endógeno, aliado a uma condição de estresse, seriam os indutores da calogênese (PERES, 2002).

O tamanho médio dos calos foi de 2,29 mm, sendo que o tratamento 6 (0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de KIN) foi estatisticamente distinto dos demais originando os maiores calos (2,3 cm). O tratamento 9 com as maiores concentrações de reguladores de crescimento apresentou um efeito inibidor sobre o tamanho dos calos (0,4cm). Nos demais tratamentos, ocorrer a formação de calos de diversos tamanhos em quase todas as concentrações e combinações de reguladores de

crescimento usados não diferindo estatisticamente ($P < 5\%$). Em relação à massa seca dos calos, o tratamento 6 foi o que gerou maior massa seca (0,23g) e o tratamento 1 e 9 (0,041 e 0,044g) os de menor massa.

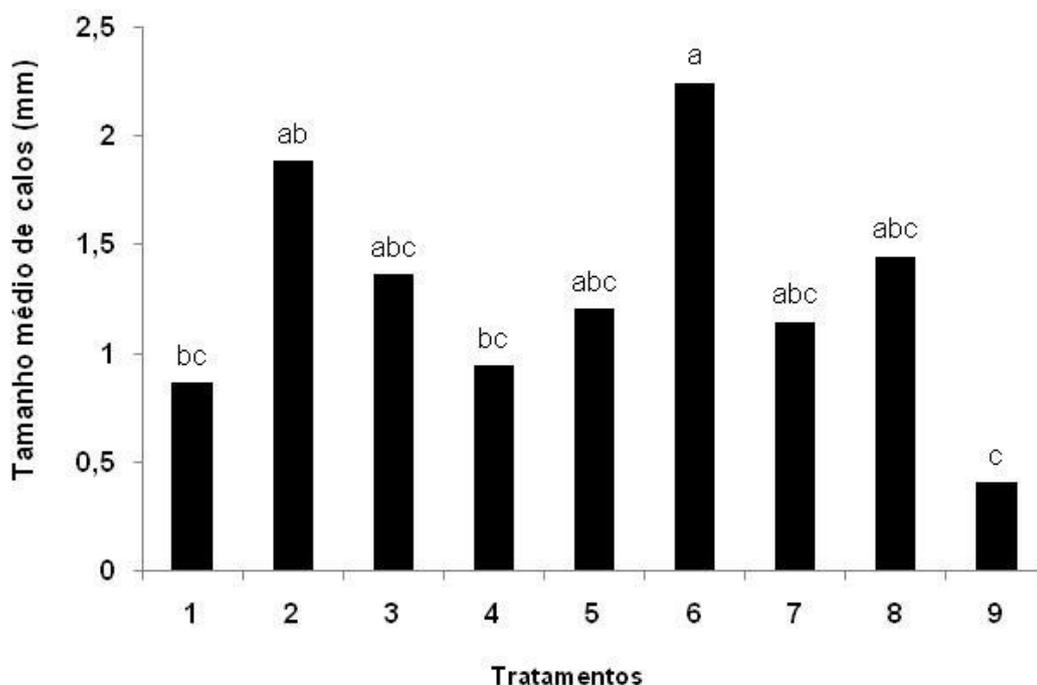


Figura 15. Tamanho médio de calos de *Brugmansia suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. T1 - Controle (MS) - T2: 2,4-D= 0/KIN=0,5 - T3: 2,4-D= 0/KIN=1,0 - T4: 2,4-D= 0,5/KIN=0 - T5: 2,4-D= 0,5/KIN=0,5- T6: 2,4-D= 0,5/KIN=1,0 - T7: 2,4-D=1,0/KIN=0- T8: 2,4-D= 1,0/KIN=0,5 - T9: 2,4-D= 1,0 /KIN= 1,0.

Diversos autores citados na literatura relatam sobre diferentes porcentagens de indução de calos: Parsaeimehr e Alizadeh (2010), afirmam que a presença de 2,4-D é essencial para a formação de calo em *Datura stramonium*. Miskatet al., (2003) observaram dosagens de $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4-D tiveram as melhores respostas à indução de calos a partir de fragmentos de caule de *Datura metel*. Sundar e Jawahar (2010) observaram que somente o 2,4-D presente no meio não é por si só indutor da calogênese e regeneração de plantas. Os autores relatam que as melhores performances foram obtidas com concentrações de $3,98 \text{ mgL}^{-1}$ e $3,36 \text{ mgL}^{-1}$ de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). Reynolds (1992) observou o efeito sinérgico

entre 2,4-D e baixas concentrações de citocininas para a indução da calogênese e regeneração de plantas em *solanaceae*.

Em relação ao número de calos com pontuações verdes ou pontos embriogênicos (Figura 16), a melhor combinação de reguladores foi a 0,5mgL⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mgL⁻¹ de KIN (Tratamento 6), embora não sendo estatisticamente distinto dos demais, mas apresentando os maiores valores numéricos para a porcentagem de pontuações embriogênicas. Os valores de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de KIN (Tratamento 9) promoveu um decréscimo no número de pontuações verdes mostrando a sensibilidade do explante à doses maiores que 1,0 mg L⁻¹ de auxinas combinadas às citocininas.

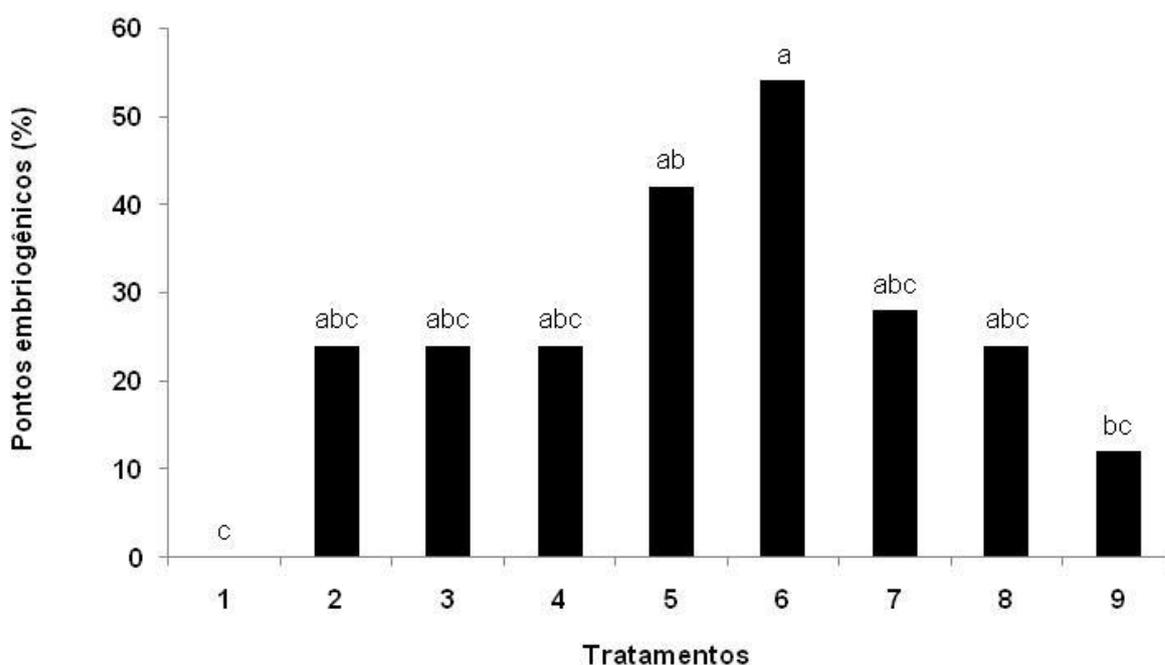


Figura 16. Pontos embriogênicos de *Brugmansia suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. T1 - Controle (MS) - T2: 2,4-D= 0/KIN=0,5 - T3: 2,4-D=0/KIN=1,0 - T4: 2,4-D=0,5/KIN=0 - T5: 2,4-D=0,5/KIN=0,5 - T6: 2,4-D=0,5/KIN=1,0 - T7: 2,4-D=1,0/KIN=0- T8: 2,4-D=1,0/KIN=0,5- T9: 2,4-D=1,0/KIN=1,0.

Os dados obtidos para o número de plântulas regeneradas (Figura 17) permitem concluir que os tratamentos aplicados apresentaram-se estatisticamente distintos. Os maiores valores foram observados nos tratamentos: 5, 6 e 7 com 30,35 e 45 plântulas regeneradas respectivamente. O controle não apresentou plântulas regeneradas evidenciando que apesar de haver a formação dos calos, as auxinas e citocininas estão envolvidas na programação e diferenciação celular, sem a qual não há formação de uma plântula normal.

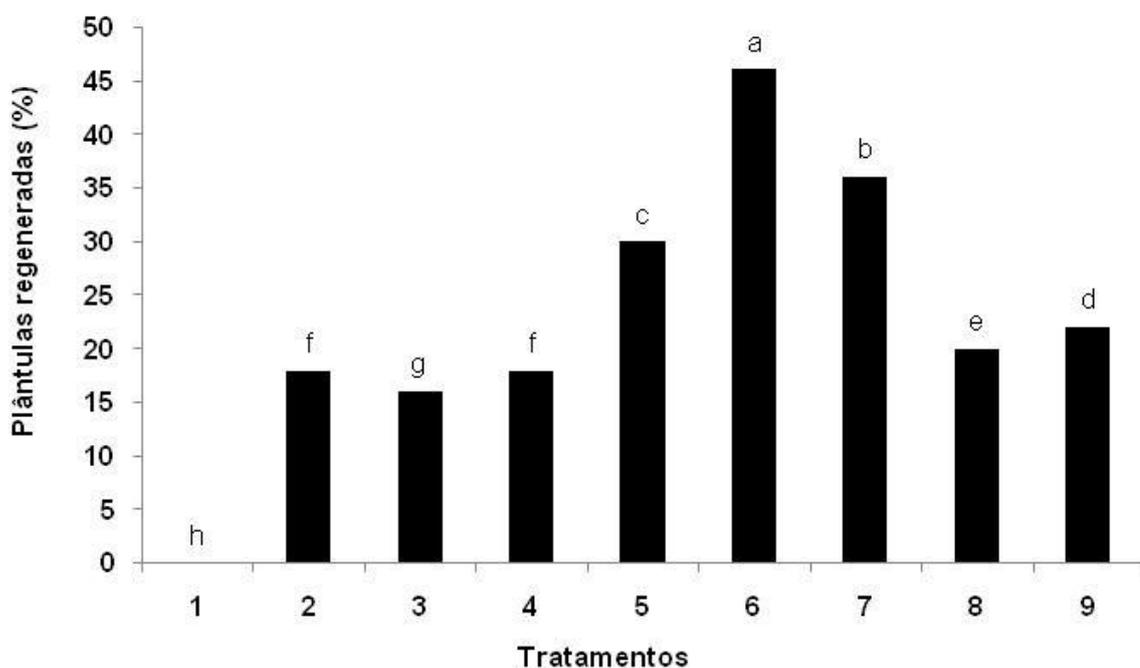


Figura 17. Plantas regeneradas de *Brugmansia suaveolens* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. T1: Controle (MS) - T2: 2,4-D=0/KIN=0,5 - T3: 2,4-D=0/KIN=1,0 - T4: 2,4-D=0,5/KIN=0 - T5: 2,4-D=0,5/KIN=0,5 - T6: 2,4-D=0,5/KIN=1,0 - T7: 2,4-D=1,0/KIN=0 - T8: 2,4-D=1,0/KIN=0,5 - T9: 2,4-D=1,0/KIN=1,0.

Os dados obtidos discordam de Niño et al.,(2003) que, estudando a performance de *Datura metel* quanto a regeneração de plantas *in vitro*, observaram que concentrações de 1,0 mgL⁻¹ de 2,4-D e KIN resultaram no maior número de pontos embriogênicos tendo como explante as folhas. Neste experimento, o explante usado foi embriões maduros que em dosagens similares geraram número médio de 20 plântulas. Tais observações poderiam ser possivelmente explicadas pelo fato da

regeneração celular ser genótipo dependente (PRZETAKIEWCZ et al., 2003). A provável explicação para o efeito do genótipo na regeneração a partir de sementes maduras pode ser os níveis de hormônios endógenos presentes no embrião (JIMÉNEZ e BANGERTH, 2001). Chen (2006) comenta que no processo regenerativo podem estar envolvidos genes padrões de expressão gênica que mudariam o destino da célula. A exposição às altas concentrações de auxinas e citocininas poderiam causar mudanças no programa de desenvolvimento celular normal o que poderia explicar porque concentrações maiores que $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ reduziram a eficiência regenerativa.

Porém, Niño et al., (2003) em *Brugmansia cândida* citam, que concentrações de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de NAA originaram os maiores percentuais quando outras fontes de explante foram usadas (hipocótilo, raízes e caule).

O uso de embriões maduros certamente tem como vantagens a redução do tempo por estarem disponíveis ao longo do ano, podendo ser armazenados sem necessidade de plantio de plantas estoque, o que certamente agiliza o emprego da biotecnologia nesta espécie.

4.4 CONCLUSÕES

Foi obtido um protocolo eficiente de regeneração de plantas a partir de embriões maduros, com uma eficiência de regeneração de 32%, onde as melhores dosagens de reguladores de crescimento foram $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de 2,4-De $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, P.S.; MEYER, S.E. Ecological aspects of seed dormancy loss. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 8, n.2, p.183, 1998.

ALVES, M.N. **Alocação de alcalóides tropânicos em *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae)**. Campinas, 2003. Tese (Doutorado Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, 2003. p.113.

AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcalóides e óleos essenciais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, n.30, p.55-59, 2003.

AMIRI, S.; KAZEMITABAR, K.; AZADBAKHT, M. *In vitro* propagation and whole plant regeneration from callus in *Datura* (*Datura stramonium*. L). **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.3, p. 442 – 448, 2011.

AMAMIRATO, P.V.; STEWARD, F.C. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. **Botanic Gazette**, Florence, p.149-158, 1971.

AMORIM, I. L.; DADIVE, A. C.; CHAVES, M. M. F. Morfologia do fruto e da semente, e germinação da semente de *Trema micrantha* (L.) Blum. **Revista Cerne**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 138-152, 1997.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, Kentucky, USA, v. 14, p.1-16, 2004.

BENVENUTI, S.; MACCHIA, M. Light environment, phytochrome and germination of *Datura stramonium* L. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.38, n.1, p.61-71, 1997.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum, 1994. p.445.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: viability, dormancy and environmental control**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. p.375.

BORTHWICK, H.A. History of phytochrome. In: MITRAKOS, K.; SHOROPSHIRE, W. **Phytochrome**. New York: Academic Press, 1972. p. 3-23.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S., GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. **Plant Science**. v. 161, Issue 5, p. 839-851. 2001.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, 1999, p. 309.

CARDOSO, Victor José Mendes. Sementes: dormência ou quiescência? **La Insignia**, Madrid, ano 10, 27 nov. 2004. Disponível em: <http://www.lainsignia.org/2004/noviembre/cyt_008.htm><http://www.lainsignia.org/2004/noviembre/cyt_008.htm>. Acesso em: 19 abr. 2011.

CARNEIRO, G.G.; BARBOSA, J.A.; SILVA, E.O.; GOIS, G.C.; LUCENA, H.H.; ALVES, E.U. Germinação de Pimentas Cambuci submetidas à superação de dormência em água quente. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 882-885, 2010.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 588.

CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R.J.; MENDES, A.N.G.; ANTUNES, L.E.C.; SILVA, A. T. Efeito do Ácido Giberélico e Benzilaminopurina no crescimento in vitro de embriões do cafeeiro cv. acaiaí. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Lavras, v.33, n.6, p.1-5, 1998.

CHAND, S.; SAHRAWAT, A.K.; PRAKASH, D.V.S.S.R. *In Vitro* Culture of *Pimpinella Anisum* L (Anise). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, p.1-5, 1997.

CHALUPA, V. Temperature. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. New York: Springer, 1987. v. 1, p. 142-151.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.1, p.1081.

CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 6, p.288.

DAMIÃO FILHO, C.F. **Micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 60p.

DEB, S.C.; BOOIJ, H.; MEYERINK, P.; HUISMAN, G.; WILDE, D.H. Steroidal compounds from in vitro regeneration shoots of *Datura metel*. **Fitoterapia**. Netherlands. v. 74 .n.1-2, p. 14-17. 2003.

DOS SANTOS, M.C.F.; ESQUIBEL, A.V.P. In vitro propagation of the alkaloid producing plant *Datura innoxiosa* Barb.Rodr. **Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 21, n.1, p.75-78. 1990.

EL-RAHMAN, R.A.; EL-DIN, E. W. H.; GABAL A. EL-SAID.; KHLIFA H.D. Production of Scopolamine and Hyoscyamine in Calli and Regenerate Cultures of *Datura metel* (L.). **Journal of Applied Sciences Research**, Egypt, v.4, n.12, p. 1858-1866, 2008.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; FLICK, C.E. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In: THORPE, T. A. **Tissue culture: methods and applications in agriculture**. New York, Academic Press, 1981. p. 45-113.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.3** - Sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.

FERREIRA, A.G.; HU, C.Y. Cultura de Embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 371-393.

FERREIRA, A.G.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; CUNHA, G.G. Fisiocologia de *Ilex paraguariensis* com ênfase na embriologia experimental. In: WINGE, H.; FERREIRA, A.G.; MARIATH, J.E.A.; TARASCONI, L.C. **Erva-Mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 161-172.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 1989. p. 62.

FIGUEREDO, S.F.L.; ESQUIBEL, M.A.; COSTA, C.G. Histogênese de calo de explante caulinar de *Datura insignis*. **Revista Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, p.71-77, 1989.

FLORES, H.E.; YAO-REM, D.; CUELLO, J.L.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. **Plant Physiology**, Berlin, n. 101, p. 363–371, 1993.

FRANCO, E.T.H.; FERREIRA, A.G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Didymopanax morototoni* (Aubl.). Dene. et planch. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12 n.1, p. 1-10, 2002.

FREITAS, J.A.C.; CÂNDIDO, J.F. Tratamento químico para abreviar a germinação de sementes de guapuruvu (*Schizolobium excelsum*, Vog.) e mamoeiro (*Tachigalia multijuba*, Benth.). **Seiva**, Viçosa, v. 32, n. 76, p.1-10, 1972.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **Zeitschrift fur Pflanzenphysiol**, Stuttgart, p.13-19, 1980.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1980. p.773.

GONÇALVES, G.; LORENZZI, H. Organografia. In: _____. **Morfologia vegetal organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2007. p. 21-52.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP EMBRAPA-CNPH: 1990. p. 99-169.

GROTH, D. Caracterização morfológica das unidades de dispersão e das plântulas de espécies invasoras das tribos *Anthemidae*, *Astereae* e *cichorieae* (Compositae). **Revista Brasileira de Botânica**, Lavras, v. 7, n. 3, p. 49-94, 1985.

GUALTIERI, J.C.S.; MORAES, V.P.A. J. Influências da temperatura, da interação temperatura-giberelina e do estresse térmico na germinação de *Prosopis juliflora* (Sw). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Paulo, v. 2, n.1, p. 41-53; 1990.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Cultura de tecidos vegetais**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. p.1-19. Apostila da Disciplina de Biotecnologia. Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. D. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1999. v.2, p. 533-568.

HARBONE, J. B. Role of secondary metabolites in chemical defense-mechanisms in plants. In: CIBA FOUNDATION SYMPOSIUM. **Anais**. Chichester: Wiley, 1999. v.154, p. 126-139.

HESS, J.R.; CARMAN, J.G. Embryogenic competence of immature wheat embryos: genotype, donor plant environment, and endogenous hormone levels. **Crop Science**, Gainesville, n. 38, p. 249-253, 1998.

JIMÉNEZ, V.M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 37- 46, 2001

KIERAN, P.M. Plant Cell Suspension Cultures. In: CABRAL, J.M.S.; MOTA, M.; TRAMPER, J.; TAYLOR, F. **Multiphase Bioreactor Design**. London: Editora, 2001. p. 391-425.

KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. Photocontrol of seeds. In: _____. **Photomorphogenesis in plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1994. p. 443-465.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: Secretaria-Geral da Organização dos Estados Americanos, 1983.p. 174.

LAMAS, F.M. Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloreto de chlormequat aplicados no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.265-272, 2001.

LEDO, A.A.M. **Estudo da causa da dormência em sementes de guapuruvu (*Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake) e orelha-de-negro (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell. Morong) e métodos para sua quebra**. Viçosa, 1977. Tese (Tese de Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 1977.

LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L.A.; **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1993. p 893.

LOPES,S.R.M. **Assimilação e transporte de nitrogênio em *Brugmansia suaveolens* (Willd) Bercht &J.Presl**. Pelotas, 2008. p. 67. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, 2008.

LORENZI, H.; MATOS,F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: ativas e exóticas**.Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LU, C.; VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues of *Panicum maximum*.Jacq. Theor. **Application Genetic**. Madison. n. 59, p.275-280, 1981.

LUNARDI, J. K. D; SILVA, J.R.A.A.; MATOS, J.A.; SOUTO, A.A.; SCHÜTZ, M.K.; ALBUQUERQUE, J.R.C.L.Trombeteira: dos rituais à industrialização. **Agropecuária Catarinense**, v. 20, n. 2, p. 32-35.2007.

MANCINELLI, A.L. The physiology of phytochrome action. In: KENDRICK, R. E.; KRONENBERG, G. H. M. (Eds.) **Photomorphogenesis in plants**. Dordrecht: Martinus Niljhof, 1994. p. 211-219.

MARTINS-CONDER,M.P.; BORGES; R.Z; BORGES JUNIOR,N. Fotoperiodismo e quebra de dormência em sementes de acácia negra (*Acacia mearnsii* de Wild). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 9, n.1, p. 71-77; 1999.

MISKAT, A.J.; HADIUZZAMAN, S.; GHANI, M.A. Plant regeneration through calli derived from explants of in vitro grown seedlings of three forms of *Datura metel* L. **Bangladesh Journal of Scientific & Industrial Research**, Alexandria- Egypt, v. 38, n.1-2, p. 81-90.2003.

MOREIRA, R.M.; FERREIRA, V.L.; SANTOS, A.C. Avaliação de Germinação e contaminação de *Physalis sp* em diferentes concentrações de meio MS *in vitro*. In: XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19.;XII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 12.; MOSTRA CIENTÍFICA, 2., 2010, Pelotas. **Anais**. Pelotas: UFPel, 2010. p.1-3.

MUHTADI, F.J.; EL-HAWARY, S.S.; HIFNAWY, M.S. Comparative HPLC and GLC determination of caffeine in different food products.**Journal of Liquid Chromatography**, New York, v. 13, p. 1013-1028, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A revised medium for rapid growth and bioassays withtobacco tissue culture.**Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, p. 473-497,1962.

MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA. **Informação e documentação**. Curitiba, 2011.

MUTHUKUMAR, B; AROCKIASAMY, D.I.; JOHN BRITTO, S.. In vitro propagation of *Datura metel* L. from hypocotyl explants. **Journal Plant Tissue Culture**, v.10, n.1, p. 39-44, 2000.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D., CARVALHO, N. M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p. 76-95.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. **Informativo Sementes**, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acesso em: 19 abr. 2011.

NIÑO, J.; GALLEGO, M.C.; CORREA, M.; MOSQUERA, Y. Production of scopolamine by normal root cultures of *Brugmansia cândida*. **Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands, v. 74, p. 289-291, 2003.

NITHIYA.P.; AROCKIASAMY, D.I. *In vitro* Micropropagation of *Datura metel* L. through Somatic Embryos from Root Explants. **Plant Tissue Culture & Biotech**, India, v. 17, n.2, p.125-130.2010.

NITHIYA, P.; AROCKIASAMY, D. I. *In vitro* Micropropagation of *Datura metel* L. through Somatic Embryos from Root Explants. **Plant Tissue Culture and Biotech.**, Bangladesh, v. 17, n.2, p.125-130, 2007.

OLIVEIRA, A.F.; ANTUNES, L.E. C.; SCHUCH, M.W. Caracterização morfológica de cultivares em coleção e considerações sobre o seu cultivo no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.231, p. 55-62, 2006.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1991. p. 95.

OLIVEIRA, Sonia. **PlantaSonya – Trombeta-de-Anjo – (*Brugmansia suaveolens*)**. Disponível em: <<http://www.plantasonya.com.br/cercas-vivas-e-arbustos/trombeta-de-anjo-brugmansia-suaveolens.html>>. Acesso em: 10 jul. 2009.

ORTOLAN, D.; SCHUELTER, A.; SCHUSTER, I.; VENDRUSCOLO, E. Efeito da temperatura e Luminosidade na Regeneração *in vitro* de plantas de trigo. **Revista Scientia Agrária**, Curitiba, v. 8, n. 1, p.105-109, 2007.

PARSAEIMEHR, A.E.; ALIZADEH, O. Requirement of Organic Factors for the Growth of *Datura stramonium in vitro* Tissues Cultured. **Research Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 252-254. 2010.

PAUL, K.B.; PATEL, C.S.; BISWAS, P.E. Changes in endogenous growth regulators in loblolly pine seeds during the process of stratifications and germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. Saint Louis, v. 28, p. 530-534, 1973.

PEEBLES, C.A. M.; GIBSON, S. I.; SHANKS, J.V.; SAN YIU, K. Characterization of an Ethanol-Inducible Promoter System in *Catharanthus roseus* Hairy Roots. **Biotechnology Progress**. v. 23, n.6, p. 1258-1260, 2007.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M.A. Shott regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato

cultivar and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 37-44, 2002.

PEREZ, S.C.J.G.A.; FANTI, S.C.; CASALI, C. A Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 252–258, 2000.

PRZETAKIEWICZ, A; ORCZYK, W; NADOLSKA-ORCZYK, A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.3,n.3, p.254–256, 2003.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: Agiplan, 1985.

RAHMAN, M.M.; SHAMSUDDIN, A.K.M.; ASAD, V. *In vitro* regeneration from mature embryos in spring wheat. **International Journal of sustainable crop production**, v.3, n.2, p.76-80, 2008.

REYNOLDS, A.G.; WARDLE, D.A.; ZUROWSKI, C.; LOONEY, N.E. Phenylureas CPPU and thidiazuron affect yield components, fruit composition, and storage potential of fourseedless grape selections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 1, p. 85-89, 1992.

REDDY, V.R.K.; DNAMAYANTHI, K.P.M. *In vitro* induction of haploids in chilli. **Journal of Cytology and Genetics**, v. 2, p. 25-28, 2001.

REINERT, J. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. **Planta**, v. 53. p. 318-333, 1959.

REITZ, P.R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí, SC: Conselho Nacional de Pesquisas; Departamento de Recursos Naturais Renováveis, 1966. p. 319.

RIBAS, O.S. Enumeratio Plantarum Horti Botanici Berolinensis. Disponível em: <<http://huntbot.andrew.cmu.edu/hibd/departaments/Library/Library-PDF/Berchtold-Text-V1-04.pdf>>. Acesso em: 12 março 2011.

ROBINS, R.J.; PARR, A.J.; BENT, E.G.; RHODES, M.J.C. Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures. 1. The kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites. **Planta**, v. 183, n. 2, p.185-195, 1991.

SACHS, R.M. Stem elongation. **Journal Plant Physiology**. v. 16, p. 73-96, 1965.

SANTIAGO, E.J.A.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; SANTANA, J.R.F.; GOMES, G.A.C. **Aclimatização: cultura de tecidos**. Lavras, MG: Ed. UFLA, 2001. v.7, p.64-67.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora Ilustrada Catarinense: Solanáceas**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense, 1966. 321 p.

SMITH, A.C. **Flora Vitiensis nova: a new flora of Fiji**. Lawai, Hawaii: National Tropical Botanical Garden, 1991. v. 5, p. 33-34.

SHOO, K. TAKEUCHI, M.; ISHIHARA, I; T. FURUYA, T. (Eds). p: 50-85.

SILVA, A. Interação de luz e temperatura na germinação de sementes de *Esenbeckia leiocrapa* Engl. Guarantã. **Revista Instituto Florestal**, v.9, n.1, p. 57-64, 1997.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and organized development of cultured carrots. II. Organization in cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**. New York, v. 45, n. 10, p. 705-708.1958.

SUNDAR, A.N.E.; JAWAHAR, M. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis from anthers of *Datura stramonium* L. **Journal of Agricultural Technology**. 2010.

SHELUDKO, D.V.; MCCULLOCH, A.J. Single-shot diffractive imaging of inhomogeneous cold atom clouds using electromagnetically induced transparency. In: KOALA (Konference on Optics and Laser Applications), 2009; STUDENT CONFERENCE, 23rd., 2010, Sidney. **Proceedings...** Sidney: University of Sydney, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.484.

TAMÁS, C.; SZUCS, P.; RAKSZEGI, M.; TAMÁS, L.; BEDO, Z. Effect of combined changes in culture medium and incubation conditions on the regeneration from immature embryos of elite varieties of winter wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 79, n. 1, p. 39-44, 2004.

VASIL, I.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. **Plant Tissue Culture**, Fujiwara, v. 111, n. 1, p. 101-103, 1982.

VASIL, I.K.; AHUJA, M.R.; VASIL, V. Plant tissue culture in genetics and plant breeding. **Journal Advanced in Genetics**, Florida, v. 20, p.127-215, 1979.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A.W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. London: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.1-29.

WALLER, G.R.; NOWACKI, E.K. An alkaloid biology and metabolism in plants. In: HORN, G.; JENSEN, M. L.; ODENBACH, G. **Alkaloids production in plants**. New York: Plenum, 1978. p. 121–141.

WHITE, P.R. **The cultivation of animal and plant cells**. New York: The Ronald Press Company, 1963. v.1, p. 228.

Yong, D.; Min, J.Y.; KIM, W.J.; Kang, Y.M.; Moon, H. S.; Lee, C.H.; Prasad, D.T.; Choi, M.S. High frequency plant regeneration and accumulation of tropane alkaloids in regenerated plants of *Scopolia parviflora*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology, Plant**. p. 203-208. v.44, n.3. 2008.

YUKIMUNE, Y.; HARA, Y.; YAMADA, Y. Tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p.1443–1446, 1994.

ZAYEDA, R.; WINK, M.; EL-SHAMY, H. *In vitro* Organogenesis and Alkaloid Accumulation in *Datura innoxia*. **Zeitschrift für Naturforsch C**, v. 61, n. 7-8, p. 560-564, Jul/Aug. 2006.

ZAYED, R.; WINK, M. Induction of tropane alkaloid formation in transformed root cultures of *Brugmansia suaveolens* (*Solanaceae*). **Zeitschrift für Naturforsch C**. v. 59, n. 11-12, p. 863-867, Nov/Dec. 2004.

ZRYD, J.-P. ; BRETTELL, R. **Cultures de cellules, tissus et organes végétaux**. Ed. Presses Polytechniques. Romandes. 1988.