

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANIDADE**

FRANCIELI COLUSSI

CULTURA DE TECIDOS DE *Euphorbia heterophylla* L.

PONTA GROSSA

2006
FRANCIELI COLUSSI

CULTURA DE TECIDOS DE *Euphorbia heterophylla* L.

**Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Curso de Pós-Graduação
em Agronomia, Área de
concentração Agricultura.**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Antonio Ayub**

PONTA GROSSA
2006

Ficha catalográfica elaborada pelo setor de processos técnicos BICEN/UEPG.

Colussi, Francielli
C726c Cultura de tecidos de Euphorbia Heterophylla. Ponta Grossa,
2006.
59 f.

**DISSERTAÇÃO (MESTRADO) - UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE PONTA**

Grossa - Pr.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO ANTONIO AYUB.

1. Cultura in vitro – Euphorbia Heterophylla L. 2- Cultura
de tecidos. 3 – Plantas daninhas . 4- Leiteiro. IT.

CDD 632.5

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me iluminou para enxergar e ter a consciência dos percalços do meu caminho.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao Curso de Agronomia pela oportunidade de realização deste curso de Mestrado.

A família Abílio Dabul por todos os momentos, pela aceitação e afeição, atuando como extensão da minha família em Ponta Grossa.

Ao Professor David Jaccoud pelas injeções de animo, quando parecia que as coisas não tinham mais jeito.

As Professoras Marluce Cortez e Roseli Ferrari pela amizade e colaboração com informações que auxiliaram na concretização deste estudo.

Aos amigos do laboratório e ao Wilson Oliveira pela amizade e auxílio técnico prestado.

A Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

As meninas do CIPP, Jociani, Juliane, Sayonara, Geisa, Viviane, Kelly, Liliam, Marilurdes, Maria, Dona Ana, por todas as risadas, choros e chazinhos compartilhados.

Ao pessoal da Agronomia, Nilcelia, Luciane, Dona Zeni.

Aos colegas de curso, pela amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o bom andamento do trabalho e que certamente foram indispensáveis para a realização deste.

Por fim gostaria de agradecer o meu orientador Professor Dr. Ricardo Ayub por sua grande influência na minha formação científica e aproveitamento para revelar minha satisfação com os novos conhecimentos adquiridos e dizer que esses ensinamentos não valeram apenas para o campo profissional.

Dedico este trabalho a meus pais Jairo e Rosmari Colussi por toda luta, ensinamentos, compreensão, afeto e pelo orgulho que me fazem sentir de suas trajetórias.

Dedico também a meus irmãos: Jairo Jr e Lucas pela paciência que tiveram comigo nessa fase da minha vida, e por serem parte do que eu sou e junto com meus pais configurarem meu porto seguro.

*...Grande não é aquele que faz tudo para que os outros percebam que ele é grande;
grande é aquele que faz tudo para que os outros sejam grandes...*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Germinação de sementes de <i>E. heterophylla</i> L.....	36
Figura 2	Regeneração a partir de brotos e raízes a partir de explantes hipocotiledonares e radiculares.....	38
Figura 3	Enraizamento das plântulas em meio MS/2 sem a adição de hormônios.....	39
Figura 4	Aclimação das plântulas enraizadas.....	40
Figura 5	Comparação de crescimento de explantes radiculares com herbicida Flex ®.....	44
Gráfico 1	Efeito do herbicida Scepter® sobre crescimento de raízes.....	43
Gráfico 2	Efeito do herbicida Flex ® sobre crescimento de raízes.....	44

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Germinação, Massa fresca, número e comprimento médio de raízes e altura de plântula de <i>Euphorbia heterophylla</i> após 10 dias em germinação no meio MS/2 e algodão umedecido.....	35
Tabela 2	Avaliação de diferentes concentrações do regulador de crescimento 2IP e CIN com ou sem AIA na regeneração de explantes hipocotiledonares de leiteiro.....	38

LISTA DE SIGLAS

AIA – ácido 3 indolacético

ALS – Aceto Lactato Sintase

CIN – cinetina , 6-furfurilamino purina

DC – Dias Curtos

DL – Dias Longos

i.a. – ingrediente ativo

MS – meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

MS/2 – meio de cultura, diluído a metade de sais e vitaminas (MURASHIGE e SKOOG, 1962)

PROTOX – Protoporfirinogenio Oxidase

v/v – (volume/volume) concentração

2iP – isopenteniladenina

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
2	Revisão Bibliográfica	13
2.1	Distribuição geográfica.....	13
2.2	Descrição e aspectos taxonômicos.....	15
2.3	Aspectos fisiológicos.....	16
2.4	Controle da ocorrência de <i>Euphorbia heterophylla</i>	21
2.5	Aspectos fitoquímicos.....	24
2.6	Cultura de tecidos.....	25
3	Material e Métodos.....	28
3.1	Germinação de Sementes.....	28
3.1.1	Preparação das sementes.....	28
3.1.2	Desinfestação das sementes.....	28
3.1.3	Substratos para Germinação.....	29
3.2	Cultura de Tecidos Utilizando Materiais Juvenis de <i>Euphorbia heterophylla</i>	30
3.2.1	Material Vegetal.....	30
3.2.2	Preparo dos explantes.....	30
3.2.3	Meios de Cultura.....	30

3.2.4	Enraizamento.....	31
3.2.5	Aclimação.....	32
4	Ensaio de herbicidas com explantes radiculares.....	32
4.1	Material	33
4.2	Métodos	33
5	Resultados e Discussão	34
5.1	Germinação de sementes de <i>Euphorbia heterophylla</i>	34
5.2	Ensaio de Regeneração.....	36
5.3	Teste de Herbicidas.....	41
6	Conclusões.....	45
7	Referências Bibliográficas.....	46

RESUMO

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o cultivo *in vitro* de *Euphorbia heterophylla*. L., que é uma das principais plantas daninhas que afeta a produtividade das grandes culturas como soja e milho. Essa espécie também vem sendo estudado pelos aspectos fitoquímicos para indústria farmacêutica, para isto foram propostos alguns ensaios. Para avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *E. heterophylla* foram testados substratos de algodão, meio MS e MS/2. Os resultados mostraram maior porcentagem de germinação e melhores índices de desenvolvimento das plantas em meio MS/2. Para o teste de organogênese foram utilizados explantes hipocotiledonares, cotiledonares e radiculares com as seguintes tratamentos: 0,5 mg.L⁻¹ 2iP, 1mg.L⁻¹ CIN + 0,1 mg.L⁻¹ AIA, 0,5 mg.L⁻¹ 2iP + 0,1 mg.L⁻¹ AIA, 1 mg.L⁻¹ 2iP + 0,1 mg.L⁻¹ AIA , 1,5 mg.L⁻¹ 2iP + 0,1 mg.L⁻¹ AIA adicionado ao meio MS/2. Foram avaliados o número de explantes com gema, número de gemas por explante, número de plântulas enraizadas e aclimatadas. Obteve-se em média duas gemas por explante hipocotiledonar, em 50% destes, a partir de organogênese direta com o uso de 0,5 mg.L⁻¹ de 2iP. Não houve regeneração a partir dos explantes cotiledonares e radiculares. A cultura racinar desenvolveu-se em todos os tratamentos contendo ou não auxina. Com o objetivo de avaliar a resistência desta planta a herbicidas, testamos a sensibilidade de culturas de raízes *in vitro*. As raízes foram repicadas em meio MS/2 com as seguintes concentrações: 0; 1; 2; 4 e 8 vezes a dose recomendada pelo fabricante dos herbicidas com ingrediente ativo imazaquin o fomesafen, inibidores da síntese de ALS e PROTOX. Com nomes comerciais de Scepter® e Flex®, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram um retardo no crescimento normal destas raízes, quando comparada a testemunha.

Palavras-chave: Leiteiro, cultura de tecidos, organogênese

ABSTRACT

The general objective of this research was the evaluation of *in vitro* culture of *Euphorbia heterophylla* L. one of the principal weeds that effects yield of important economic crops such as soybean and corn. In addition, some assays considered the evaluation of the species' potential biochemical value to the pharmaceutical industry. *In vitro* germination of *E. heterophylla* seed was tested on cotton batting as substrate, full strength and ½ MS basal medium. Results show a greater percent germination and better growth indices of plant development on the ½ MS medium. Explants tested for organogenesis included hypocotyls, cotyledon and root explants which were plated on media containing the following plant growth regulators (phytohormones): 0.5 mg/L 2ip, 1mg/L Kin + 0.1 mg/L IAA, 0.5 mg/L 2ip + 0.1 mg/L IAA, 1mg/L 2ip + 0.1mg IAA, 1.5 mg.L⁻¹ 2iP + 0.1 mg.L⁻¹ AIA added to ½ MS media. Explants were evaluated for the presence of buds, the number of buds/ explant and the number of plantlets that were rooted and re-established. On the average, hypocotyls explants responded with two buds/ explant and 50% of these developed by direct organogenesis on media containing 0.5 mg/L of 2ip. No regeneration was observed on cotyledon or root explants. Root cultures developed in all treatments with or without auxin. These results will assist in future physiological tests such as evaluating the herbicide resistance of this species and also in evaluating possible use in the pharmaceutical industry. With this objective in mind we tested the sensitivity of root cultures *in vitro*. Roots were placed in ½ MS media containing 0,1,2,4 and 8 times the manufacturer's recommended dose for the products Scepter® and Flex®. The active ingredients were imazaquin and fomesafen respectively, and they are inhibitors of ALS synthesis and PROTOX. The results obtained showed evidence of suppression of the normal growth of these roots as compared to the control treatment. Therefore, this suggests that an *in vitro* test of this type can be used to measure resistance this species to herbicides.

1. INTRODUÇÃO

A *Euphorbia heterophylla* L., conhecida também como leiteiro, é uma planta de morfologia muito variável e uma das mais temidas espécies infestantes, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais das Américas (CRONQUIST, 1981). Essa espécie está amplamente distribuída no centro-sul do Brasil, constatando-se sua presença em 74% das áreas de soja do planalto do Estado do Rio Grande do Sul (VIDAL; WINKLER, 2002). Tem extraordinária capacidade de multiplicação e as plantas crescem com muita rapidez, pelo que tendem a sombrear plantas de culturas anuais de desenvolvimento mais lento e por isso competem intensamente na absorção de nutrientes do solo (KISSMAN; GROTH, 1999), sendo de difícil controle e resistente à maioria dos herbicidas utilizados no combate às folhas largas (WILSON, 1981). Esse controle é realizado principalmente com herbicidas inibidores das enzimas acetolactato sintase (ALS) e protoporfirinogenio oxidase (PROTOX) (VIDAL; MEROTTO JÚNIOR, 2001).

Além da importância agrícola, também foram encontradas propriedades farmacológicas pela presença de substâncias bactericidas eficientes contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (DOROTHY *et al.*, 2006), presença de lectina em sementes (NSIMBALUBAKI *et al.* 1983), levantamento fotoquímico e antiinflamatório de extratos aquosos e metanólicos (FALODUN *et al.*, 2006) utilizado para tratamentos de asma, bronquite, constipação e testes em ratos demonstraram a atividade analgésica das raízes de leiteiro (VAMSIDHARA *et al.*, 2000).

A cultura de tecidos *in vitro* é uma ferramenta de grande importância para a propagação de plantas. Na agricultura é utilizada para estudos fisiológicos e testes de resistência e na indústria farmacêutica para a produção de metabólitos secundários, entre outros.

O conhecimento da morfogênese *in vitro* de *E. heterophylla* poderá auxiliar no entendimento de processos fisiológicos, como a resistência a herbicidas e futuros estudos sobre o metabolismo secundário. Em função disto, este trabalho teve como objetivo geral estudar o cultivo *in vitro* de *E. heterophylla*. Os objetivos específicos foram determinar o substrato para melhor germinação em ambiente asséptico; testar diferentes meios de cultura para avaliar diferentes explantes e concentrações de reguladores na regeneração *in vitro* de leiteiro e testar a resistência desta espécie à alguns herbicidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Euphorbia heterophylla*

E. heterophylla é uma espécie originária da América tropical e subtropical (WINKLER *et al.*, 2003). Ela é considerada uma planta invasora de diversas culturas agrícolas sendo que na revisão bibliográfica realizada por WILSON (1981) existiam registros de ocorrência em 65 países da região tropical, sendo a principal invasora em 6 desses países. Atualmente pode ser assim considerada também no Brasil, ocorrendo principalmente nas culturas de soja (BARRETO; EVANS, 1998; LORENZI, 2000). Nos E.U.A., *E. heterophylla* era a principal invasora de cultura de soja desde o final da década de 1970 no Estado da Louisiana, mas posteriormente invadiu culturas de amendoim e de algodão nos Estados da Geórgia e da Flórida tornando-se a principal invasora dessas culturas em determinadas áreas desses Estados (BRIDGES *et al.*, 1992). A expansão de *E. heterophylla* continua e após a revisão realizada por WILSON (1981) têm surgido registros de novas ocorrências, tais como: nas regiões desérticas dos Emirados Árabes Unidos (KARIM, 1992) e no Marrocos, onde o primeiro registro é de 1993 e suspeita-se que a espécie foi lá introduzida em 1980 (TANJI; TALEB, 1997).

A planta daninha *E. heterophylla* L., tem seu centro de origem na região Brasil-Paraguai (KISSMANN; GROTH, 1999). No Brasil, esta espécie está amplamente distribuída no centro-sul, constatando-se sua presença em 74% das áreas de soja do planalto do Estado do Rio Grande do Sul (VIDAL; WINKLER, 2002). Contudo, na última década, identificou-se nessa espécie biótipos resistentes aos inibidores de ALS, nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul e no Paraguai (GAZZIERO *et al.*, 1998; HEAP, 2006; VIDAL; WINKLER, 2002).

2.2 . DESCRIÇÃO E ASPECTOS TAXONÔMICOS

E. heterophylla L. (Euphorbiaceae) é conhecida popularmente como amendoim-bravo, leiteira, parece-mas-não-é, flor-de-poeta, adeus-brasil, café-do-bispo, leiteiro, café-do-diabo ou mata-brasil (LORENZI, 2000). É uma planta herbácea, anual, ereta, ramificada e reproduz-se exclusivamente por sementes. Apresenta látex esbranquiçado nas partes vegetativas e florais. A raiz é axial e bem desenvolvida. Na axila das duas últimas folhas desenvolve-se uma ramificação dicotômica onde se formam inflorescências. Várias flores masculinas (30 a 40) rodeiam uma flor feminina e o conjunto se insere na base de um receptáculo, formando uma inflorescência denominada ciátio. Após a fecundação, o pedicelo se alonga de modo que o fruto fica pendente para fora do receptáculo. As brácteas são foliáceas com a base esbranquiçada. O fruto é uma cápsula trilocular , com uma semente por lóculo. Quando madura, a cápsula se rompe de maneira explosiva, lançando as sementes para longe da planta-parental.

A semente é ovóide com uma das extremidades aguda e a outra truncada e geralmente um pouco côncava, de secção transversal quadrangular-arredondada, com 2,5 a 2,9 mm de comprimento por 2,1 a 2,5 mm em sua maior largura. O tegumento da semente é

áspero e de coloração um tanto variável, com fundo marrom-claro a quase negro. Apresenta superficialmente pequenas protuberâncias verruciformes (células mucilaginosas) irregularmente dispostas, de coloração mais clara, às vezes esbranquiçada. As folhas são simples, verdes, alternas, sendo as superiores semi-opostas ou opostas. A forma pode ser 4 variável numa mesma planta podendo ser lanceolada, obovada, ovalada, elíptica ou pandurada

(COSTA, 1982; BACCHI *et al.*, 1984).

2.3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Desenvolvimento vegetativo

As plântulas de *E. heterophylla* desenvolvem-se rapidamente (WILSON, 1981) aumentando 7 vezes, aproximadamente, a sua massa seca num intervalo entre 10 e 20 dias após a semeadura (ASCENCIO, 1997). Segundo esses autores a presença de fósforo em níveis relativamente elevados na semente pode ser importante para rápido crescimento da plântula. A deficiência de fósforo na fase vegetativa diminui a expansão foliar e o crescimento da raiz, mas *E. heterophylla* possui elevada eficiência na sua absorção (mg de fósforo/ g de biomassa da raiz) comparando-se com algumas espécies cultivadas e ruderais (ASCENCIO, 1997). Segundo WACHOWICS (1991), o desenvolvimento vegetativo de *E. heterophylla* pode ser afetado por fatores como fotoperíodo, temperatura e aplicação de ácido giberélico (GA3). O fotoperíodo não interfere na altura da planta nem no comprimento dos entrenós, mas afeta a área foliar, que aumenta sob o regime de dias longos (DL).

Com relação à morfologia foliar, na temperatura alternada de 25/15 °C (dia/noite) as folhas ficam estreitas nas plantas submetidas ao regime de dias curtos (DC) e mais largas em DL. A aplicação de GA3 aumenta a altura da planta e o comprimento dos entrenós e causa estreitamento na região central e basal da lâmina foliar. Segundo KIGEL *et al.* (1992), a taxa de alongamento do eixo é maior sob DC em regimes de temperaturas de 22/17, 27/22, 32/27 °C (dia/noite). O número de folhas produzidas é maior a 32/27 °C comparando-se com as outras temperaturas e não é alterado pelo fotoperíodo.

O desenvolvimento da planta de *E. heterophylla* pode também ser afetado por fatores genéticos além dos ambientais. Nos E.U.A., BRECKE; TOBOLA (1996) selecionaram uma população de *E. heterophylla* nos Estados da Louisiana, Geórgia e Flórida, colheram suas sementes e as plantaram na Flórida. Eles verificaram que populações originárias de diferentes localidades apresentam variações quanto à altura, largura, número de ramos, área foliar e biomassa seca. Essas diferenças morfológicas entre populações resultaram em diferentes níveis de atenuação da luz solar sobre a cultura de amendoim e afetaram diferentemente a sua produtividade, sugerindo que existem populações mais aptas a competir com o amendoim devido a sua morfologia.

Floração

E. heterophylla é classificada como uma planta de DC, tendo floração acelerada em DC podendo, no entanto, florescer em DL (WACHOWICS, 1991; KIGEL *et al.*, 1992; LEAL, 1995). Segundo LEAL (1995), a planta de *E. heterophylla* não responde ao estímulo fotoperiódico até 15 dias após a semeadura, mas apenas 5 ciclos de DC a partir do 15 ° dia são suficientes para induzir a floração nessa espécie. O ácido indolil-3-acético (AIA) pode

inibir a floração, sendo mais efetivo nesse aspecto quando aplicado durante 10 dias, entre o 10º e o 20º dia após a semeadura, no ápice da planta. De acordo com KIGEL *et al.* (1992), caso as sementes de plantas anuais de DC como *E. heterophylla* germinem na primavera terão a floração retardada devido ao progressivo prolongamento do dia nessa estação e no verão. Isso permitiria um maior crescimento vegetativo e um melhor desempenho subsequente na competição com outras plantas. Por outro lado, se a germinação ocorrer no final do verão ou no outono as plantas poderão produzir sementes rapidamente, mas nessas estações o desenvolvimento não é favorecido.

Germinação das sementes

As sementes de *E. heterophylla* podem ou não apresentar dormência. No Brasil, estudos realizados no Rio Grande do Sul (COSTA, 1982) e São Paulo indicaram que as sementes recém-colhidas não apresentam dormência (SUDA, 1991; SUDA; PEREIRA, 1997; SUDA; GIORGINI, 2000). Na Nigéria, segundo EGUNJOBI e KUPOLUYI (1973), as sementes germinam entre 24 e 48 horas após atingirem o solo, em condições favoráveis, indicando que também não possuem dormência. Nos E.U.A. (BANNON *et al.*, 1978) as sementes recém-colhidas são dormentes, mas em Israel (KIGEL *et al.*, 1992) ocorrem populações cujas sementes apresentam ou não dormência. A resposta germinativa de *E. heterophylla* a fatores ambientais tais como temperatura e luz também diverge ligeiramente entre os autores, indicando que a variação deve estar relacionada ao local de origem das sementes. No entanto, as seguintes observações podem ser feitas:

a) Nas temperaturas constantes e na presença de luz, a germinação das sementes de *E. heterophylla* ocorre entre 20 e 40°C (BANNON *et al.*, 1978; SUDA, 1991; KIGEL *et al.*, 1992). As porcentagens de germinação no escuro são baixas comparando-se com a germinação na luz. Entretanto, podem aumentar com o tempo e/ou condições de armazenamento. Em lotes de sementes colhidas no Estado de São Paulo, a proporção das que germinam a 25°C no escuro aumenta com o tempo de armazenamento a 5 °C (SUDA; PEREIRA, 1997).

Nos E.U.A., as sementes armazenadas a 5°C não germinam a 25°C no escuro, mas se forem armazenadas a 36°C a germinação aumenta com o tempo de estocagem (BANNON *et al.*, 1978). A necessidade de luz na germinação a 25°C parece estar relacionada à temperatura e ao fotoperíodo em que ocorreu o desenvolvimento da planta parental e a maturação do fruto. As sementes produzidas em condições semelhantes à primavera não necessitam de luz para que germinem, mas aquelas produzidas em condições semelhantes ao inverno, outono ou verão têm a germinação promovida pela luz (SUDA; PEREIRA, 1997).

b) Em temperaturas alternadas, as sementes de *E. heterophylla* não necessitam de luz para que germinem e o regime de 25/35°C resulta em níveis muito próximos a 100% de germinação (BANNON *et al.*, 1978; SUDA, 1991). Esses níveis podem ser atingidos também por sementes germinadas a 30 °C ou a 35 °C constante, independentemente da presença de luz (SUDA, 1991; BRECKE, 1995). As sementes de *E. heterophylla* podem germinar numa faixa de pH entre 2,5 e 10,0 e, na presença de soluções com potencial de água variando entre 0 e 0,8 MPa (BRECKE, 1995). É também capaz de emergir do solo de profundidades entre 0 e 15 cm, embora a profundidade ótima de semeadura esteja entre 2 e 5 cm (BANNON *et al.*, 1978; KIGEL *et al.*, 1992; BRECKE, 1995). A viabilidade das

sementes é mantida mesmo quando elas são enterradas durante vários meses no solo, em profundidades relativamente grandes como 20 ou 30 cm. Entretanto, as plântulas não conseguem emergir dessas profundidades (BANNON *et al.*, 1978; KIGEL *et al.*, 1992). A capacidade dessa espécie de germinar numa variedade de condições ambientais contribui certamente para sua ampla distribuição geográfica.

Segundo BRECKE (1995), essa capacidade a torna resistente a adversidades climáticas e a tratos culturais como herbicidas aplicados no solo, que não atingem sementes enterradas profundamente. A germinação das sementes de *E. heterophylla* é inibida na presença contínua de ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA), que libera etileno em soluções cujo pH é superior a 3,5 (SUDA *et al.*, 1989). De um modo geral a incubação das sementes com inibidores de ação do etileno como nitrato de prata e perclorato de mercúrio desde o início da embebição não alteram ou promovem a germinação (SUDA, 1991). A produção de etileno endógeno nas sementes ocorre somente após a emergência da radícula (SUDA, 1991), reforçando o conceito de que esse hormônio é um inibidor de germinação dessa espécie. O GA₃ pode promover a germinação de sementes fotoblásticas positivas no escuro, substituindo o efeito da luz (BEWLEY; BLACK, 1982), mas esse não é o caso de *E. heterophylla*.

A composição do material de reserva da semente de *E. heterophylla* foi investigada por SUDA e GIORGINI (2000). As sementes possuem endosperma abundante, onde lipídios e proteínas encontram-se armazenados. Esses materiais de reserva correspondem a 59 % e 27% da massa seca do tecido, respectivamente. Entre as proteínas ocorrem as albuminas (49 %), globulinas insolúveis em solução salina (30 %), globulinas solúveis (21 %) e prolaminas (0,4 %). Os açúcares solúveis correspondem a 3,7 % da massa seca da semente, sendo a sacarose o açúcar predominante; a rafinose não foi encontrada na

semente. Com relação aos polissacarídeos da semente, foi verificado que o amido não está presente no endosperma de *E. heterophylla* (SUDA; GIORGINI, 2000), mas a ocorrência de outros polissacarídeos não foi ainda investigada nessa semente. Com relação aos elementos minerais foram encontrados nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio que correspondem a 3,9 %, 2,5 %, 0,71 %, 1,0 % e 0,4% da massa seca da semente, respectivamente (ASCENCIO, 1997).

Nas sementes germinadas a 30 °C, o esgotamento do material de reserva verifica-se 96 horas após o início da embebição da semente. Durante esse tempo, os lipídios de reserva são degradados e provavelmente convertidos em sacarose. As frações protéicas têm diferentes padrões de degradação: as globulinas solúveis em solução salina são continuamente degradadas, as globulinas insolúveis degradadas entre 36 e 72 horas e as albuminas entre 60 e 84 horas após o início da embebição (SUDA; GIORGINI, 2000).

Nas condições brasileiras geralmente apresentam pronta viabilidade. Existem casos de dormência inicial, sendo que um período de baixa temperatura, depois temperaturas e luminosidade de intensidade alternada estimulam a germinação. A temperatura mais favorável está entre 25 e 35°C. A germinação ocorre durante quase todo ano. Na região sul do Brasil tem se observado que nas lavouras de soja do cedo, conduzidas no sistema convencional, há germinação bastante escalonada, enquanto nas lavouras do tarde, desde que haja umidade, e germinação é bastante uniforme, ocorrendo rapidamente e com grande intensidade. Plântulas têm grande capacidade de sobrevivência por rebrotamento a partir de gemas adventícias que podem se formar no hipocótilo, quando cortadas acima ou abaixo do nó cotiledonar (KISSMAN; GROTH, 1999).

A germinação de sementes *in vitro* possibilita a obtenção de explantes que apresentam excelente estado fitossanitário e fisiológico sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica (RIBAS, 2000).

A germinação de sementes de *E. heterophylla in vitro* pode fornecer explantes para testes de organogênese e cultura de tecidos no geral, que necessitam de materiais jovens e livres de contaminações. Na literatura são raros os relatos sobre germinação de sementes de *E. heterophylla in vitro*.

2.4. CONTROLE DA OCORRÊNCIA *Euphorbia heterophylla*

E. heterophylla possui um crescimento rápido e pode formar uma densa cobertura sobre as plantas cultivadas, estabelecendo assim uma competição por luz e nutrientes do solo (WILSON, 1981). No caso de culturas de amendoim (BRIDGES *et al.*, 1992) e de soja (WILLARD; GRIFFIN, 1993a), as perdas podem ser da ordem de 50 %. No caso de culturas de soja, *E. heterophylla* interfere também na eficiência da colheita e na qualidade da soja colhida, pois acarreta o aumento do teor de umidade do grão colhido bem como a quantidade do material contaminante (HARGER; NESTER, 1980 *apud* WILLARD; GRIFFIN, 1993a). Cada dez plantas de *E. heterophylla/m²* reduz em 7% o rendimento de grãos quando o período de convivência com a cultura ocorre durante todo ciclo (WINKLER *et al.*, 2003).

E. heterophylla é um ótimo alimento para o percevejo marrom (*Euschistus heros*), um inseto extremamente danoso à cultura de soja, que se alimenta das duas espécies

vegetais quando ocorrem simultaneamente na estação de crescimento dessas plantas (PINTO; PANIZZI, 1994). *E. heterophylla* pode também ser considerada hospedeira adicional e reservatório do fungo *Diaporthe phaseolorum*, causador do cancro da haste de soja (GARRIDO; DHINGRA, 1997).

Grande parte dos trabalhos sobre *E. heterophylla* visaram o controle de sua ocorrência e o uso de inúmeros herbicidas em diferentes tipos de culturas foi revisado por WILSON (1981). A espécie é de difícil controle, pois para evitar perdas de produtividade são necessárias repetidas aplicações bem como combinações de vários herbicidas (MOORE *et al.*, 1990; WILLARD; GRIFFIN, 1993a,b). Segundo WINKLER *et al.* (2003) a espécie é resistente a muitos herbicidas utilizados no combate às plantas de folhas largas. A resistência de *E. heterophylla* a herbicidas que inibem a acetolactato sintase, uma enzima envolvida na biossíntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina (HOLT *et al.*, 1993), foi confirmada e verificada a ocorrência de biótipos resistentes no sul do Brasil (VIDAL; TREZZI, 1999). Investigações que visam compreender as bases genéticas de tal resistência têm sido iniciadas (VARGAS *et al.*, 1999). Considerando o fato de os biótipos poderem apresentar resistência a outros herbicidas que atuam na mesma enzima, torna-se importante verificar a presença de resistência múltipla a diferentes produtos, cuja atuação se dê em outras enzimas no vegetal, para que a planta daninha possa ser controlada de modo eficaz (GELMINI *et al.*, 2001).

O uso constante de um herbicida ou herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, exerce alta pressão de seleção, o que elimina indivíduos tolerantes e a manifestação de biótipos resistente que, provavelmente, já existiam na população, mas em frequência baixa (MATIELLO *et al.*, 1999). É possível também que existam biótipos resistentes a herbicidas do grupo das S-triazinas e derivados de uréia na Venezuela e Equador (GARZON; LAZO,

1996); esses herbicidas interferem na cadeia transportadora de elétrons durante a fotossíntese (MORELAND, 1980). Segundo BRECKE e TOBOLA (1996), suspeita-se que no Estado da Louisiana (E.U.A.) ocorram biótipos resistentes a clomazona (2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona), um inibidor da biossíntese de carotenóides e de clorofila (VALVERDE *et al.*, 2000), pois esse herbicida não controla a espécie nesse estado, mas bons resultados tem sido obtidos nos Estados da Geórgia e da Flórida (E.U.A.).

Segundo BARRETO e EVANS (1998), o controle biológico de *E. heterophylla* com base na utilização do fungo *Bipolaris euphorbiaceae* tem sido investigado há mais de uma década no Brasil, mas a falta de recursos financeiros tem dificultado essas investigações. Esse fungo pode causar, em condições ideais, epifitotia, severa desfolhação, danos ao caule e morte do hospedeiro. Esses autores listaram 48 espécies de fungos patogênicos associados a *E. heterophylla* e sugeriram a utilização de alguns deles como alternativa a *B. euphorbiaceae* ou em associação com ele. O uso de aleloquímicos contra *E. heterophylla* como alternativa ao uso de herbicidas tem sido investigado. O citronelol (3,7 dimetil-6 octen-ol), extraído de cascas de laranja, inibe a germinação da semente de *E. heterophylla* e o crescimento radicular, através da inibição da mitose na raiz (GUSMAN *et al.* 1990). O óleo essencial das folhas do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) pode também inibir a germinação das sementes de *E. heterophylla* (VALARINI *et al.*, 1996).

2.5. ASPECTOS FITOQUÍMICOS

A parte aérea de *E. heterophylla* contém triterpenóides como a geniculatina, uma saponina isolada pela primeira vez nessa planta (TRIPATHI; TIWARI, 1980), acetato de β -amirina e esteroídeos (RIZK *et al.*, 1978). Entre os esteroídeos predomina o β -sitosterol, ocorrendo também campesterol, stigmasterol e colesterol em pequenas quantidades (RIZK *et al.*, 1978).

O óleo da semente de *E. heterophylla* é usado como óleo secante (EARLE *et al.*, 1960) sendo semelhante ao de *Linum usitatissimum*, comumente utilizado para esse propósito. Quanto à composição é constituído principalmente de ácidos linolênico e linoleico. Segundo SILVA e SALATINO (1999), o óleo da semente de *E. heterophylla* pode ser utilizado como matéria-prima nas indústrias de tinta e de verniz.

A semente de *E. heterophylla* contém também lectina (fitohemaglutinina) (NSIMBA-LUBAKI *et al.*, 1983; LALONDE *et al.*, 1984). Foi verificado que se trata de uma proteína dimérica com subunidades idênticas de 32 kD e que se liga especificamente a *N*-acetil-galactosamina (NSIMBA-LUBAKI *et al.*, 1983).

PRASAD e SATYASREE (1994) sugeriram a substituição de corantes alimentares sintéticos e perigosos por antocianinas produzidas *in vitro* e investigaram a produção de antocianinas e polifenóis bem como algumas enzimas associadas ao processo, em cultura de tecido de *E. heterophylla*.

As suas folhas têm sido utilizadas como purgativo pelos herboristas na Nigéria e a sua ação farmacológica foi comprovada. Essa espécie integra também uma lista de plantas

que podem ser utilizadas no combate ao câncer, existindo registro de seu uso contra verrugas (GRAHAM *et al.*, 2000). Também foram identificadas substâncias bactericidas eficientes contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (DOROTHY *et al.*, 2006), levantamento fotoquímico e antiinflamatório de extratos aquosos e metanólicos (FALODUN, 2006) utilizado para tratamentos de asma, bronquite, constipação e testes em ratos demonstraram a atividade analgésica das raízes de leiteiro (VAMSIDHAR, 2000).

2.6. CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos é a manutenção ou o crescimento de tecidos, *in vitro*, em uma maneira que possa permitir a diferenciação e a preservação de suas arquiteturas e/ou funções (SIVB, 2006), é considerada uma técnica importante para a propagação de várias espécies (LANDA *et al.*, 2000), podendo ser por via direta ou indireta, esta última via passa pela formação de calos que é considerada uma forma potencial de propagação em massa (PIERIK, 1987; LANDA *et al.*, 2000). O principal obstáculo em utilizar a fase de calo está no tempo necessário para que o processo de regeneração ocorra, aumentando o risco de variação somaclonal (TAO *et al.*, 1997).

2.6.1 Organogênese

CURUK *et al.* (2002) definem a organogênese como um processo pelo qual brotações novas são obtidas *in vitro*, por divisão celular e diferenciação, que eventualmente conduz a formação de um novo meristema apical com subsequente alongação.

A regeneração de plantas pela organogênese pode ocorrer de dois modos: pela produção de gemas aéreas adventícias diretamente do explante, sem proliferação de tecidos não diferenciados; pela regeneração de gemas aéreas adventícias partir de calos derivados de explantes. HICKS (1980). Em ambos os casos, como as células começam a constituir um novo meristema, adotam um diferente programa inerente (ou redeterminação), o qual determina o subsequente padrão de desenvolvimento.

SKOOG e MILLER (1957) estabeleceram o princípio do controle hormonal na formação de órgãos em células de medula de tabaco cultivadas *in vitro* e obtiveram a diferenciação de órgãos (gemas e raízes) pela ação quantitativa de auxinas e citocininas. Tal diferenciação é regulada pelas concentrações relativas dos dois tipos de reguladores de crescimento no meio de cultura, onde os tecidos usualmente requerem um suprimento exógeno de auxinas e citocininas para alcançarem níveis de desenvolvimento adequados (DROUAL *et al.*, 1980). A organogênese *in vitro* geralmente é ativada por uma adequada concentração de auxinas e citocininas, que levam a uma diferenciação direta de meristemas ou indiretamente de calos formado previamente (AZMI *et al.*, 1997).

2.6.2 Reguladores de crescimento .

As plantas mantêm os meristemas apicais caulinar e radicular durante toda sua vida, e essa característica possibilita uma organogênese continuada. As auxinas e citocininas controlam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e, portanto, no tipo de órgão a ser formado (PINO-NUNES, 2005). Ao contrário das auxinas, normalmente associadas à indução de raízes, um balanço AIA/CIN favorável às citocininas induz gemas caulinares tanto *in vitro* (BANNON *et al.*, 1978; KERBAUY, 1999) quanto *ex vitro* (ESTRUCH *et al.*, 1991). Existem consideráveis evidências de que esse fato diferencial de auxinas e citocininas na indução de caules e raízes são importantes para um desenvolvimento integrado do vegetal. Desse modo, as citocininas produzidas nas raízes podem induzir a formação de caules e esses são centros produtores de auxinas, necessária à formação mais raízes. O crescimento integrado e equilibrado entre caule e raízes é importante, pois esses órgãos possuem funções complementares na sobrevivência do vegetal (PERES; KERBAUY, 1999)

As citocininas estão envolvidas em diferentes processos do desenvolvimento, como a divisão e diferenciação celular (SKOOG; MILLER, 1957), formação de gemas caulinares formação de cloroplastos (MOK; MOK, 2001). As citocininas promovem ainda o desestiolamento, a quebra da dominância apical e a interação planta-patógeno (HABERER; KIEBER, 2002). As citocininas têm seus principais centros produtores nas raízes das plantas, porém, outros tecidos meristemáticos, como ápices caulinares, também podem produzir citocininas, sendo isso evidenciado em vegetais que não possuem raízes (PERES, 2002).

Os hormônios ou reguladores de crescimento estão incluídos entre os fatores bioquímicos e são determinantes na aquisição de competência do explante, especialmente auxinas e citocininas, que controlam os principais eventos celulares. Esses hormônios são

essenciais para a regeneração de plantas *in vitro* (SKOOG; MILLER, 1957). Quando sintéticos, são chamados de reguladores de crescimento que, quando aplicadas à planta em quantidades diminutas, inibem ou modificam o crescimento ou o desenvolvimento (TORRES, 2000).

3 . MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

3.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES

3.1.1 Material Vegetal

Sementes de *Euphorbia heterophylla*, coletadas em lavouras de soja de Chopinzinho, região sudoeste do Paraná no ano de 2004, estas foram armazenadas em ambiente refrigerado a 6°C, em sacos plásticos, no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.1.2 Métodos

3.1.3 Desinfestação das sementes

A desinfestação das sementes foi obtida por imersão em etanol 70% (v/v) por 40 segundos, seguido por imersão em clorexidina a 4% (v/v) por 5 minutos e solução em Qboa® 2% diluída por 15 minutos, seguido de quatro banhos em água destilada estéril, em câmara de fluxo laminar.

Depois da desinfestação, as sementes foram acondicionadas em caixas acrílicas tipo Magenta® com os respectivos substratos, a razão de 10 sementes/caixa. (Figura 5).

3.1.4 Substratos para Germinação

Para otimizar a germinação das sementes de *E. heterophylla* foram comparados dois meios de cultura sólidos e um substrato com algodão.

Tratamento 1: O meio de cultura básico foi o MS, acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6g.L⁻¹ de ágar, preparado por dissolução dos componentes em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N antes da adição do ágar. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 120°C e 1atm e distribuído em caixas acrílicas esterilizadas, sendo 20 ml por caixa Magenta.

Tratamento 2: Meio de cultura básico MS com a metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2) e o mesmo procedimento do item a.

Tratamento 3: Foram autoclavadas caixas acrílicas contendo algodão umedecido com água destilada, e autoclavado por 20 minutos a 120°C e 1atm.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e dez repetições. Dez dias após o início dos tratamentos, avaliou-se a porcentagem de germinação, o peso fresco de plântulas, o número de folhas, o número de raízes secundárias e o comprimento da raiz principal. As médias, resultados de 2 ensaios, foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade com o programa ESTAT, Unesp Jaboticabal.

Experimento 2

3.2 CULTURA DE TECIDOS UTILIZANDO MATERIAIS JUVENIS DE EUPHORBIA HETEROPHYLLA

3.2.1 Material Vegetal

O material vegetal testado nestes experimentos foi obtido a partir de sementes germinadas *in vitro*, conforme o melhor resultado do primeiro experimento.

3.2.2 Preparo dos explantes

As plantas foram retiradas das caixas acrílicas e manipuladas sobre uma placa de petri esterilizada. Cada folha foi excisada em seis explantes, vertical e horizontalmente às nervuras. Os explantes foram colocados com a face adaxial em contato com os meios de cultura.

O hipocótilo e as raízes foram seccionados em fragmentos de 1 cm de comprimento e colocados nos meios de cultura, que compuseram os tratamentos descritos abaixo para todos os explantes. As placas de Petri (90X15 mm) foram seladas com filme plástico de polietileno e deixadas em sala de cultura com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

3.2.3 Meios de Cultura

Cinco meios com diferentes concentrações de reguladores vegetais, descritos na foram testados para regeneração. Meio de cultura básico MS com a metade das concentrações de sais e vitaminas, acrescido de 30 g.L^{-1} de sacarose e 6 g.L^{-1} de ágar, preparado por dissolução dos componentes em água destilada. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N antes da adição do ágar. O meio foi autoclavado e distribuído em placas de Petri esterilizada, sendo 20 mL por placa, os reguladores de crescimento foram adicionados ao meio antes da medida do pH. As diferentes concentrações de reguladores vegetais testados para regeneração de tecidos da *E. heterophylla* foram 1 mg.L^{-1} CIN + 0.1 mg.L^{-1} AIA, 0.5 mg.L^{-1} 2iP + 0.1 mg.L^{-1} AIA, 1 mg.L^{-1} 2iP + 0.1 mg.L^{-1} AIA, 1.5 mg.L^{-1} 2iP + 0.1 mg.L^{-1} AIA e 0.5 mg.L^{-1} 2iP.

As culturas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $9,75 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Os explantes foram deixados na sala de cultura por 30 dias.

Foram calculadas as porcentagens de explante com gemas, e número médio de gemas por explante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições por tratamento. Cada parcela foi constituída de uma placa de Petri contendo 6 explantes. Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

3.2.4 Enraizamento

Após 30 dias de cultura os brotos regenerados foram repicados para o meio MS/2, com 15 g.L^{-1} sacarose e pH ajustado para 5,8. Foram colocados 20mL de meio de cultura em cada caixa, sendo 5 brotos por caixa. Após 30 dias foi avaliada a porcentagem de enraizamento.

3.2.5 Aclimação

Plântulas enraizadas foram retiradas do meio de cultura, lavadas e transplantadas para potes plásticos com 10 cm de altura e de 7cm de diâmetro, contendo terra esterilizada por autoclavagem.

As plântulas permaneceram em uma mini-estufa coberta com plástico polietileno, saturada com água, pelo menos uma vez ao dia para manter a umidade. Após 15 dias o plástico foi removido e as plântulas permaneceram por mais uma semana nas condições de

laboratório sendo em seguida transferidas para casa-de-vegetação. Não foi realizada análise estatística, pois apenas um tratamento foi efetivo na regeneração de *E. heterophylla*

Experimento 3

3.3. EXPERIMENTO DE HERBICIDAS COM EXPLANTES RADICULARES

3.3.1 Material Vegetal

Utilizou-se a cultura de raízes obtida no experimento 2 a partir do teste de organogênese descrito anteriormente.

3.3.2 Métodos

Os explantes radiculares com 1 cm de comprimento foram inoculados em meio MS/2 acrescido de 15g/L de ágar e pH ajustado em 5,8 e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ 2iP + 0,1mg/L AIA e depois da autoclavagem do meio foram adicionados os herbicidas com i.a. fomesafen (Flex®), e imazaquin (Scepter®) e acondicionados em placas de Petri com 20 mL de meio cada.

As doses utilizadas foram 0; 1; 2; 4 e 8 vezes a dose recomendada pelo fabricante sendo que uma dose equivale a 0,8g.L⁻¹ de Scepter® e 4mL.L⁻¹ de Flex®

O material foi mantido em sala de cultivo em condições controladas de temperatura 25 ± 2°C e com fotoperíodo de 16h. Para cada tratamento foram realizadas 5 repetições com 6 explante em cada placa de petri. Realizou-se a avaliação após 30 dias de inoculação das raízes no meio com os herbicidas, sendo avaliado a massa fresca, comprimento da raiz

principal e número de ramificações. O experimento foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 5 repetições, composto cada unidade experimental por 1 placa de Petri e com 6 explantes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pela análise de regressão polinomial, utilizando-se o programa ESTAT (1992) Jaboticabal. Os gráficos e as equações foram feitos no programa Excel 2003.

4. RESULTADOS E DICUSSÃO

4.1 Germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*

No início ocorreram problemas com a dormência das sementes, como já descrito na literatura, então foram realizados alguns testes com concentrações variadas de cinetina, giberilina e nitrato de potássio, nos quais as sementes ficaram embebidas por dois dias, mas não houve germinação. Uma explicação para isso pode ser que no caso de *E. heterophylla*, ocorre a formação de mucilagem ao redor da semente durante a hidratação. Esta mucilagem pode constituir uma barreira de difusão do oxigênio, impedindo o suprimento deste gás no embrião (SUDA, 1997). Então as sementes foram armazenadas na geladeira a 6°C por 6 meses, e obteve-se germinação à 25°C.

A porcentagem de germinação foi maior no meio MS e MS/2 88% (Figura 1 B e C), em relação a germinação em algodão (Figura 1B), 38% (Tabela 1). Verificou-se que o substrato exerceu influência no desenvolvimento inicial das plântulas de leiteiro, indicando que a presença de água livre inibe a germinação de *E. heterophylla*, devido provavelmente a formação da mucilagem. Contrariamente aos resultados obtidos por COSTA e AYUB (2001) que obtiveram melhores resultados no substrato de algodão para calêndula. Os demais dados analisados, com exceção da altura de planta, não diferiram estatisticamente, apresentando médias superiores quando as plântulas germinaram em MS e MS/2 (Tabela 1). Conseqüentemente, o desenvolvimento inicial das plântulas respondeu aos nutrientes disponíveis nos meios MS e MS/2. Houve com o meio MS/2 um aumento de 20 % na massa em relação ao tratamento com algodão, que é um substrato desprovido de nutrientes. O ganho de massa observado é função da maior altura das plantas, do maior crescimento radicular, tanto no comprimento quanto no número de ramificações. Segundo COSTA e AYUB (2001) esta diferença pode ser explicada pela disponibilidade imediata do carbono da sacarose, e ao meio nutritivo utilizado na germinação, que contém a metade dos sais e vitaminas utilizadas para a cultura de tecidos na maioria das espécies estudadas. Os

resultados obtidos com o meio MS foram estatisticamente iguais aos do MS/2, isso se deve provavelmente ao fato desta espécie ter grande facilidade de desenvolvimento, não necessitando de uma alta quantidade de nutrientes para suprir suas necessidades.

Tabela 1. Germinação, Massa fresca, número e comprimento médio de raízes e altura de plântula de *Euphorbia heterophylla* após 10 dias em germinação no meio MS, MS/2 e algodão umedecido.

Substrato	Germinação	Massa Fresca	Nº médio	Comprimento	Altura	da
	%	Médio (g)	de raízes	médio de raízes	plântula (cm)	
				(cm)		
MS	86a	0,49a	12,8a	2,0a	5,5a	
MS/2	88a	0,55a	13,9a	2,0a	5,7a	
Algodão	38b	0,46b	2,5b	1,1b	4,6a	

As médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

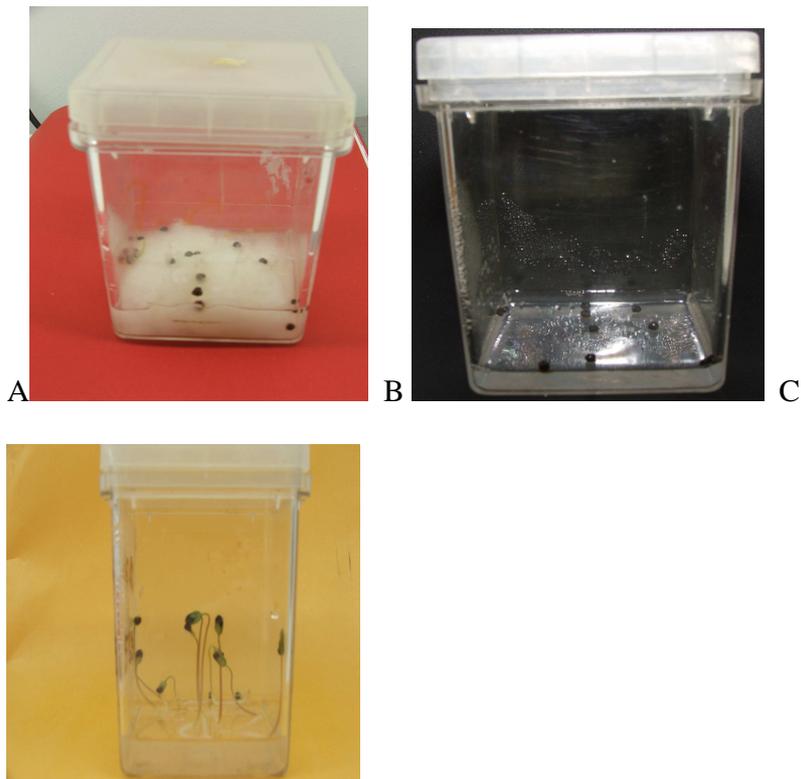


Figura 1. Sementes de *E. heterophylla* L. acondicionadas em algodão umedecido com água destilada (A), em meio de cultura básico MS/2 (B) e germinação em meio MS/2 (C).

4.2 Ensaio de Regeneração

O efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento acondicionados no meio MS/2 observou-se que a *E. heterophylla* não regenerou gemas a partir de explantes cotiledonares e radiculares em nenhum dos tratamentos testados (dados não mostrados).

Os explantes hipocotiledonares desenvolveram brotações (Figura 2A e B), no meio

MS/2 suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 2iP (Tabela 2). Os resultados evidenciaram um processo de morfogênese do tipo organogênese direta, sem a formação de calos (Figura 2A). Cinquenta por cento dos explantes hipocotiledonares regeneraram duas gemas em média. Gemas estas que após sua alongação foram enraizadas e aclimatadas em casa-de-vegetação (Figura 3 B). Esse resultado de organogênese direta se diferencia dos testes feitos por PRASAD e SATYASREE (1994), que tiveram a organogênese indireta da *E. heterophylla* na presença da auxina ANA, ou seja, tiveram as brotações passando pela fase de calos. Sem a formação de calos, que é uma fonte de variação somaclonal, a regeneração por via direta permite a transmissão de caracteres da planta que deu origem à célula, ao tecido ou ao órgão, ou seja, é mais interessante para estudos fisiológicos e morfogenéticos.

Tratamentos com AIA foram eficientes na formação de raízes para os explantes radiculares (Figura 2C) e hipocotiledonares o que confirma os resultados obtidos por PRASAD e SATYASREE, 1994, que utilizaram ANA para a indução da rizogênese. Embora existam espécies que formam raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, o que é o caso da *E. heterophylla*, do maracujá (RIBAS, 2000), geralmente é necessário adicionar auxina exógena para estimular a rizogênese (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O tratamento com cinetina também não foi eficiente para *E. heterophylla*, diferindo de trabalhos realizados com caqui (CARVALHO; BIASI, 2004), que não obteve diferenças entre resultados com 2 iP e cinetina. Tem sido aceito que a cinetina promove baixas taxas médias de regeneração de brotações, ou, então, em algumas espécies esse fitorregulador promove somente o alongamento de brotações, esses resultados foram confirmados em *Eucalyptus globulus* (TRINDADE., 1990), *Morus australis* (PATNAIK *et al.*, 1996) e *Cercis canadensis* (MACKAY *et al.*, 1995).

Os brotos regenerados não apresentaram deformações morfológicas como hiperhidricidade (ZIV, 1995), indicando que não houve efeito prejudicial dos reguladores de crescimento sobre os brotos regenerados (CURY, 2001), dos nutrientes, nem do conteúdo do ágar sobre a morfogênese (SAHER *et al.*, 2004).

As diferenças quanto à regeneração entre os diferentes explantes testados poderia ser explicado pelo gradiente interno de reguladores de crescimento, pelo grau de determinação dos tecidos, para responder a estímulos hormonais (TRAN THANH VAN, 1973). A alta capacidade de regeneração dos explantes jovens é explicada pela maior atividade metabólica e uma adequada concentração hormonal endógena (SKOOG; MILLER, 1957), como resultado de um equilíbrio entre as concentrações internas e as supridas externamente com o meio, além de uma interação com os nutrientes (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Tabela 2. Avaliação de diferentes concentrações do regulador de crescimento 2iP e CIN com ou sem AIA na regeneração de explantes hipocotiledonares de leiteiro.

Tratamento	Nº explantes	Nº explante/gema	Nº Gemas / explante (média)	Nº Brotos	Enraizadas	Aclimatadas
0.5mg/L 2iP	30	14	2	28	10	10
0.5mg/L 2iP + 0,1mg/L AIA	30	0	0	0	0	0
1,0mg/L 2iP + 0,1mg/L AIA	30	0	0	0	0	0
1.5mg/L 2iP + 0,1mg/L AIA	30	0	0	0	0	0
1mg/L CIN + 0.1mg/L AIA	30	0	0	0	0	0



Figura 2. A-B.Regeneração a partir de brotos e raízes a partir de explantes hipocotiledonares em meio MS/2. (C) regeneração de raízes a partir de explantes radiculares.

5.2.1 Enraizamento

Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam facilmente *in vitro* sob baixos níveis de auxina ou, simplesmente, em meio básico sem reguladores (ANDERSON, 1984; HASEGAWA, 1980). Tais informações corroboram com os resultados obtidos com *E. heterophylla*. A adição de auxinas não foi necessária para promover o enraizamento das plantas regeneradas, o que também foi observado em espécies de *Passiflora* (FREITAS,

1997, BIASI *et al.*; 2000). Contrariamente, PRASAD e SATYASREE (1994) utilizaram auxina para enraizamento de brotos de *E. heterophylla*, que também é essencial para o enraizamento das gemas oriundas de segmentos de folhas de urucum (ALMEIDA *et al.*, 1995) e o enraizamento de brotações de MOGNO (*Swietenia macrophylla* King) (LOPES, *et al.*, 2001).

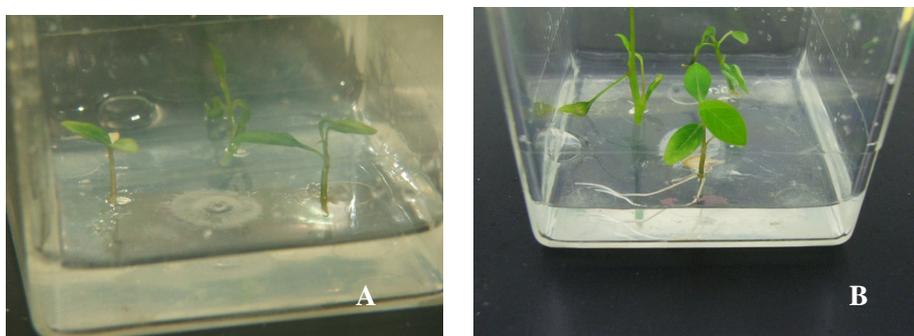


Figura 3. Enraizamento das plântulas em meio MS/2 sem a adição de hormônios (A) e plântulas enraizadas prontas para o transplantio (B).

5.2.2 Transplante e Aclimação

Esta etapa envolve a mudança de condições heterotróficas para autótrofas e a aclimação da planta nas condições de casa-de-vegetação (HARTMAN *et al.*, 1990).

Para o sucesso da aclimação não houve a necessidade de podar as raízes e nem eliminação de todas as folhas para garantir altas taxas de sobrevivência em plantas de *E. heterophylla* regeneradas *in vitro*, como sugerido para aclimação de maracujá por FARIA e SEGURA (1997b). A manutenção de alta umidade no plástico, como mostra a figura 4 foi essencial para o desenvolvimento e sobrevivência da plântula *ex vitro*, 100% das plantas enraizadas foram a aclimatadas.



Figura 4. Aclimação das plântulas enraizadas recém colocada na terra com a proteção do plástico (A) e após 10 dias aclimatando em ambiente de laboratório (B).

Experimento 3

4.3 TESTE DE HERBICIDAS

No Brasil, já estão documentadas nove espécies resistentes aos herbicidas, ou seja, leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), picão-preto (*Bidens pilosa* e *Bidens subalternans*), papuã (*Brachiaria plantaginea*), sagitária (*Sagittaria montevidensis*), capim-arroz (*Echinochloa* spp), junquinho (*Cyperus difformis*), milhã (*Digitaria* spp) e cuminho (*Fimbristylis miliacea*) (CORTEZ *et al.*, 2002; NOLDIN *et al.*, 1999), sendo que a maioria dos casos concentram-se na região centro-sul do país. Dessas, as espécies mais preocupantes são *E. heterophylla* e *Bidens* spp devido sua origem abranger a região Brasil-Paraguai (KISSMANN;GROTH, 1999), pela abundância das infestações e impacto econômico na agricultura nacional (WINKLER *et al.*, 2003). *E. heterophylla* e *Bidens* spp estão presentes em 74% e 77%, respectivamente, das áreas de soja na região do Planalto do Estado do Rio Grande do Sul (BIANCHI, 1996), e a tentativa de controle vem sendo realizada pela aplicação de herbicidas.

O herbicida Scepter® com ingrediente ativo imazaquin é bastante utilizado no controle de *E. heterophylla* sendo inibidor da enzima acetolacto sintase (ALS), essencial para a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, isoleucina e leucina. A paralisação na síntese dos aminoácidos leva a uma interrupção na divisão celular. Herbicidas desse grupo são no geral móveis tanto no xilema como no floema, podendo ser absorvidos e translocados a partir das folhas e também das raízes (HRAC, 2006; KISSMAN, 1999), o herbicida Flex® com i.a. fomesafen é inibidor da enzima protoporfirina oxidase, uma enzima que se encontra na rota de síntese de clorofila, catalisando a transformação de protoporfirina IX para protoporfirina IX, numa etapa precursora da síntese de clorofila. A inibição de protox impede a síntese de clorofila e leva a um acúmulo de protogen, que extravasa para o citoplasma, onde é convertido em proto

IX, pigmento fotodinâmico que liberam radicais de oxigênio altamente reativos, causando peroxidação de lipídios das membranas celulares, levando a sua ruptura. Herbicidas deste grupo são dependentes de luz (KISSMAN, 1999), via de regra aplicado sobre as folhas, porém, como a cultura racinar para estes testes foi conduzido sob luz, observou-se que ocorrem efeitos também sobre as raízes.

Ambos os ingredientes ativos fomesafen e imazaquin foram eficientes na inibição da regeneração de raízes para testes *in vitro*. Os resultados deste ensaio mostram que com o aumento da concentração dos herbicidas no meio de cultura, não houve desenvolvimento normal das raízes quando comparadas com a testemunha (Figura 5). Analisando-se os gráficos 1 e 2, verificou-se um efeito significativo das doses de herbicidas em relação ao comprimento da raiz principal, número de ramificações e biomassa. Todas as variáveis forneceram equações exponenciais, onde a presença de herbicida causa um decréscimo exponencial no desenvolvimento das raízes, exceto número de ramificações com herbicida Flex® que forneceu uma equação linear. A partir de 4 vezes a dose recomendada pelo fabricante, o desenvolvimento das raízes se mantém constante para todas as variáveis testadas.

Se faz necessário ensaios com sementes resistentes para a confirmação do uso destes herbicidas para testes de resistência *in vitro*, já que com sementes suscetíveis causou uma diminuição do desenvolvimento normal.

Não há outros trabalhos com testes de herbicidas desenvolvidos *in vitro* com plantas daninhas, o que dificulta a comparação e ou discussão dos mesmos, já que os outros são feitos *ex vitro* como já comentados na revisão.

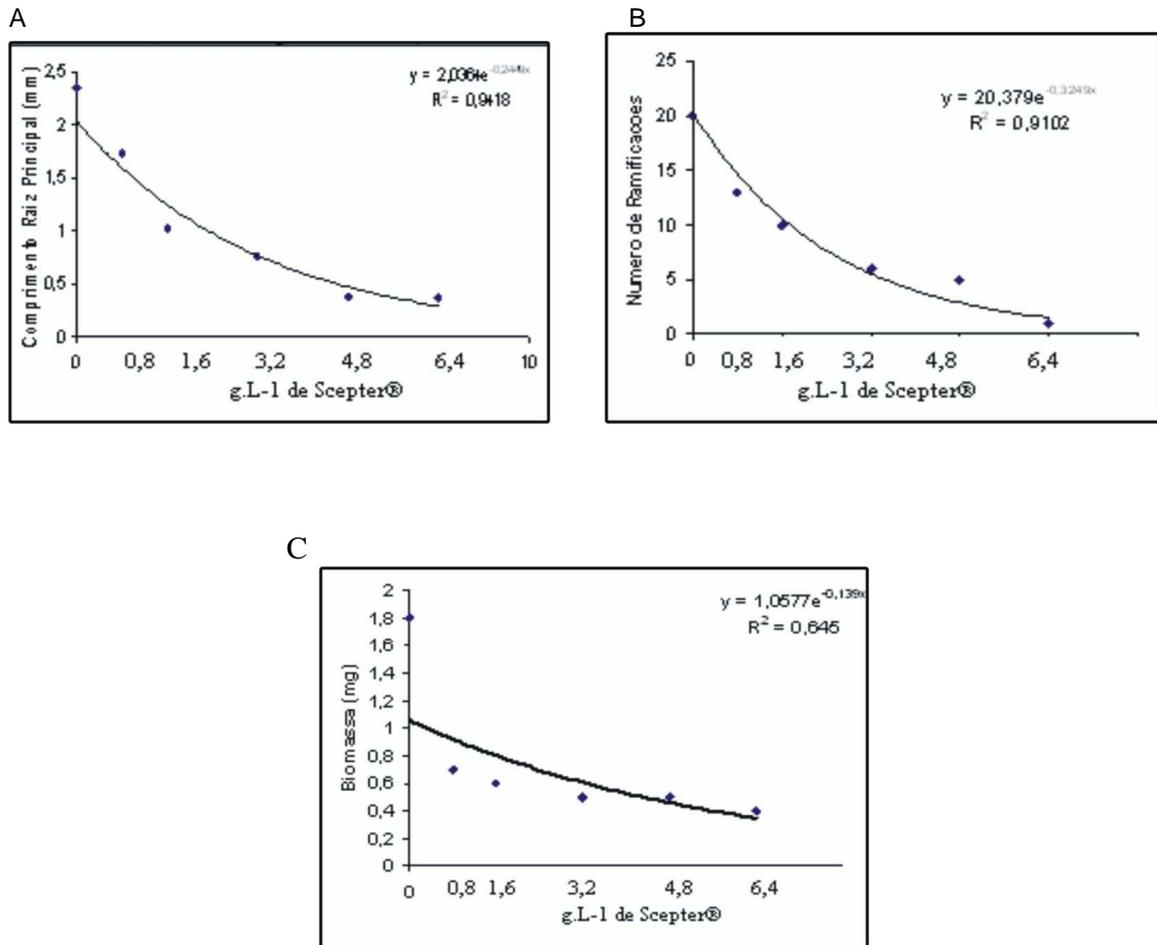
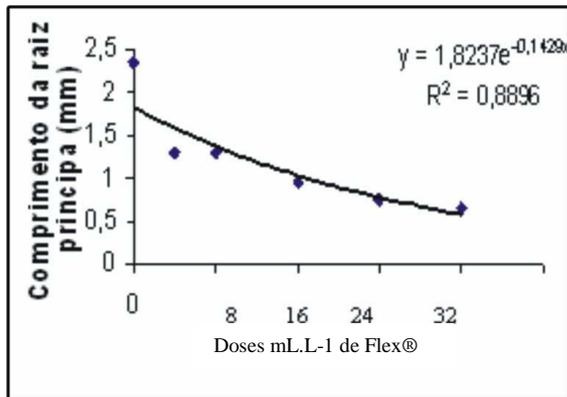
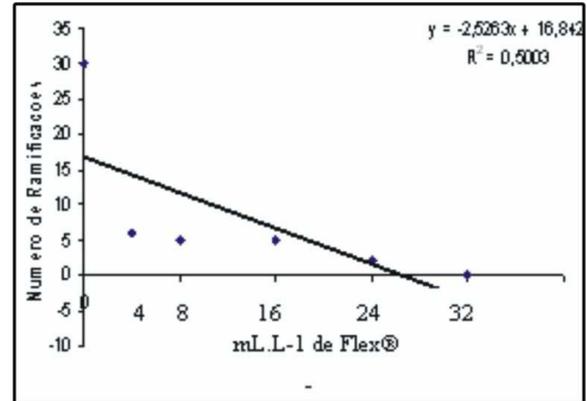


Gráfico 1. Efeito do herbicida Scepter® sobre crescimento de raiz principal (A), número ramificações de raízes (B) e biomassa de *E.heterophylla* cultivadas *in vitro*.

A



B



C

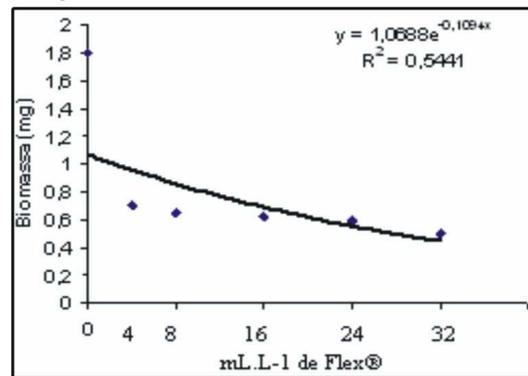


Gráfico 2. Efeito do herbicida Flex® sobre crescimento de raiz principal (A), ramificações de raízes (B) e biomassa de *E. heterophylla* cultivadas *in vitro*.



Figura 5: Comparação de crescimento de explantes radiculares no meio sem herbicidas (A) e com herbicida Flex® (B).

6. CONCLUSÕES

A análise e interpretações dos resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

1. O melhor tratamento para germinação *in vitro* de sementes de *E. heterophylla* L. é o meio de cultura MS com a metade da concentração de sais e vitaminas (MS/2).

2. A regeneração de *E. heterophylla* é obtida a partir de explante hipocotiledonar em meio MS/2 suplementado com 0,5 mg/L 2iP.

2.1. Pode se obter raízes a partir dos explantes radiculares e hipocotiledonares em meio com 0,5mg/L 2iP + 0,1mg/L AIA.

2.2. Não foi possível obter nenhum tipo de regeneração a partir de explantes cotiledonares.

3. Os resultados obtidos apontam para a possibilidade de comprovação da resistência pelas de ensaios *in vitro*, pois ocorreu um retardo no desenvolvimento normal das raízes, com as doses testadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA J. L.; ALMEIDA F.C. G.; NUNES R.P. ; ALMEIDA F.A.G. Indução de enraizamento na micropropagação do urucueiro **Revista Faculdade Agronomia**. Maracay v. 2, p.129-135. 1995.

ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American Society Horticulture Science**, v.109, p.343-347, 1984.

ASCENCIO, J. Root secreted acid phosphates kinetics as a physiological marker for phosphorus deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, v.20, p. 9-26. 1997.

AZMI A.; NOIN M.; LANDRÉ P.; PROUTEAU M. ; BOUDET A. M. ; CHIRQUI D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulos* Labilll. Hypocoltails: ontogenesis and level of the regenerates. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.51, n.1, p.9-16, Jan. 1997.

BACCHI, O.; LEITAO FILHO, H de F.; ARANHA, C. **Plantas invasoras de culturas**. Vol. 3 Ed Unicamp, Campinas. p 598-906, 1984.

BANNON, J.S.; BAKER, J.B e ROGERS, R.L. Germination of wild poisenttia (*euphorbia heterophylla*). **Weed Science**, v. 26, p. 221-225, 1978.

BARRETO, R.W. & EVANS, H.C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hierta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. **Mycopathologia**, v.141, p. 21-36. 1998.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. V. 2, **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, 375p., 1982.

BIANCHI, M. A. Programa de difusão do manejo integrado de plantas daninhas em soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 23, Porto Alegre, RS. **Ata e Resumos**. Porto Alegre. UFRGS, 125 p. 1996.

BIASI, L. A.; FALCO, M. C.; RODRIGUEZ, A. P. M.; MENDES, B. M. J. Organogenesis from internodal segments of yellow passion fruit. *Scientia Agrícola*, v. 57, n.4, p. 661-665, out/dez. 2000.

BRECKE, B.J., TOBOLA, P. Growth and development of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) sections in peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Science**, v. 44, p. 575-578, 1996.

BRECKE, B.J. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) germination and emergence. **Weed Science**, v.43, p. 103-106, 1995.

BRIDGES, D. C. BRECKE, B. J.; BARBOUR, J. C. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) interference with peanut. **Weed Science**, v.40, p.37-42. 1992.

CARVALHO D.C.; BIASI L.A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, set-out, 2004

CORTEZ, M. G.; MADUREIRA, A.; OVEJERO, R. L. Resistência de *Digitaria* spp a herbicidas inibidores da ACCase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23, 2002, Gramado. **Anais** Londrina: SBCPD, p. 191, 2002.

COSTA, C. M.; AYUB, R. A. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Calendula officinalis* germinadas *in vitro* com substrato de algodão ou de meio MS. **Revista Ceres**, 48, (279), 609 - 613, 2001.

COSTA, O. M. M. Morfologia e Desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla* L. **Agronomia Sulrigrandense**, v.18, p.59-66. 1982.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1262 p., 1981.

CURUK, S.; ELMAN, C.; SCHLARMAN, O.; SHOMER, I.; CETINER, S.; GRAY, D.J.; GABA, V. A novel pathway for rapid regeneratin from the proximal zne of the hypocotyls of melon (*Cucumis melo* L.) **In vitro Cellular and Development Biology-Plant** v.38, n.3, p.260-267, June 2002.

CURY, R.; CASSELLS, A.C. Oxidative stress and physiological, epigenetic and variability in plant tissue culture: implications for micropopagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 64, n. 2/3, p. 145-157, Jan. 2001.

DOROTHY W. S.; WEATHERWAX P.; McCLUNG L. S. Antibacterial substances from plants collected in Indiana. Indiana University, Botanical and Bacteriological Laboratories, Bloomington, Indiana.v.6, 2006.

DROUAL, A. M.; HAMDI, S.; CRECHE, J.; KEVERS, C.; RIDEAU, M. Autonomy to plant growth regulators and gene expression in Periwinkle culture '*in vitro*'. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.153, n. 5/6, p.623-630, Nov. 1980.

EARLE, F. R.; McGUIRE, T. A. ; MALLAN, J. ; BAGBY, M. O. ; WOLFF, L.A. Search for new industry oils. II Oils with high iodine values. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.37, p.48-50. 1960.

EGUNJOBI, J. K., KUPOLUYI, A.O. Biology and control of *Euphorbia heterophylla* L. In: **Porceedings of the Third Nigerian Weed Science Group Meeting**, Sumaru, Nigeria, p. 42-46, 1973.

ESTAT 2.0 Sistema de análise estatística. Jaboticabal: Pólo Computacional - Departamento de Ciências Exatas – UNESP, 1992.

ESTRUCH, J.J.; PRINSEN, E.; SPENA, A. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. **Science**, v. 254, p 1364-1367, 1991.

FALODUN A., OKUNROBO L.O., UZOAMAKA Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae). **Academic Journals**, 2006 Disponível em <http://www.academicjournals.org/AJB>, acesso em 20/05/2006.

FARIA, J. L. C. , SEGURA, J. Micropropagation of yellow passion fruit by auxiliary bud proliferation. **HortScience**, v. 32, n.7, p. 1276-1277, 1997b.

FREITAS, I.M.N. Micropropagação *in vitro* de maracujazeiro. **Actas de Horticultura**. Vilamoura, v.18, p.103-106, 1997.

GARRIDO, L. da R.; DHINGRA, O. D. Weed species as potential reservoir hosts of *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* **Fitopatologia Brasileira**, n.22, p. 108-110. 1997.

GARZON, A., LAZO, J.V. Phenological characterization of populations of *Euphorbia heterophylla* L. and *Rottboellia exaltata* Lf. Potentially resistant to S-triazines herbicides and urea derivatives. **Anais de Botânica Agrícola**, v. 3, p.5-21. 1996.

GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; MACIEL, C. D. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; ADEGAS, F. S.; VOLL, E. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima ALS. **Planta Daninha**, Botucatu. v. 16, n. 2, p. 117-125, 1998.

GELMINI, G. A.; FILHO, R. V.; SOARES NOVO, M. C. S.; ADORYAN, M. L. Resistência de Biótipos de *Euphorbia heterophylla* L. aos Inibidores da enzima ALS utilizados na cultura de soja. **Bragantia**, Campinas, v.60, n. 2, p.93-99, 2001.

GRAHAM, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S. & FARNSWORTH, N. R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p.347-377. 2000.

GUSMAN, A.B.; MUCILLO, G., PIRES, M.H. Efeito do citronelol sobre germinação e desenvolvimento do amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.). **Semina**, v. 11, p. 20-24. 1990.

HARBERER G.; KIEBER, J.J. Cytocinins. New insights into a classic phytohormone. **Plant Physiology**, v. 128, p.354-362, 2002.

HARTMAN, T. H; KESTER, D. E; DAVIS, F. T. **Plant propagation; principles and practices**. Englewood Cliffs, New Jersey, 5 ed, p.647, 1990.

HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.105, p.216-220, 1980
HEAP, I. **International survey of herbicide-resistant weeds**. Disponível em: <<http://www.weedscience.com>>. Acesso em 20 maio 2006.

HICKS, G. S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **Botanical Review**, New York, v.46, p. 1-23, 1980.

HOLT, JS.; POWLES, S.B. & HOLTUM, J.A.M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. V.44, p.203-229. 1993.

HRAC Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas, disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/> acesso em julho de 2006.

KARIM, F. M. New records of the flora of the United-Arab-Emirates. **Arab Gulf Journal of Scientific Research**, v.10, p.105-115.1992.

KERBAUY, G. B. Plant regeneraton of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) by means of root tip culture. **Plant Cell Reports**, v.3, p.27-29, 1984.

KIGEL, J.; LIOR, E.; ZAMIR, L. & RUBIN, B. Biology of reproduction in the Summer annual weed *Euphorbia geniculata* Ortega. **Weed research**, v.32 p. 317-328. 1992.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo, *Basf Brasileira*, 1999. v.2, 978p.

LALONDE, L.; FOUNTAIN, D. W.; KERMODE, A.; OUELETTE, F. B.; SCOTT, K.; BEWLEY, J. D.; GIFFORD, D. J.. A comparative study of the insoluble storage proteins and the lectins of seeds of the Euphobiaceae. **Canadian Journal of Botany**, v.62 p.1671-1677. 1984.

LANDA, F.S.L. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LEAL, C.B.F. **Floração em *Euphorbia heterophylla* L.** Tese de mestrado Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 68p. 1995.

LOPES S. C., LAMEIRA O. A., FORTES G. R. L., NOGUEIRA R. C. , PINTO J.E.Enraizamento *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). **CERNE**, v7, n1, p124-128, 2001.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil, Terrestres Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. 3ª ed., Instituto Plantrum, Nova Odessa, 640p. 2000.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil, Terrestres Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. 3ª ed., Instituto Plantrum, Nova Odessa, 640p. 2000.

MACKAY, W. A.; TIPTON, J. L.; THOMPSON, G.A. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis canadensis* var. *mexicana*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 43, p. 295-299, 1995.

MATIELLO, R.R.; RONZELI JÚNIOR, P.; PURÍSSIMO, C. Mecanismos de resistência: fatores biológicos, agrônômicos e genéticos. In: CURSO DE MANEJO DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS AOS HERBICIDAS, 2., 1999, Ponta Grossa. **Anais manejo de plantas daninhas** Ponta Grossa: AECG, p.27-40. 1999.

MOK, D.W.S; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 52, p.89-118, 2001.

MOORE, J.D.; BANKS, P.A. & PINNELL-ALISON, C.L. Wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control in peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed science**, v.38, p.536-540.1990.

MORELAND, D.E. Mechanisms of action of herbicides. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p. 597-638. 1980.

NOLDIN, J. A.; EBEHERDT, D. S.; KNOBLAUCH, R. Resistência à herbicidas em *Sagittaria montevidensis*: primeiras evidências. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 1., 1999, Pelotas. **Anais**. Pelotas: Embrapa, p. 566-567,1999.

NSIMBA-LUBAKI, M.; PEUMANS, W. J. E CARLIER, A.R. Isolation and partial characterization of a lectin from *Euphorbia heterophylla* seeds. **Biochemical Journal**, v. 215, p.141-145. 1983.

PATNAIK, J.; DEBATA, B. K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. **Plant Cell Report**, v. 15, p. 427-430, 1996.

PERES, L. A. REGENERAÇÃO DE PLANTAS IN VITRO **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, março/abril, p.44-48, 2002.

PERES, L.E.P. Bases Fisiológicas e genéticas de regeneração de plantas *in vitro*. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root excision changes the endogenous auxin-to-cytocinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catsetum fimbriatum* Lind. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v.18, p.1002-1006, 1999.

PIERIK, R.L.M. **In vitro Culture of Higher Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348 p. 1997.

PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogenica em micro-tomateiro.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PINTO, S.B.; PANIZZI, A. R. Performance of nymphal and results *Euschistus heros* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.23, p.549-555. 1994.

PRASAD, M. N. V. & SATYASREE, J.G. Alpha-naphthalene acetic-acid regulated anthocyanins, polyphenols and associated enzymes in *Euphorbia heterophylla* L. seedlings explants cultures. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.3, p.69-72. 1994.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular Development Biology-Plant**, Gaithersburg, v.38, n.2, p.116-124, april 2002.

RIBAS, A.L., **Estudos Sobre Cultura de Tecidos do Maracujá Amarelo** (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG.) Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

RIZK, A. M.; HAMMOUDA, F. M.; SEIF EL-NASR, M. M. E EL-MISSIRY, M. M. Constituents of Egyptian Euphorbiaceae. **Die Pharmazie**. v.33, p.540-541. 1978.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhidricity in micropropagated carnation shoot: the role oxidative stress. **Physiologia Plantarum, Denmark**, v. 120, n.1, p. 152-161, Jan. 2004.

SIVB, Terminology Associated with Cell, Tissue and Organ Culture, Molecular Biology and Molecular Genetics. Acesso em http://www.sivb.org/edu_terminology.asp, acesso em 25/08/2006.

SILVA, S. I. e SALATINO, A. Fatty acids composition and potential use of some seed oil of the Euphorbiaceae in dry Forest (Brazil). **XVI International Botanic Congress (Abstracts)**. St. Louis, p 688. 1999.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues culture *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. Cambridge, v.11, p.118-140, 1957.

SUDA, C.N.K. **Sementes de *Euphorbia heterophylla* L.:** ocorrência de polimorfismo e controle da germinação. Tese de mestrado Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 141p., 1991.

SUDA, C.N.K.; GIORDINI, J.F.. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development off *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.226-245. 2000.

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F.; GUSMAN, A.B. Ação inibidora do CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico) sobre a germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. **Acta Botanica Brasileira** v.2, n.1, p.97-102, 1989.

SUDA, C.N.K; PEREIRA, M.F.D.A. Sensibilidade à luz de sementes de *Euphorbia heterophylla* L. durante a germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.61-66. 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TANJI, A.; TALEB, A.. New weed species recently introduced in Morocco. **Weeds Research**, v.37, p27-31. 1997.

TAO, R.; DANDEKAR, A. M.; URATSU, S. L.; VAIL, P. V.; TEBBETS, J. S. Engineering genetic resistance against insects in Japanese Persimmon using the crystal gene of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 122, n. 6, p. 764-771, 1997.

TORRES, A. C. **Glossário de Biotecnologia Vegetal, Brasília: Embrapa Hortaliças**, 128p, 2000.

TORRES, C.A., CALDAS, LS., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPH, 598 p.1998.

TRAN THANH VAN; M. Direct Flower Neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, Berlin, v. 115, p. 87-92, 1973.

TRINDADE, H. The role of cytokinin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Australian Forestry**, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.

TRIPATHI, R. D. E TIWARI, K. P. Geniculatun, a triterpenoid saponium from *Euphorbia geniculata*. **Phytochemistry**, v.19,p.2163-2166. 1980.

VALARINI, P.J.; FRIGHETTO, R.T.S. & SPADOTTO, C.A. Potencial de uso da erva medicinal *Cytopogon citratus* no controle de fitopatógenos do feijoeiro e plantas daninhas em áreas irrigadas. **Cientifica**. v. 24, p. 199-214. 1996.

VALVERDE, B.E.; RICHES, C.R. & CASELEY, J.C. 2000. **Prevention and management of herbicide resistant weeds in rice: experiences from Central América with *Echinochloa colona***.1ª ed, Cámara de Insumos Agropecuarios de Costa Rica, San José, Costa Rica, 123p.

VAMSIDHARA,B, A. HABEEB MOHAMMEDA, B. NATARAJC,D, C. MADHUSUDANA RAOC,D, MULLANGI RAMESHC, Antinociceptive activity of *Euphorbia heterophylla* roots. **Fitoterapia** v.71 p.562-563, 2000.

VARGAS, L.; BORÉM, A.; SILVA, A.A. Técnica de cruzamentos controlados em *Euphorbia heterophylla* L. **Bragantia**, v.58, p.23-27. 1999.

VIDAL, R. A.; MEROTTO JÚNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 152 p. 2001.

VIDAL, R.A., WINKLER, L.M. Resistência de plantas daninhas: seleção ou indução à mutação pelos herbicidas inibidores de acetolactato (ALS). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, p. 31-42, 2002.

VIDAL, R.A.; TREZZI, M.M. Desenvolvimento comparativo entre biótipos de leiteira (*Euphorbia heterophylla*). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5. p.22-26. 1999.

WACHOWICS, C.M. 1991. **Desenvolvimento foliar e crescimento em *Euphorbia heterophylla* L.** Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 77p.

WILLARD, T. S.; GRIFFIN, J. L. Soybean (*Glycine max*) yield and quality responses associated with wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) control programs. **Weed Technology**, v.7, p.118-122. 1993a.

WILLARD, T. S.; GRIFFIN, J. L. Growth response of wild poinsettia (*Euphorbia heterophylla*) following foliar herbicide applications. **Weed Technology**, v.7, p.190-195. 1993b.

WILSON, A:K: *Euphorbia heterophylla*: a review of distribution, importance and control. **Tropical Pest Management**, v.27, n.1, p.32-38, 1981.

WINKLER, L.M., VIDAL, R.V., NETO, J.F.B., Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase, **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, set 2003.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRITIE, J.; KOZAI, T.; LILA SMITH, M. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 493-516, 1995.