

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO, CURVA
DE CRESCIMENTO DE CALOS E
ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM *Rudgea
viburnoides* (CHAM.) BENTH.**

MARVIN GERARDO OLIVAS BONILLA

2002

MARVIN GERARDO OLIVAS BONILLA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO, CURVA DE CRESCIMENTO DE
CALOS E ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM *Rudgea viburnoides*
(Cham.) Benth.

Teşe apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para obtenção do título de
"Doutor".

Orientador

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL



Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Bonilla, Marvin Gerardo Olivas

Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth / Marvin Gerardo Olivas Bonilla. -- Lavras : UFLA, 2002.

162 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Calogênese. 3. Planta medicinal. 4. *Rudgea viburnoides*. 5. Fitoquímica. 6. Cerrado. I. Universidade Federal de Lavras. II.

Título.

CDD-615.32

-633.88352

MARVIN GERARDO OLIVAS BONILLA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, INDUÇÃO E CURVA DE CRESCIMENTO
DE CALOS E ABORDAGEM FITOQUÍMICA EM *Rudgea viburnoides*
(Cham.) Benth.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agronomia, área de concentração
Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 12 de abril de 2002

Prof.ª. Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Prof.ª. Dra. Dulcinéia de Carvalho

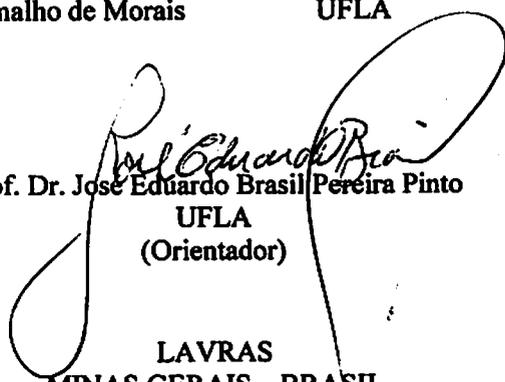
UFLA

Pesq. Dr. Osmar Alves Lameira

EMBRPA/ Amazônia Oriental

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes

UFLA



Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

À minha mãe, Anita (*in memoriam*),
que sempre confiou em mim
e foi um exemplo de perseverança,
com todo meu amor,

DEDICO

Ao meu pai, Guillermo,
O qual me deu esta magnífica oportunidade,
apesar de tê-la acompanhado a distância
Aos meus irmãos, Cecília, Connie, Guillermo, Roberto e Álvaro,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS Onipotente e Onipresente, meu Refúgio, minha Fortaleza.

Á minha amada mãe, por todas sua preces, por sua dignidade, bondade, amor e fé de que um dia tudo será melhor.

Aos meus irmãos, Cecília, Connie, Guillermo, Roberto e Álvaro e suas famílias, que mesmo a distância sempre participaram de uma forma ou de outra da minha caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, por toda sua ajuda, amizade, confiança e exemplos.

Á minha co-orientadora, Prof^a Maria das Graças Cardoso, por sua amizade, confiança, incentivo, disposição tendo sempre palavras de alento.

Ao Prof. Manuel Losada Gavilanes, por sua orientação e indicação da planta com a qual iria trabalhar.

Ao professor Dr. Augusto Ramalho de Moraes, à professora Dr^a Dulcinéia de Carvalho e ao pesquisador Dr. Osmar Alves Lameira, pela participação na banca examinadora e pelas valiosas sugestões.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Química, Luciano, Fábio, Vanisse, Priscila, Thaísa, Wellington, pela amizade e ajuda na parte experimental.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, em especial a Valéria, Ricardo, Gabriela, pela amizade.

Ao Evaldo, Vantuil e Claret, técnicos dos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais, por toda sua ajuda e disposição.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, Andréa, Grécia, Ana Carolina, Ana Paula, Rozane, Suzan, Marly, Fabiano, Evaristo, por seu companheirismo e amizade.

Aos amigos Flávio e Elda, por toda sua ajuda, amizade, compreensão, paciência e companheirismo.

À família Lima, em especial a Marluce (a mãe), por toda sua ajuda, incentivo e apoio nos momentos críticos.

À família Tosta, em especial a Dona Carmocina, Sr. Oakes e Lia, por toda ajuda, incentivo, amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de Cáceres – MT, em especial a Ana Lúcia, Marta, Geni, Chico, Maria Elisa, Francesco, Diego, Adervaldo, por todo o carinho, amizade e apoio em todos os momentos.

À Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, por esta grandiosa oportunidade de qualificar-me.

À CAPES/PICDT, pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que de uma forma ou outra, contribuíram para que eu pudesse trilhar meu caminho, acompanhando-me nesta etapa da minha vida

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução Geral.....	05
2 Referencial Teórico.....	05
2.1 Aspectos taxonômicos e descrição botânica da espécie em estudo.....	05
3 Referências Bibliográficas.....	08
CAPÍTULO 2: Micropropagação de <i>Rudgea viburnoides</i>	11
1 Resumo.....	11
2 Abstract.....	12
3 Introdução.....	13
4 Referencial Teórico.....	13
4.1 Cultura de tecidos.....	13
4.1.1 Micropropagação.....	14
4.2 Plantas lenhosa x micropropagação.....	15
4.3 Indução de brotação múltipla e enraizamento de plantas lenhosas medicinais.....	15
5 Material e Métodos.....	31
5.1 Estabelecimento da cultura “in vitro”.....	31
5.1.1 Procedência das sementes.....	31
5.1.2 Desinfestação das sementes.....	31
5.1.3 Excisão do embrião.....	31
5.2 Efeito do BAP adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de brotações múltiplas em segmentos nodais de <i>Rudgea viburnoides</i>	32
5.3 Efeito do AIB adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de enraizamento em brotações de <i>Rudgea viburnoides</i>	33
6 Resultados e Discussão.....	34
6.1 Efeito do BAP adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de brotações múltiplas em segmentos nodais de <i>Rudgea viburnoides</i>	34
6.2 Efeito do AIB adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de enraizamento em brotações de <i>Rudgea viburnoides</i>	56
7 Conclusões.....	70
8 Referências Bibliográficas.....	70
CAPÍTULO 3: Indução de calos e estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Rudgea viburnoides</i>	78

1 Resumo.....	78
2 Abstract.....	79
3 Introdução.....	80
4 Referencial Teórico.....	81
4.1 Cultura de calos.....	81
4.2 Indução de calos em explantes foliares e caulinares com diferentes reguladores de crescimento em plantas lenhosas medicinais.....	82
4.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos.....	86
5 Material e Métodos.....	88
5.1 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de <i>Rudgea viburnoides</i>	88
5.2 Efeito do 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes foliares de <i>Rudgea viburnoides</i>	89
5.3 Efeito do 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes caulinares de <i>Rudgea viburnoides</i>	90
5.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Rudgea viburnoides</i>	91
6 Resultados e Discussão.....	91
6.1 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de <i>Rudgea viburnoides</i>	91
6.2 Efeito do 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes foliares de <i>Rudgea viburnoides</i>	102
6.3 Efeito do 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes caulinares de <i>Rudgea viburnoides</i>	109
6.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>Rudgea viburnoides</i>	119
7 Conclusões.....	122
8 Referências Bibliográficas.....	123

CAPÍTULO 4: Extração e identificação de princípio ativo de *Rudgea viburnoides* em material vegetal *in vivo*..

1 Resumo.....	126
2 Abstract.....	127
3 Introdução.....	128
4 Referencial Teórico.....	129
4.1 Metabólitos primários e secundários.....	129
4.1.1 Biossíntese de metabólitos secundários.....	130
4.1.2 Metabólitos secundários <i>in vivo</i>	130
4.1.3 Metabólitos secundários <i>in vitro</i>	131
4.2 Alcalóides.....	132
4.3 Flavonóides.....	133
4.4 Taninos.....	134

4.5 Análise e determinação química.....	136
4.6 Extração, separação e identificação de princípio ativo em material vegetal e calos de <i>Rudgea viburnoides</i>	138
5 Material e Métodos.....	142
5.1 Coleta do material.....	142
5.2 Obtenção dos extratos.....	142
5.3 Avaliação fitoquímica.....	144
6 Resultados e Discussão.....	147
7 Conclusões.....	157
8 Considerações Gerais.....	158
9 Referências Bibliográficas.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA = ácido indol acético;

AIB = ácido indol butírico;

ANA = ácido naftaleno acético;

BAP = 6-benzilaminopurina;

CCD = cromatografia de camada delgada;

CG/EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência;

CLC = cromatografia líquida de coluna;

CHN = carbono, hidrogênio e nitrogênio;

DKW = Driver & Kuniyuki (1984);

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético;

2iP = N-isopentenilaminopurina;

EM = espectrometria de massa;

GA₃ = ácido giberélico;

IV = infravermelho

KIN = cinetina;

MS = Murashige & Skoog (1962);

MS/2 = metade da força do meio MS;

pH = concentração de hidrogênio;

R_f = índice ou fator de retenção

RMN¹³C = ressonância magnética de carbono-13;

RMN¹H = ressonância magnética de hidrogênio ou próton

SH = Schink & Hildebrandt (1972);

TDZ = thidiazuron;

UV = ultravioleta;

WPM = Wood Plant Médium (Lloyd & Mc Cown, 1981);

RESUMO

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Lavras: UFLA, 2002. 162. (Tesc – Doutorado em Fitotecnia).*

O uso da fitoterapia remonta aos primórdios da humanidade, presente sempre no saber popular das mais antigas civilizações. No decorrer da história, os sistemas médicos lançaram mão quase que exclusivamente das plantas medicinais, até o explosivo desenvolvimento dos medicamentos sintéticos. No entanto, assiste-se atualmente a uma revalorização das plantas medicinais. *Rudgea viburnoides*, é uma planta do cerrado, considerada medicinal e sobre a qual não existem relatos na literatura sobre a sua micropropagação. Neste trabalho foi estudada a multiplicação da espécie através de segmentos nodais, a indução de calos e sua curva de crescimento bem como a identificação de princípios ativos de material vegetal *in vitro* e *in vivo*. O melhor meio para indução de brotações múltiplas foi o WPM suplementado com $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. O enraizamento foi alcançado em meio WPM, adicionado de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA. Na indução de calos a partir de explantes foliares e caulinares o melhor tratamento foi o de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, no escuro e na luz respectivamente. A curva de crescimento de calos mantidos em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e mantidos no escuro apresentou padrão sigmóide com cinco fases de crescimento distintas, num período de 56 dias. O maior crescimento dos calos ocorreu no 48º dia após a inoculação. Três substâncias foram identificadas e purificadas dos extratos das folhas, do caule e da raiz. Identificou-se uma substância altamente polar de ponto de decomposição de $46 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, solúvel em metanol, ácido acético e H_2O , provavelmente um açúcar. Por meio das análises de CG/MS, verificou-se a similaridade entre os compostos isolados do caule e da raiz, identificados como óxido de cariofileno com PM de 253 g/mol . Este apresentou características com cristais com ponto de fusão de $220 - 230$ e $218 - 230 \text{ }^\circ\text{C}$, solubilidade em metanol e as características espectrais no IV (KBr cm^{-1}) $3500 - 3000$; $1610 - 1608$; $1400 - 1380$ e $1053 - 1026$.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador),
Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA.

ABSTRACT

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. *In vitro* propagation, callus induction and phytochemical approach in *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Lavras: UFLA, 2002. 162. (Thesis – Ph.D. in Crop Science).*

Use of phytotherapy traces back to the beginnings of mankind, present always in the folklore of the most ancient civilizations. Over History, the medical systems make use of almost exclusively of the medicinal plants until the explosive development of synthetic medicines. Nevertheless, we watch at present to a valorization of medicinal plants. *Rudgea viburnoides* is a cerrado (savanna) plant, regarded as medicinal and about which there are no reports in the literature about its micropropagation. In this work, the multiplication of the species through nodal segments, callus induction and its growth curve as well as the identification of active principles of plant material, both *in vitro* and *in vivo*. The best medium for inducing multiple shoots was WPM supplemented with 4.0 mg.L⁻¹ of BAP. Rooting was reached in WPM medium, added with 0.5 mg.L⁻¹ of IBA. In callus induction from leaf and stem explants the best treatment was that of 1.0 mg.L⁻¹ and 0.1 mg.L⁻¹ in dark and light, respectively. The growth curve of calluses maintained in MS medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D and kept in dark presented a sigmoid pattern with five distinct growth phases, over a period of 56 days. The greatest callus growth took place on the 48th after inoculation. Three substances were identified and purified from the extracts of leaves, stems and roots. A highly polar substance of decomposing point of 46 ± °C, soluble in methanol, acetic acid and H₂O, probably a sugar was identified. By means of the analysis of GC/MS, the similarity among the compounds isolated from the stem and root, identified as karyophylen acid with a MW of 253 g/mol. This one presented characteristics with a fusion point 220 – 230 and 218 – 230 °C, solubility in methanol and spectral characteristics at IV (KBr cm⁻¹) 3500 – 3000, 1610 – 1608, 1400 – 1380 and 1053 – 1026.

* Guidance Committee: Jose Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso da fitoterapia remonta aos primórdios da humanidade, estando presente sempre no saber popular das mais antigas civilizações. Esse conhecimento originou-se de tentativa, erros ou por acaso e, às vezes é resultado da imitação do comportamento dos animais silvestres ou domésticos.

Há pouco tempo foi documentada a seleção de espécies vegetais terapêuticas efetuada por chimpanzés e que permitiu o isolamento de diversas substâncias, entre as quais a Tiarubrina A, um importante antibiótico isolado da planta *Aspilia mossambicencins*, consumida por chimpanzés com propósitos antihelmínticos, sendo recentemente, comprovada sua propriedade anticancerígena (Root-Bernstein & Root-Bernstein, 1998).

Durante muitos séculos, os médicos lançaram mão principalmente das plantas medicinais que, às vezes constituíam o único recurso disponível para o tratamento de seus pacientes (Trindade & Sartorio, 1999). Estratégia estas que fazia parte da prática diária dos médicos até o explosivo desenvolvimento dos medicamentos sintéticos, que ocorreu um pouco depois da Segunda Guerra Mundial (Gilbert et al., 1997).

Nos dias atuais, assiste-se a um fenômeno um tanto inusitado: a intensificação do uso de plantas medicinais; comportamento estes não mais limitado às populações dos países subdesenvolvidos (Gottlieb & Kaplan, 1993). Para Gilbert et al. (1997), esse ressurgimento deriva como contrapartida do aparente aumento da resistência microbiana a alguns produtos sintéticos, aos efeitos colaterais, bem como ao maior preço das drogas sintéticas, quando comparadas com a maioria dos análogos derivados naturalmente.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam principalmente medicamentos tradicionais para suprir suas necessidades primárias de saúde e 85% desses envolvem o uso de plantas e, desse total, pelo menos 30% foram por indicação médica (Martins, et al., 1995).

Cerca de 60% dos medicamentos desenvolvidos nos países do Primeiro Mundo vêm de síntese orgânica; os outros 40% são oriundos de recursos naturais (30% de plantas e 10% de animais e microorganismos (Calixto, 1996). Tem sido documentado por anos o fato de que as plantas têm dado à medicina moderna uma considerável variedade de drogas, e que nos países industrializados 25% das prescrições de drogas contêm princípios ativos que ainda são extraídos de plantas superiores, situação essa que tem persistido pelo menos nos últimos 25 anos (Wijesekera, 1991).

O consumo mundial de medicamentos em 1990 atingiu cerca de US\$ 170,0 bilhões, dos quais as plantas e seus derivados representaram cerca de 25% dos fármacos consumidos (Estrella, 1993; citado por Pereira, 1999). Para exemplificar, Robbers, et al. (1997) ressaltam que se prevê uma comercialização anual de vimblastina e de vincristina (agentes antineoplásicos) em torno de US\$100,0 milhões anuais, entre outros.

O mercado mundial de fitoterapia movimentava cerca de US\$22 bilhões por ano. Em 2000 esse setor faturou somente nos Estados Unidos US\$ 6,3 bilhões. Na Europa, foram US\$ 8,5 bilhões. No Brasil, não há estatísticas oficiais, mas calcula-se que o faturamento esteja em torno de US\$ 500 milhões. Há previsão de que em 2010 esse montante passe a ser de US\$ 1 bilhão no País (segundo a consultoria Booz, et al., citada por Zaché, 2001).

Considerando-se que o Brasil é o país do mundo com maior diversidade genética de plantas, compreendendo cerca de 55.000 espécies catalogadas de um total de 350.000 a 500.000 (Guerra et al., 1998), somente 8% das espécies

vegetais têm sido extensivamente estudadas no que diz respeito à bioatividade terapêutica dos seus compostos e somente 1.100 espécies de plantas foram extensivamente estudadas nas suas propriedades medicinais.

O Brasil, com uma flora extremamente variada, mas com poucos investimentos em pesquisa, vem desperdiçando negócios que movimentam perto de \$ US 60 bilhões por ano. Assim, o quarto mercado mundial em vendas unitárias de medicamentos é dono de uma flora com cerca de 100 mil espécies e do maior acervo medicinal do planeta (Martins, 1999; citado por Bertolucci, 2000).

O custo para desenvolver medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos é muito elevado (Martins et al., 1995). Segundo Calixto (1996), uma nova droga custa de \$ US 100 a 500 milhões para ser desenvolvida. De cada 100 mil produtos sintetizados, cerca de 100 são testados no homem, 10 chegam a medicamento e, desses, 2 ou 3 revelam competitividade e são lançados no mercado. O processo é lento e leva de 10 a 15 anos para completar.

Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originam medicamentos em menor tempo, com custos muitas vezes inferiores e, conseqüentemente, mais acessíveis à população, que geralmente não tem condições de arcar com os custos elevados para aquisição de medicamento para o atendimento das suas necessidades básicas de saúde. Na maioria das vezes, as matérias-primas utilizadas na fabricação desses medicamentos são importadas, o que aumenta ainda mais o seu preço final (Martins et al., 1995).

Assim sendo, há necessidade de estudos de plantas que vêm sendo utilizadas empiricamente pela medicina popular, já que é imprescindível selecionar as que se apresentam ativas, aumentando-se a capacidade de suprimento de plantas com propriedades terapêuticas, ao mesmo tempo que as tornam acessíveis às camadas sociais com menor poder de compra. Conforme Martins et al. (1995), as pesquisas com essas espécies devem receber apoio total

do poder público, pois além do fator econômico, há de se destacar a importância para a segurança nacional e preservação do ecossistema onde existem tais espécies.

Dentre os problemas apresentados pelas espécies nativas, os mais importantes são os relacionados com a propagação, visto que as espécies nativas produzem sementes em apenas determinadas épocas. Algumas espécies produzem pouca ou nenhuma semente (Gurgel Filho, 1947, citado por Coelho, 1999).

A taxa de germinação de sementes de *Rudgea viburnoides* geralmente é inferior a 50%. O desenvolvimento das plantas no campo é bastante lento. A emergência ocorre em 40-70 dias (Lorenzi, 1998). A semente é altamente atacada por brocas que inviabilizam a maioria das sementes, seja por dano direto ao embrião ou pela contaminação de agentes patogênicos, e isso é facilitado pela exposição dos tecidos ao meio ambiente (conforme observação pessoal).

O cerrado é um Bioma típico de zona tropical e ocupa cerca de 20% do território nacional, compreendendo o sul do Estado do Mato Grosso, os Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, oeste da Bahia e o Distrito Federal (Eiten, 1993). O cerrado estende-se para fora do Brasil Central alcançando os Estados de Maranhão, Piauí, Rondônia e São Paulo. Em Minas Gerais, mais de 50% do território do Estado é constituído de cerrado (Silveira, 1989).

Atualmente com a expansão da fronteira agrícola, vem-se observando uma ocupação e exploração desordenada numa velocidade impressionante, em que imensas áreas do cerrado vêm sendo devastadas para instalação de culturas de exportação ou pecuária extensiva, tendo como consequência a perda de material genético, o que, aliado à exploração extrativista de espécies nativas de

interesse econômico, vem colocando em risco a sobrevivência de diversas espécies do cerrado.

Considerando-se a problemática exposta e também a carência de estudos sobre a micropropagação de *Rudgea viburnoides*, vegetal considerado medicinal, com o presente trabalho objetiva-se:

- Estudar uma metodologia para a multiplicação clonal *in vitro* da espécie.
- Avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de calos.
- Extrair e identificar o princípio ativo em folhas, caules e raízes de material vegetal *in vivo* e *in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos Taxonômicos e Descrição Botânica da espécie em estudo

Rudgea viburnoides (Cham.) Benth. (Figuras 1 e 2) possui como sinonímia botânica: *Cottea viburnoides* Cham., *Palicourea densiflora* Mart. e *Palicourea densifolia* Mart. É conhecida popularmente como cotó-cotó, tangará-açú, congonha-de-gentio, chá-de-bugre, folha grossa-do-sertão, folha-dura, casca branca, bugre, douradinha, etc. (Penna, 1946; Pio Corrêa, 1984; Lorenzi, 1998; Rodrigues & Carvalho de, 2001).

A espécie ocorre no cerrado e cerradões e campos sujos dos Estados de Rio de Janeiro, Bahia, Minas Gerais, Tocantins, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo (Penna, 1946; Lorenzi, 1998; Rodrigues & Carvalho de, 2001).

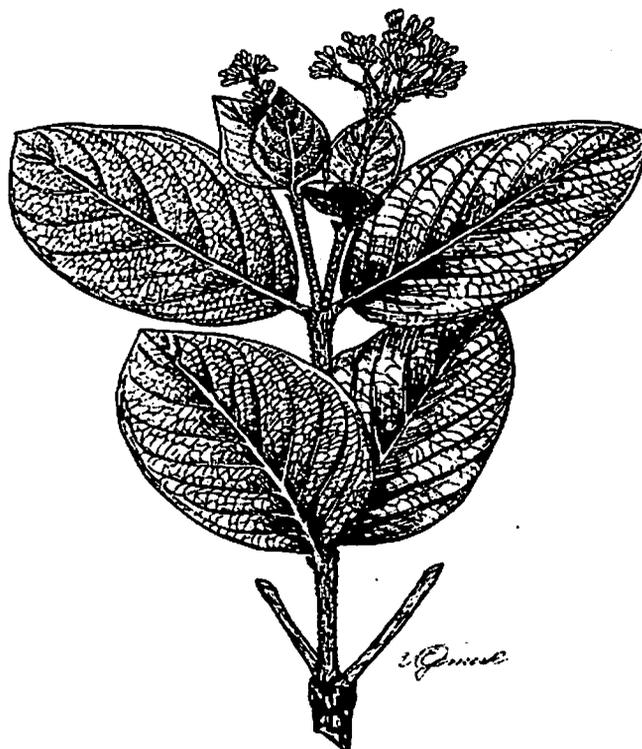


Foto extraída de: Rodrigues e Carvalho de (2001)

FIGURA 1. Detalhes de ramos de arbusto de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Pertencente à família das Rubiáceas, a planta apresenta as seguintes características botânicas: altura de 4 a 5 m, sendo encontrada com mais frequência como arbusto de 2 a 3 m de altura, dotada de copa globosa densa, com ramos novos denso-tomentosos. Possui tronco curto e tortuoso, de 15 a 20 cm de diâmetro, com casca espessa, mais ou menos suberosa e fissurada superficialmente; folhas simples, opostas, curto-pecioladas, grossas e rugosas, discolores, glabras na face superior e fosco-tomentosas com nervuras salientes na face interior, de 9 a 17 cm de comprimento por 3 a 8 cm de largura. Inflorescência em panículas terminais e nas axilas da extremidade dos ramos, com flores de cor branca muito perfumadas. Fruto drupa ovóide de cor

vermelho-escuro ou preto quando maduro, com polpa carnosa e contendo uma única semente (Lorenzi, 1998; Rodrigues & Carvalho de, 2001).



Gravura extraída de: Rodrigues e Carvalho de (2001)

FIGURA 2. Detalhes de ramo de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. UFLA, Lavras - MG, 2002.

O florescimento da planta ocorre em mais de uma época no ano; porém, predomina durante os meses de agosto-setembro. Os frutos amadurecem predominantemente em junho-julho (Lorenzi, 1998).

Segundo Pio Corrêa (1984), as folhas de *Rudgea* são anti-reumáticas e anti-sifilíticas, sendo úteis também contra a astenia, dispepsia e inchaço dos membros. Seu uso é aparentemente perigoso, porque as infusões em doses

elevadas produzem cólicas violentas e provocam vômitos. As cascas da raiz e do caule encerram vários alcalóides, entre eles a paracotoína e a cotoína. O aldeído fórmico, agindo sobre este último, forma um alcalóide artificial, a fortoína, que se apresenta em cristais amarelos sem sabor e com a aroma de canela, sendo muito solúveis na água e pouco solúvel no álcool e na benzina. Esses alcalóides, e, às vezes as próprias cascas, têm sido empregados na Europa por médicos eminentes e, com ótimo resultado, para combater o reumatismo, gota, suores noturnos dos tuberculosos, enterite catarral e as úlceras de estômago. A fortoína é um verdadeiro tônico específico contra diarreia.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação e abordagem fitoquímica *In vivo e In vitro de Tounerfortia cf paniculata Cham.* 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CALIXTO, J. B. Fitofarmacos no Brasil: agora ou nunca. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.21, n.123, p.26-30, 1996.

COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth)]. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EITEN, N.G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M.N. (ed.). *Cerrado*. 2 ed. Brasília: EDNUB, cap.1, p.17-73, 1993.

GILBERT, B.; PEREIRA, J.L.P.; ALMEIDA, M.B.S.; CARVALHO, E.S.; CASCON, V.; ROCHA, L.M. The official use of medicinal plants in public health. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 49, n.516, p.339-344, 1997.

GOTTLIEB, O. ; KAPLAN, M.A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. *Ciência hoje*, São Paulo, v.15, n. 89, p.51-54, 1993.

- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. dos; SCHMIDT, W. Agriculture – biodiversity and “appropriate biotechnologies” in Brazil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.50, n.6, p.408-416, 1998.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. p.297.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de, CASTELLAN, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas Medicinais*. Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- PENNA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3.ed. São Paulo: Kosmos, 1946. p.291-292.
- PEREIRA, F.D. *Propagação in vitro e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (Echirodons cf scaber RATAJ) uma planta medicinal*. 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal / Ministério da Agricultura, 1984. v.2, p. 363.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e farmacobiocotecnologia*. Baltimore: Williams & Wilkings, 1997. 372p.
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO de, D.A. *Plantas medicinais no domínio dos cerrados*. Lavras: UFLA, 2001. 180p.
- ROOT-BERNSTEIN, R.; ROOT-BERNSTEIN, M. *A incrível história dos remédios: raízes, ervas e larvas na surpreendente formação da medicina moderna*. Tradução por: Ana Gibson. Rio de Janeiro: Campus, 1998. 303p. Tradução de: Honey, mud, maggot and other medical marvels.
- SILVEIRA, F.A. da. *Abelhas silvestres (Hymenoptera apoidea) e suas fontes de alimento no cerrado na Estação de Experimentação de Peraoepba, Minas Gerais*. 1989. 50p. Tese (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- TRINDADE, C.; SARTORIO, M.L. *Farmácia viva: Utilização de Plantas medicinais. Tecnologia e Treinamento Agropecuário*, Viçosa, v. 3, n.10, p.33, 1999.

WIJESEKERA, R.O.B. Plant-derived medicines and their role in global health.
In: WIJESEKERA, R.O.B. (ed.), **The medicinal plant industry**. Boca Raton:
CRC Press, 1991. cap. 1. p.1-18.

ZACHÉ, J. Ao natural Istoé São Paulo, 1653, junho, 2002. Disponível em
<[http://www.terra.com.br/istoe/1653/medicina/1653
_ao_natural.htm](http://www.terra.com.br/istoe/1653/medicina/1653_a natural.htm)>. acesso em 06 jun.2001.

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGAÇÃO DE *RUDGEA VIBURNOIDES*

1 RESUMO

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. *Micropropagação de Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).*

Realizou-se este trabalho com o objetivo de identificar um protocolo de propagação *in vitro* de *Rudgea viburnoides* baseando-se em segmentos nodais oriundos de embriões zigóticos assepticamente germinados. Para a indução de brotações múltiplas, segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento e inoculados em meio MS ou WPM suplementados com níveis de 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ de BAP foram mantidos em sala de crescimento e avaliados aos 60 dias após a inoculação. Pelos resultados obtidos, infere-se que o meio mais adequado para a indução de multibrotações foi o meio WPM, adicionado de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP, o qual foi superior nas variáveis avaliadas e qualidade de brotos. Não ocorreu redução do tamanho de brotos por efeito do BAP. O meio WPM sem regulador de crescimento permite obter, em média, um broto axilar > 1,0 cm. Houve a ocorrência de calos em ambos os meios sem regulador de crescimento, sendo maior no WPM. A indução de enraizamento dos brotos obtidos foi estudada em meio MS/2 e WPM adicionados de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. O meio WPM, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, foi superior ao induzir um maior número de raízes e menor ocorrência de calo. No meio WPM, houve uma tendência para induzir um maior número de raízes. Houve ocorrência de calo em ambos os meios, sendo maior no meio WPM e com menor frequência no meio WPM, quando isento de regulador de crescimento.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA.

2 ABSTRACT

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. *Micropropagation of Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Thesis – Ph. D. in Crop Science)*

The objective of this work was studying the in vitro propagation of *Rudgea viburnoides* with nodal segments coming from aseptically germinated zygotic embryos. For the induction of multiple shoots, nodal segments 1.0 cm long and inoculated in MS or WPM media supplemented with 0.0; 2.0; 4.0 and 6.0 mg.L⁻¹ of BAP were maintained in a growth room and evaluated at 60 days after inoculation. The results obtained showed that the medium most adequate for inducing multi-shoots was WPM supplemented with 4.0 mgL⁻¹ of BAP, which was superior in the variables evaluated and quality of shoots. The WPM media without a growth regulator allows to obtain, an axillary shoot > 1.0 cm. There was callus occurrence in both media without a growth regulator, its being greater in WPM. The induction of rooting of the shoots obtained was studied in MS/2 and WPM media supplemented with 0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹ of IBA. The WPM supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ of IBA was superior to inducing a greater number of roots. There was callus occurrence in rooting media, being greater in the MS/2 medium with less frequency in the WPM medium, when without growth regulators.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Uma das alternativas para a preservação de espécies em extinção é a utilização da cultura de tecidos, principalmente na forma da propagação clonal *in vitro* por meio da organogênese diretamente a partir do explante.

Sabe-se que as espécies lenhosas são mais difíceis de se propagar *in vitro*, em comparação às espécies herbáceas. De acordo com Pierik (1987), isso se deve, principalmente, ao fato de as plantas lenhosas apresentarem, em geral, uma maior variabilidade genética, além de uma menor capacidade regenerativa dos tecidos, dormência das gemas e maior concentração de fenóis, os quais, liberados ao meio de cultura, alteram a cor do meio e impedem o crescimento dos explantes.

Rudgea viburnoides, planta considerada medicinal por causa de suas propriedades principalmente anti-reumáticas, é nativa do cerrado e é uma espécie que vem sofrendo com o extrativismo e com a redução do seu hábitat, em consequência da expansão agrícola. Como não existem estudos sobre sua multiplicação *in vitro*, com este trabalho estudar a propagação *in vitro* de *Rudgea viburnoides* por meio de segmentos nodais assepticamente obtidos com embriões zigóticos germinados *in vitro*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos é um processo, por meio do qual pequenos fragmentos de tecido vivo (explantes) são isolados de um organismo e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio nutritivo semidefinido ou definido (Mantell, et al., 1994).

O uso das técnicas de cultura de tecidos tem sido um instrumento valioso na obtenção de plantas livres de vírus e de outros patógenos, na propagação clonal rápida, no desenvolvimento de variedades melhoradas, na preservação de germoplasma e no melhor entendimento dos princípios básicos relacionados com a fisiologia, bioquímica e desenvolvimento das plantas (Vaz, 1986 e Thorpe, 1990).

A regeneração de plantas por meio da cultura de tecidos pode ser realizada pela cultura de embriões, da embriogênese somática e da organogênese. O desenvolvimento da planta por organogênese consiste na formação e crescimento de brotos diretamente do explante ou via formação de calos (Tisserat, 1985).

A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais mediante micropropagação, cultura de calos e suspensão celular, visando a maior produção de metabólitos secundários (Tabata, 1977).

4.1.1 Micropropagação

↙ A micropropagação é definida como uma cultura asséptica que envolve procedimentos de manipulação de órgãos, tecidos e células de plantas que produzem uma população de plântulas mediante processos de propagação sexual ou propagação vegetativa (Krikorian, et al., 1988).

↙ A regeneração de plântulas *in vitro* por meio da cultura de gemas é frequentemente utilizada para obtenção de clones, que mantêm todas as características da planta-matriz. Essa é uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (França, 1999).

↙ A micropropagação pode ser feita por brotos apicais e axilares. Os brotos axilares são aqueles que emergem em suas posições normais, nas axilas das folhas, ao passo que os brotos apicais são os que ocupam a extremidade apical (Mantell, et al., 1994).

A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (Caldas, et al., 1990). 12

A propagação clonal é altamente desejável ao processo de regeneração de espécies que apresentam alguma dificuldade na etapa de germinação de sementes e propagação vegetativa. Poucas são as informações a respeito da propagação de espécies nativas, o que dificulta o estabelecimento de generalizações sobre o comportamento das mesmas *in vitro* (Caldas, 1986). 14

4.2 Plantas lenhosa x micropropagação

No caso específico de plantas lenhosas, alguns fatores, como contaminação, liberação de substâncias oxidantes no meio, bem como a grande variabilidade genética existente, dificultam os estudos de propagação *in vitro*. Além disso, a frequência de regeneração *in vitro* geralmente diminui em função da idade da fonte de explantes (Rao & Venkateswara, 1996). 15

Os tipos de cultivo *in vitro* utilizados para propagação de plantas lenhosas não diferem muito dos tipos utilizados para outras espécies de plantas. A principal diferença, na maioria dos casos é que somente tecidos jovens têm sido utilizados ou têm dado resultados satisfatórios; sendo raro obter sucesso com tecidos maduros. A micropropagação tem sido aplicada para multiplicar e propagar numerosas plantas lenhosas nos últimos anos (Sommer & Wetzstein, 1984). 16

4.3 Indução de brotação múltipla e enraizamento de plantas lenhosas medicinais

Para a maioria das espécies, o método mais desejável de multiplicação é a organogênese ou cauligênese adventícia (diferenciação de brotos adventícios), pois proporciona a obtenção rápida de um grande número de propágulos. Os

broto adventício tem sua origem na formação do tecido meristemático, com posterior diferenciação de ápices. Para isso, os explantes utilizados são os meristemas, gemas e segmentos caulinares (apical, nodal e internodal). A utilização de gemas axilares (a partir de gemas pré-existentes), entretanto, pode ser utilizada com sucesso em muitas espécies (Hoffmann et al., 1998; Pinto & Lameira, 2001).

O conceito de que a diferenciação de órgãos em plantas é regulada pela interação de dois tipos de hormônios (auxinas e citocininas) pode ser utilizado como guia no desenvolvimento de sistemas para a micropropagação de novas espécies de plantas. Uma relação elevada citocinina/auxina promove, em geral, a formação de brotos, ao passo que uma relação elevada auxina/citocinina favorece a diferenciação de raízes (Echeverrigaray et al., 2001).

As citocininas constituem a classe de reguladores de crescimento mais utilizados na fase de multiplicação, pelo seu efeito na quebra da dominância apical e na indução na proliferação de gemas axilares. Utilizam-se diversas citocininas ou substâncias de ação semelhantes à citocinina, tais como o BAP (Benzilaminopurina), 2iP (2-isopenteniladenina), (KIN) cinetina, TDZ (thidiazurom), entre outros. Apesar de não serem essenciais, as auxinas podem ser adicionadas ao meio nessa fase para favorecer o desenvolvimento da parte aérea. O ANA (ácido naftalenoacético) é a auxina mais utilizada nessa fase, além de outras, como a AIB (ácido indolbutírico). Auxinas mais potentes como o 2,4-D e picloram não são utilizadas nessa fase, a menos que seja desejável a formação de calo (Hoffmann et al., 1998).

Pasqual & Barros (1991), ao determinarem aos 90 dias após inoculação, o efeito do BAP nas concentrações de 0, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000 3.500 e 4.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, na ausência ou presença de ANA (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sobre a propagação *in vitro*, de cafeeiro "Catuf", por meio da cultura de gemas, concluíram que a multiplicação de gemas é maior (3,14) com a adição de

3.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de BAP na ausência de ANA, que a maior proliferação de brotos com mais de 1 cm ocorreu na concentração de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de BAP e que o ANA na concentração utilizada é prejudicial à proliferação de brotos.

Num trabalho com barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), planta da família das leguminosas e de ocorrência nos cerrados, Pasqual & Barros (1992) avaliaram o efeito de combinações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/L e ANA (0,0; 0,1 e 1,0 mg/L) adicionados a meio MS sobre a proliferação de brotos em segmentos de plantas oriundas de germinação de sementes e mantidos *in vitro* e verificaram que a maior proliferação de brotos (2,16) ocorreu com o uso de 4,0 mg/L de BAP na ausência de ANA, e que o maior número de brotos maiores que 1 cm (1,21) foi observado na ausência de reguladores de crescimento.

Arelló & Pinto (1993), ao estudarem a propagação *in vitro* de *Kilmeyera coriacea* (Guttiferae), planta do cerrado considerada medicinal e conhecida como pau-santo, utilizaram diversas combinações de BAP (0,0; 0,45; 4,5 e 22,3 μM) e ANA (0,0; 0,55 e 5,5 μM) adicionados a meio MS inoculado com segmentos nodais de plântulas obtidas por germinação de sementes *in vitro*, e verificaram que a máxima proliferação de brotos foi alcançada com o emprego de 22,3 μM (5,0 mg.L⁻¹) de BAP + 0,55 μM (0,1 mg.L) de ANA (6,3) e a maior proliferação de brotos com mais de 1,0 cm de altura foi obtida com o uso de 0,45 μM (0,1 mg.L⁻¹) de BAP + 0,0 μM de ANA (89,3%).

Deschamps et al. (1993) ao estudarem o estabelecimento e indução de sarandi (*Sebastiania schottiana*) com doses de 0,0 a 10 μM de AIB, obtiveram os melhores resultados na concentração de 2,5 μM aplicado em meio WPM, independente da presença ou não de ágar.

Pinto et al. (1994) estudaram a multiplicação *in vitro* de *Kilmeyera coriacea* utilizando segmentos nodais e apicais inoculados em meio MS suplementado com doses de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg.L⁻¹ de BAP e obtiveram os melhores resultados (produção de brotos > 1 cm) com segmentos

nodais, sendo as maiores taxas de multiplicação (7,3) e (5,3) com as concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente, para os segmentos nodais e apicais. Concluíram, ainda, que a espécie é sensível a altas concentrações de BAP, não sendo essas eficazes para o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

Chen, et al. (1995), ao estudarem a reprodução assexuada rápida de *Eucommia ulmoides* (Eucomiaceae), árvore medicinal nativa da China, compararam os meios basais MS e WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) suplementados com níveis de 0,0; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; e 30,0 mg/L de BAP e sacarose na dose de 0 a 7% inoculados com brotos apicais de 3-5 mm de comprimento retirados de plântulas com 1 mês de idade, e verificando a superioridade do meio MS sobre o WPM e concluíram que o meio MS adicionado de 1,0 mg/L de BAP e 3% de sacarose foi adequado para o estabelecimento de cultura primária e a subsequente multiplicação de brotos na taxa de 7,5 novos brotos/explantes com 2 gemas a cada 3 semanas. Argumentam também que a adição de auxina (0,1 mg/L de ANA) diminuiu a proliferação, suprimiu a alongação e estimulou a formação de calos. O enraizamento de brotos foi verificado em meio com Gelrite com 1/3 da força dos sais de MS e 0,1 mg/L de ANA. Contudo, ressaltam que o método somente é aplicável a material rejuvenescido.

França et al. (1995) ao inocularem segmentos de nós cotiledonares de barbatimão assepticamente obtidos em meio MS, concluíram que a maior proliferação de brotos foi alcançada com BAP na concentração de 13,3 µM; no entanto, houve um maior alongamento dos brotos quando o meio MS foi suplementado com 0,04 µM de BAP e 0,005 µM de AIA. O melhor enraizamento ocorreu quando os brotos foram inoculados em meio MS com metade da concentração de macronutrientes suplementado com 5,37 µM de ANA e 80 mg L⁻¹ de floroglucinol.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (1995) ao estudarem a micropropagação de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), arbusto encontrado no Brasil e que possui propriedade medicinal. Esses pesquisadores avaliaram o efeito de BAP nas concentrações de 0,0; 1,8; 4,4; 13,3 e 26,6 μM isolado e BAP (0,0; 1,8 e 13,3) combinado com auxina (0,0 e 1,1 μM de AIA) adicionados a meio MS e obtiveram os melhores resultados em relação ao número de brotos formados, em meio suplementado com 13,3 μM de BAP. Níveis maiores aumentaram o número de brotos, mas diminuíram o comprimento, e a adição de AIA não teve efeito sobre o número de brotos, mas aumentou o comprimento, principalmente no nível de 1,8 μM de BAP. O número de brotos foi influenciado pela concentração de BAP, pelo grau de juvenildade do explante e pela posição da gema no caule. Quanto mais próximo do ápice o explante for retirado, mais calo será produzido se comparado aos brotos. O enraizamento de brotos micropropagados alcançou 90%, com raízes vigorosas e saudáveis, após a transferência direta a mistura de solo.

Sudha & Seeni (1996), trabalhando com segmentos nodais e brotos apicais de *Rauwolfia micrantha*, (Apocynaceae), um arbusto lenhoso medicinal e raro, relatam que a combinação de 13,2 μM de BAP e 2,68 μM de ANA suplementado em meio MS induziu uma alta frequência (77%) de formação de até 3 brotos por cada nó a cada 8 semanas e que o subcultivo repetido de brotos em meio contendo 4,4 μM de BAP e 0,27 μM de ANA possibilitou produção massal de brotos sem qualquer evidência de declínio. Verificaram, ainda, que o uso de baixas concentrações (1,14 μM e 0,98 μM) e altas (5,7 μM e 4,92 μM) de AIA e AIB resultou em diminuição da resposta ao enraizamento e não incrementou o estabelecimento, o que foi contornado com a utilização de 2,68 μM de ANA, o qual promoveu a formação de 8 a 10 raízes robustas e uma alta porcentagem de sobrevivência e estabelecimento (83%) das plantas.

Forni & Pasqual (1996), em um estudo sobre a influência do BAP (0,0; 3,6 e 9,0 mg/L) e várias concentrações do meio MS (25%, 50%, 75% e 100%) na micropropagação de café "Catuf", concluíram que para a produção total de brotos e folhas, o MS usado integralmente, acrescido de 9,0 mg/L de BAP, é a combinação que dá os melhores resultados (6,62 novos brotos/explante) aos 120 dias após a inoculação (DAI). Aos 90 DAI, o nível ideal de BAP é de 6 mg/L (4,29 brotos). Para a produção de matéria seca (aos 120 DAI), a combinação ideal é 9 mg/L de BAP, com 75% dos componentes do MS.

Jain & Nessler (1996) desenvolveram a propagação clonal de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), importante árvore medicinal chinesa, mediante cultivo de gemas de brotos. As gemas foram retiradas de plântulas com 25 a 30 dias, pré-embebidas por 48 horas em três diferentes meios líquidos: LS (Linsmaier & Skoog, 1965), B5 (Gamborg, et al., 1968) e WPM contendo BAP (2,22 a 35,5 μ M), cinetina (2,32 a 18,58 μ M) ou tiadizuron (0,1 a 10,0 μ M) e, posteriormente, cultivados em meio semi-sólido com a mesma composição. As brotações múltiplas somente se desenvolveram em explantes pré-embebidos em BAP, sendo o número máximo de brotos alcançado a partir de gemas anteriormente embebidas em meio B5 suplementado com 17,4 μ M e, posteriormente, cultivadas no mesmo meio contendo a mesma concentração de BAP. Eles obtiveram o enraizamento pelo cultivo de brotos individuais com 15 a 20 mm excisados e cultivados em meio basal suplementado com AIB (4,9; 9,8; 14,7 ou 19,6 μ M) e concluíram que a menor concentração de AIB (4,9 μ M) resultou na maior porcentagem de enraizamento (82%) e o menor período de iniciação de raiz (18 dias).

Lameira (1997), ao determinar um protocolo para micropropagação para *Cordia verbenácea* (Boraginaceae) através de segmentos nodais e apicais provenientes de plantas cultivadas em casa-de-vegetação, inoculados em meio MS solidificado com 0,6% de ágar e suplementado com 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 μ M

de cinetina todos complementados com 0,01 μM de ANA, verificou que o segmento nodal é mais eficiente que o apical, pois proporciona um maior número e comprimento de propágulos por explante, e a concentração de 5,0 μM de cinetina + 0,01 μM de ANA no meio de cultura MS. induz um maior número e comprimento de propágulos. O enraizamento dos propágulos ocorreu em meio MS sem regulador de crescimento aos 32 dias após a inoculação inicial e aclimatados em casa-de-vegetação com 70% de sobrevivência após duas semanas de plantio.

Ajithkumar & Seeni (1998) estabeleceram um protocolo para a multiplicação clonal rápida de *Aegle marmelos*, uma árvore medicinal da família das Rutaceas, pela indução de brotações axilares em segmentos nodais com 1,0 a 1,5 cm obtidos *in vitro*. O meio utilizado foi o MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,5 a 10,0 mg.L^{-1}) e cinetina e combinações de citocininas (0,5 a 2,5 mg.L^{-1}) e 0,5 a 1,0 mg.L^{-1} de ANA e AIA. O maior número de brotações (6,4 e 5,7 brotos) foi obtido em 1,5 e de cinetina e 2,5 mg.L^{-1} de BAP, respectivamente). Contudo, a influência sinérgica da auxina foi observada na combinação de 2,5 mg.L^{-1} de BAP e 1,0 mg.L^{-1} de AIA, que induziu a formação de 12,1 brotos saudáveis e longos (5,2 cm). Durante o subcultivo de vários explantes, foram testadas várias concentrações de BAP (0,0 a 2,5 mg.L^{-1}), e os segmentos nodais produziram 11,3 brotos e gemas a uma taxa de 100% em sete semanas. De todos os tipos de explantes, os segmentos nodais crescidos *in vitro* responderam mais favoravelmente na presença de baixas concentrações de BAP (0,05 a 0,1 mg.L^{-1}). Brotos excisados com 3,0 a 2,5 cm foram mais bem enraizados em meio $\frac{1}{2}$ MS com 0,5 mg.L^{-1} de AIA (70%) ou 10,0 mg.L^{-1} de AIB (90%).

Carvalho (1998), ao estudar a propagação *in vitro* de *Bauhinia forficata*, avaliou vários tipos de explantes, entre os quais segmentos de caule com gemas (segmentos nodais) e sem gemas axilares (entrenós), inoculados em meio MS/2

sólido acrescido de BAP nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mg/L. Esse pesquisador verificou que os segmentos nodais e de entrenós formaram brotações adventícias de forma proporcional ao aumento na concentração de BAP até o nível de 0,5 mg/L. Ao estudar o enraizamento da espécie por meio de brotos micropropagados inoculados em meio ½ MS sem fitorreguladores ou suplementado com AIB (1,0; 2,5 e 5,0 mg/L) ou de ANA (0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg/L), verificaram que o ANA induziu a formação de raízes em 40% dos brotos em meio contendo 5,0 mg/L e 20% em média nas outras concentrações. O AIB estimulou o enraizamento em 40% dos brotos em meios contendo 1,0 mg/L e 10% nos demais níveis testados.

Ao estudar a micropropagação e composição do óleo essencial de plantas clonalmente propagadas de *Minthostachys mollis* (arbusto aromático da família Lamiaceae encontrado na Argentina) a partir de brotos apicais e segmentos nodais inoculados em meio ½ MS contendo BAP (0,0; 2,2; 4,4; 13,3; 22,0 e 30,8 µM) e/ou ANA (0,0; 0,05; 0,27; 0,1; 0,53 e 1,07µM), Chebel et al. (1998) verificaram que o número de brotos aumenta conforme o incremento da concentração de BAP; contudo, na maior concentração ocorreu maior número de brotos vitrificados. A combinação de 0,05 µM de ANA + 2,2 µM de BAP induziu o maior número de brotos/explante. O comprimento dos brotos foi geralmente inverso ao número de brotos, sendo o máximo comprimento iniciado com 2,2 µM de BAP ou meio sem regulador de crescimento. Para avaliar o enraizamento, brotos de 1,5 cm de comprimento foram transferidos a meio MS com metade da força e suplementado com 0,05 ou 0,5 µM de ANA, 0,05 ou 0,5 µM de AIB ou 0,06 ou 0,6 µM de AIA. Verificaram ainda que o meio que proporcionou os melhores resultados foi o suplementado com 0,05 µM de ANA.

Fidelis (1998), ao estudar a propagação *in vitro* de *Brosimum guadichaudii* (mama-cadela), utilizou segmentos nodais com 13 mm e média de 1 a 2 gemas inoculados em meio MS completo suplementado com TDZ nas

concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg/L, verificando aos 60 dias que o TDZ não promoveu aumento do número de brotações axilares e adventícias. Por outro lado, observou uma redução no tamanho das brotações conforme aumentavam as concentrações do regulador. Aos 60 dias, o número de gemas caiu de 4,3 para 2,2 e o tamanho das brotações de 1,9 para 0,2, respectivamente, quando a concentração de TDZ variou entre 0,0 para 3,0 mg/L. Esse mesmo autor, ao avaliar o enraizamento de segmentos nodais de 13 mm de comprimento com 1 ou 2 gemas em média, com os segmentos inoculados em meio $\frac{1}{4}$ MS líquido e suplementado com AIB na concentração de 0 e 1 mg/L e pH variando de 3,5 a 6,5, concluiu que não houve diferença entre os tratamentos quanto ao número de raízes formadas. O tamanho das brotações foi afetado pela presença de AIB, havendo na sua presença uma redução de 54%.

Parra & Amo-Marco (1998) utilizaram brotos apicais e segmentos nodais provenientes de material adulto e de plântulas para estudar o efeito do material de origem, número prévio de subcultivos (1, 3 ou 5) no meio de estabelecimento, o tipo de explante e os macronutrientes sobre a multiplicação e alongamento em *Myrtus communis* (Myrtaceae), planta lenhosa medicinal, sempre na presença de 4,4 μ M de BAP, e observaram que a proliferação de brotos foi influenciada principalmente pela origem do material, com a maior taxa de multiplicação e alongamento para o material adulto do que para o material proveniente de plântulas, e pelo número de subcultivos, com a maior taxa de multiplicação e alongamento para o primeiro subcultivo. Ao testarem a formulação de macronutrientes (MS, 1/2MS e MS com metade da concentração de NH_4NO_3 e WPM, verificaram que o número máximo de brotos foi obtido a partir de explantes apicais em meio MS, ao passo que o maior comprimento foi encontrado em explantes nodais em meio WPM. O maior número de segmentos que pode ser obtido por fragmentação de brotos foi conseguido em explantes apicais em meio WPM, sempre no primeiro subcultivo.

Para *Holostemma annulare* (Asclepiadaceae), um raro arbusto nativo da Índia com propriedades medicinais, foi estabelecido um sistema de micropropagação rápida por Sudha, et al. (1998). Brotos apicais (0,5 a 0,8 cm) e nós basais e terminais (1,0 a 1,5 cm) obtidos de plantas produzidas convencionalmente foram cultivados em meio MS suplementado com várias concentrações de BAP e ANA. Foi observada formação de brotação múltipla (3,8 brotos) em 68% dos nós basais cultivados em meio com um ótimo de concentração de 4,43 μM de BAP e 0,54 μM de ANA após 8 semanas. Por outro lado, os nós terminais não foram adequados para a formação de brotação múltipla, e os explantes provenientes de brotos apicais formaram um único broto em todos os tratamentos. Ao avaliar a iniciação radicular com brotos cultivados em meio 0,5 MS solidificado com ágar e suplementado com carvão ativado e concentrações de AIA (0,57 a 2,85 μM), ANA (0,54 a 2,69 μM) e AIB (0,49 a 2,46 μM), constatou-se que a melhor percentagem de enraizamento (75%) e sobrevivência (80%) foi alcançada em meio 0,5 MS suplementado com 1,48 μM de AIB.

A multiplicação rápida de *Syzygium travancoricum* (Myrtaceae), uma espécie arbórea em extinção e utilizada na Índia na medicina local, foi alcançada por Sudha, et al. (1998) em explantes nodais em meio composto por MS (macronutrientes e vitaminas) e WPM (micronutrientes) e reguladores de crescimento: BAP (0,0 a 26,6 μM) e cinetina (0,0 a 27,8) isolados ou em combinação com ANA (0,0 a 10,7 μM). Foi observada a indução de brotações múltiplas a partir de plântulas de 1 a 2 anos de idade em meio basal suplementado com 17,7 μM de BAP e 1,3 μM de ANA. Foi verificado um alto número de brotos múltiplos (25 brotos/explante nodal) no terceiro subcultivo em meio de multiplicação. Brotos com comprimento médio de 2,0 cm e portando dois nós foram subcultivados em meio basal $\frac{1}{2}$ suplementado com 0,0 a 5,7 μM

de AIA para enraizamento. O enraizamento máximo (65%) foi alcançado aos 15 a 20 dias em 1,1 μM de AIA.

Coelho (1999), num estudo sobre a propagação *in vitro* de sucupira-branca *Pterodon pubescens*, comparou aos 30, 60 e 90 dias o comportamento de segmentos nodais (20 mm) com idade de 3 meses e 13 dias nos meios básicos MS e WPM com 0,7% de ágar quanto à altura de haste, número de hastes, número de gemas e comprimento de raiz e verificou que os segmentos nodais de sucupira-branca apresentaram maior desenvolvimento em meio básico WPM. Esta pesquisadora estudou ainda segmentos nodais inoculados em meio MS, diluído para a metade dos sais dos macro e micronutrientes com vitaminas de MS e 2% de sacarose, com 0,7% de ágar suplementado com BAP (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 μM) e ANA (0,0; 1,0; 3,0 e 5,0 μM), constatou que a concentração de 5,0 μM de BAP em segmentos nodais de sucupira proporcionou a maior quantidade de aglomerados (multibrotações), em média, de 3,2 aglomerados por segmento nodal e a maior quantidade de brotos, media de 7,65 brotos por segmento nodal.

Juliani et al. (1999) determinaram um método de micropropagação do arbusto perene com propriedades medicinais *Lippia junelliana* (Verbenácea) em brotos apicais e segmentos nodais. A proliferação de microbrotos foi obtida colocando-se os explantes em meio MS completo suplementado com 4,4 μM de BAP ou 0,04 μM de AIB + 4,4 μM de BAP. Para a indução de enraizamento, foram utilizados brotos de até 2 cm de comprimento e transferidos para meio MS suplementado com AIB (0,04; 0,4 e 0,8 μM) ou ANA (0,05; 0,5 e 1,0 μM). Constataram que o enraizamento dos brotos foi maior (100%) em meio MS completo sem regulador de crescimento. O meio suplementado com 0,05 μM ANA foi o mais efetivo em termos de produção de raízes por brotos (4,3), seguido da testemunha (3,6).

Explantes de plântulas de jojoba (*Simmondsia chinensis*), arbusto com utilidade farmacêutica, foram cultivados em meio basal Walnut DKW (Driver

2

& Kuniyuki, 1984) e suplementados com várias concentrações de BAP (4,4; 8,9; 17,8; 26,6 e 35,5 μM) e em combinação com nitrato de prata. A proliferação de brotos foi eficiente em todas as concentrações testadas, com um máximo de 15,2 brotos por explante original. Os brotos produzidos durante o estágio de proliferação foram testados com ANA, AIB e AIA para induzir a rizogênese, alcançando 64% em alguns tratamentos. Brotos axilares e adventícios com 1,0 a 1,5 cm foram transferidos a meio fresco e submetidos a diferentes tratamentos, que incluíam a adição de AIB (24,6; 49,2 e 98,4 μM) ou ANA (26,8; 53,7 e 107,4 μM) isolados ou em combinação (24,6 mais 26,8 μM , 49,2 mais 53,7 μM e 98,4 mais 107,4 μM de AIB mais ANA, respectivamente. A ausência ou baixas concentrações de auxina não aumentaram a indução de raízes. Foi observado um aumento no enraizamento quando os dois reguladores foram combinados nas concentrações de 49,2 μM de AIB, mais 53,7 μM de ANA e 98,4 μM de AIB, mais 107,4 μM de ANA, sendo o primeiro o que resultou na maior porcentagem de enraizamento em todos os tratamentos testados (Roussos et al., 1999).

Sansberro et al. (1999), num trabalho realizado para estudar a propagação *in vitro* de *Ilex paraguariensis* com dois anos de idade em segmentos nodais e brotos apicais e combinações de ANA (0,0 a 5,4 μM) e BAP (0,0 a 4,4 μM) relatam um máximo de regeneração de brotos quando os segmentos nodais foram cultivados em meio $\frac{1}{4}$ MS com 3% de sacarose. No entanto, o meio contendo BAP (4,4 μM) produziu brotação múltipla com mais de 5 mm de comprimento (uma média de 4 brotos/explante). Esses autores obtiveram enraizamento de brotos regenerados pelo cultivo em $\frac{1}{4}$ meio MS + 7,4 μM de AIB com 2,5 g/l de fitagel por 10 dias, sendo, posteriormente transferidos a um meio fresco composto de $\frac{1}{4}$ de meio MS sem reguladores de crescimento.

Andrade et al. (2000), em um experimento com aroeira (*Myracrodruom urundeuva* –Anacardiaceae) utilizando como explante segmentos cotiledonares,

internodais, nodais e apicais inoculados em meio MS modificado e suplementado com combinações de BAP, ANA e cinetina. A multiplicação de brotações foi feita a partir de segmentos nodal e apical inoculados no mesmo meio adicionado de 0,0; 2,7; 4,5 e 6,7 μM de BAP. Constataram que os segmentos nodais e apicais tiveram 90% de regeneração e o maior comprimento da brotação (6,3 cm), no meio com 4,5 μM de BAP. Esses pesquisadores testaram o enraizamento “in vitro” das brotações obtidas inoculando-as em meio MS modificado, suplementado com ANA nas concentrações de 0,0; 3,8; 4,8 e 6,4 μM mantidos nos primeiros 4 dias no escuro, e constataram que o melhor desenvolvimento radicular ocorreu no meio com 4,8 μM de ANA, alcançando 85,5% de plântulas enraizadas, com raízes de até 17 mm de comprimento.

Bertolucci (2000), ao estudar a micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* (marmelinho), utilizou segmentos nodais (15 a 20 mm) provenientes de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, comparou os meios básico MS completo e diluído a metade dos sais dos macro e micronutrientes e o meio WPM, verificando a superioridade do meio WPM, e ao estudar o meio suplementado com 0,0; 0,5; e 1,0 mg.L^{-1} de BAP, obteve melhores resultados em termos de múltiplas brotações com a suplementação com 1,0 mg.L^{-1} de BAP (7 brotações/segmento). Observou também a formação de raízes com bom crescimento e desenvolvimento em brotações em meio WPM, sem a necessidade de utilização de reguladores de crescimento.

Conceição (2000), ao desenvolver um protocolo para micropropagação de timbós (*Derris urucu* e *D. nicou*), estudou o comportamento de segmentos nodais contendo uma ou duas gemas axilares inoculadas em meio 0,7% de ágar, 3 ou 4% de sacarose e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L^{-1}) avaliados aos 28 dias, observou que o número de brotos no segmento nodal com duas gemas axilares teve um comportamento quadrático, com aumentos até 2,0 mg.L^{-1} de BAP, independente da concentração de sacarose. Quanto ao tamanho de broto,

também teve um comportamento quadrático, e o maior tamanho de broto foi encontrado na ausência de BAP. Verificou-se que brotações oriundas de segmentos nodais com duas gemas axilares foram enraizadas em meio nutritivo MS/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em AIB a 2.000 ppm, com pH ajustado para 4,5 ou 5,7 e, em meio MS/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em ANA a 2.000 ppm, com pH ajustado para 5,7.

Lisowska & Wysokinska (2000) estudaram a propagação *in vitro* de *Catalpa ovata* (Bignoniácea), planta lenhosa do leste da Ásia, com importância medicinal, a partir de explantes nodais (10 mm) e gemas apicais (5 mm), bem como de calos derivados de cotilédones. Para a proliferação de brotos a partir de brotos apicais e segmentos nodais, foram utilizados meios basais de SH (Schenk & Hidebrandt, 1972) e WPM suplementados com BAP (2,2 a 22,2 μM) isolados ou em combinação com AIA (0,6 μM). O enraizamento de brotos com, no mínimo, 5 mm de comprimento foi obtido em meio MS solidificado com ágar a 0,7% sem regulador de crescimento.

Pereira et al. (2000) estudaram a proliferação de brotos e a indução de raízes em com *Salix humboldtiana* (Salicaceae) utilizando duas fontes de explantes, provenientes de plantas adultas e de plantas jovens clonadas. Os explantes adultos foram inoculados em meio MS suplementado com cinetina (0,0 a 23,2 μM) e os explantes jovens em meio MS contendo várias concentrações de cinetina (0,0 a 23,2 μM), BAP (0,8 a 22,2 μM) e zeatina (0,9 a 22,8 μM), cinetina (2,3 μM) + AIA (0,5 a 2,8 μM) ou cinetina + ANA (0,5 a 2,3 μM), e observaram que os explantes de árvores adultas inoculados em meio MS com 13,9 μM de cinetina mostraram a maior proliferação de brotos (2,3 brotos/gema), ao passo que os explantes de plantas jovens, em meio MS suplementado com 2,3 μM cinetina produziram 3,8 brotos /gema. Os brotos de explantes jovens, quando transferidos a meio MS sem regulador, alongaram 26

mm, e os explantes de plantas jovens, 27 mm. Ao avaliar o enraizamento de brotos inoculando-os em meio MS ou MS/2 com metade da força suplementados com 5,3 μM de ANA e brotos obtidos de plântulas clonadas inoculados em meio básico MS, MS/2 ou MS/4 suplementados com ANA (0,5 a 10,7 μM); ou AIB (0,4 a 9,8 μM), esses pesquisadores verificaram que plântulas derivadas de explantes oriundos de árvores adultas em meio MS/2 + 5,3 μM de ANA mostraram 93% de enraizamento enquanto que plântulas inoculadas em meio básico MS suplementado com a mesma concentração de ANA, exibiu somente 31% de enraizamento.

Sreekumar, et al. (2000), ao testarem a respostas de vários tipos de explantes (brotos apicais, segmentos nodais, internodais, folhares e radiculares) do arbusto medicinal *Hemidesmus indicus* (Periplociaceae), com 12 meses de idade cultivados em meio MS com metade da força suplementado com várias concentrações e combinações de BAP (0,0 a 6,6 μM), cinetina (1,16 a 13,94 μM), BAP (2,22 μM) combinado com cinetina (0,46 a 13,94 μM) e BAP (0,0 a 6,66 μM) combinado com ANA (0,0 a 2,69 μM), constataram que o segundo e o terceiro nó visíveis do ápice foram os mais regenerativos, com 9,37 brotos em 4 semanas em meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 2,22 μM de BAP e 1,07 μM de ANA, não sendo necessária uma fase de alongamento dos brotos. A capacidade de produzir caules dos nós diminuiu com o aumento da maturidade. Foi conseguida a multiplicação por até 25 subcultivos semanais dos brotos sem declínio do vigor. Brotos com 6-7 cm foram transferidos a MS/4, MS/2 e MS suplementado com AIA (0,0 a 14,27 μM), AIB (2,46 a 14,7 μM) e ANA (0,54 a 5,37 μM). As culturas de brotos foram enraizadas em MS/4 contendo 9,8 μM de AIB, alcançaram um número máximo de raízes sem a produção de calos.

Foi desenvolvido por Dhar, et al. (2000) um protocolo para propagação *in vitro* de árvores maduras de *Pittosporum napaulensis*, espécie medicinal do Himalaia da família Pittosporaceae. Foi testada a combinação de BAP (1,0 a

10,0 μM) e ANA (0,05 a 0,25 μM) adicionada a meio MS e inoculada com segmentos nodais com uma gema lateral. A melhor proliferação de gemas (83,1%), número de brotos (21 brotos axilares/explante) e comprimento de brotos (5,5 cm) foi alcançada em meio MS suplementado com 5,0 μM de BAP e 0,1 μM de ANA. Ao compararem a resposta dos explantes em vários meios: MS, WPM, B5 ou $\frac{1}{2}$ MS suplementados com 5,0 μM de BAP e 0,1 μM de ANA, verificaram que culturas de em meio MS forneceram uma média de 20,8 brotos axilares/explante, que foi significativamente superior ao obtido em meio WPM e B5. Das três citocininas testadas (BAP, Cinetina e TDZ), o BAP mostrou ser o melhor na indução de brotos. O potencial de regeneração de brotos variou entre os genótipos. Obteve-se enraizamento dos brotos regenerados, após tratamento por 48 horas em meio líquido com $\frac{1}{2}$ da força de meio MS suplementado com 20,0 μM de AIB.

Santos (2001), com o objetivo de estabelecer um sistema de propagação de *Salix humboldtiana* a partir de segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento inoculados em meio MS suplementado com 30 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar e diferentes combinações de GA_3 e BAP, ambos nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L, verificou que a indução de brotações de *Salix* pode ser obtida na ausência de GA_3 e BAP e que o uso de GA_3 ou BAP favorece o surgimento de mais de um broto por explante. Comparando os dois reguladores, o uso de GA_3 foi superior, possibilitando a formação de dois brotos por explante quando esses foram inoculados na presença de 2,0 mg/L. Avaliou-se o enraizamento de brotações com aproximadamente 3,0 cm de comprimento, quando transferidas para meio WPM suplementado com 3,0% de sacarose, 0,7% de ágar e acrescido das combinações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg/L) e carvão ativado (0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/L). Constatou-se que o melhor tratamento para obtenção de rizogênese *in vitro* foi o meio adicionado com 4,0 g/L de carvão ativado associado a 3,0 mg/L de AIB.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Estabelecimento da cultura *in vitro*

5.1.1 Procedência das sementes

A classificação da espécie em estudo foi realizada pelo professor Manuel Losada Gavilanes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Exsicatas estão depositadas no herbário ESAL do Departamento de Biologia da UFLA, sob registro nº 15.300.

Foram utilizadas sementes de populações naturais do município de Itumirim, na região Sul de Minas Gerais.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5.1.2 Desinfestação das sementes.

As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, desinfetadas com álcool 70% por um minuto e em solução de hipoclorito de sódio a 2% por quinze minutos. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas por quatro vezes em água destilada e autoclavada.

5.1.3 Excisão do embrião

Embriões imaturos no estágio torpedo foram excisados com o auxílio de pinça, cabo de bisturi e lupa estereoscópica na câmara de fluxo laminar horizontal, sendo inoculados diretamente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. O meio utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com ágar a 0,6%, e o pH ajustado

em $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem, sendo os embriões cultivados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$.

5.2 Efeito do BAP adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de brotações múltiplas em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*.

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) associadas aos meios de culturas sobre a indução de brotações em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*, foi conduzido um experimento utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 4×2 , sendo constituídos por concentrações de BAP de 0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L^{-1} , combinadas com os meios de cultura MS e WPM, que foram solidificados com ágar, sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem (Lloyd & McCown, 1981).

Segmentos nodais com aproximadamente 10 mm de comprimento contendo 2 gemas axilares, oriundos de plântulas assepticamente cultivados, foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa de plástico e vedados com parafilme. Os explantes foram cultivados em câmara de crescimento em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob uma intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a uma temperatura de $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$. A avaliação foi realizada aos 60 dias após a inoculação e foram levadas em consideração as seguintes variáveis: tamanho de brotos (TB), estimativa total de rendimento de segmentos nodais (ETRSN), peso de matéria fresca de brotos (PMFB), peso de matéria seca de brotos (PMSB), peso de matéria fresca de calo (PMFC), peso de matéria seca de calo (PMSC), número de brotações axilares (NBAX), número de brotações adventícias (NBAD)

e número total de brotações (NTB). Para obtenção da estimativa de rendimento de segmentos nodais total (propágulos), foram consideradas as porções das brotações totais/explante que possuíam aproximadamente 10 mm de comprimento, com gemas bem situadas, ou seja, localizadas no terço superior da porção.

5.3 Efeito do AIB adicionado aos meios MS/2 e WPM sobre a indução de enraizamento em brotações de *Rudgea viburnoides*

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) associadas aos meios de culturas sobre a indução de brotações em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*, foi conduzido um experimento utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 4 x 2, sendo constituídos por concentrações de AIB de 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹, combinadas com os meios de cultura MS/2 e WPM, que foram solidificados com ágar, o pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem (Lloyd & McCown, 1981).

Foram utilizados como explantes segmentos nodais com aproximadamente 10 mm de comprimento contendo 2 gemas axilares, oriundos de plântulas asépticamente cultivadas em meio WPM solidificado com ágar a 0,6%, pH ajustado a 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem, isento de regulador, inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, tampados com tampa de plástico e vedados com parafilme. Os explantes foram cultivados em câmara de crescimento em fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob uma intensidade luminosa de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, a uma temperatura de 26 ± °C e umidade relativa do ar de 70 ± 5%. A avaliação foi efetuada aos 60 dias após a inoculação e foram levadas em consideração as seguintes variáveis: tamanho de brotação (TB), peso de matéria fresca de parte aérea (PMFPA), peso de matéria seca de

parte aérea (PMSPA), peso de matéria fresca de calo (PMFC), peso de matéria seca de calo (PMSC), peso de matéria fresca de raiz (PMFR), peso de matéria seca de raiz (PMSR), número de raízes (NR), número de raízes secundárias (RS) e tamanho de raiz (TR).

Para os dados obtidos em 3.2 e 3.3, as variáveis foram submetidos à análise de variância de acordo com modelo sugerido por Steel et al. (1997) para os experimentos fatoriais. Quando houve efeito significativo dos tratamentos, aplicou-se o teste F para comparar os dois meios de cultura, tanto isoladamente como em cada concentração de BAP, utilizando-se a análise de regressão para avaliar o comportamento das variáveis analisadas em função das concentrações de BAP. A escolha do melhor modelo de regressão foi feita observando-se a significância de cada modelo de regressão e as estimativas do coeficiente de determinação.

As análises de variância e de regressão foram realizadas utilizando-se o programa computacional SISVAR, ou seja, sistema de análise de variância (Ferreira, 2000).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do BAP adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução de brotações em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*.

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao tamanho de brotação e estimativa de rendimento de segmentos nodais é apresentado na Tabela 1. Observa-se que os meios de cultura, o regulador de crescimento e a interação meio x regulador tiveram efeitos significativos ao valor nominal de 1% de probabilidade para o tamanho de brotação. O meio de cultura e o regulador de crescimento tiveram efeito significativo para a estimativa de rendimento total de segmentos nodais.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para o tamanho de brotação (TB), em cm, e estimativa total de rendimento de segmentos nodais (ETRSN), em números, de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		TB (cm)	ETRSN (Nº)
Meio de cultura	1	19,891875 **	8,159252 **
BAP	3	3,936425 **	29,511741 **
Meio x BAP	3	0,674947 **	3,210369 ^{NS}
Resíduo	40	0,152075	1,892448
Média	-	2,59	3,71
C.V. (%)	-	15,03	37,04

¹NS, ** = Teste F não significativo e significativo a 1%, respectivamente

Com relação ao tamanho de brotação, pelos dados (Tabela 2) observa-se a superioridade do meio WPM.

TABELA 2. Valores médios para tamanho de brotação (cm) de *Rudgea viburnoides* em função dos dois diferentes meios de cultura e submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios	BAP (mg.L ⁻¹)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
MS	1,47 b	2,00 b	1,95 b	2,38 b
WPM	2,21 a	3,78 a	3,01 a	3,95 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Os dados alcançados neste trabalho com relação ao tamanho de brotação nos meios básicos completos, concordam com os obtidos por Parra & Amom-Marco (1998) que, ao compararem a formulação de macronutrientes dos meios MS, MS/2, MS com metade da concentração de NH₄NO₃ e WPM, verificaram que o maior comprimento das brotações (20,5 mm) de segmentos nodais de *Myrtus communis* foi obtido em meio WPM, dos observados por Coelho (1999)

que, ao estudar o efeito dos meios básicos MS e WPM sobre o desenvolvimento de segmentos nodais de sucupira-branca (*Pterodon pubescens*), também verificou a superioridade do meio WPM e dos de Bertolucci (2000), que ao verificar o tamanho médio de brotações formadas de segmentos nodais de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata*), ao comparar os meios MS, MS/2 e WPM, verificou um incremento de 30% no tamanho das brotações em meio WPM quando comparado ao meio MS.

Por outro lado, esses dados diferem dos dados obtidos por Chen, et al. (1995) com *Eucommia ulmoides*, que ao compararem o meio MS e WPM, ambos adicionados de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 3% de sacarose, registraram que o meio MS foi superior para a cultura de brotos apicais obtidos de plântulas com 1 mês de idade e que os brotos foram mais verdes e vigorosos no meio MS, o que mostra a importância do genótipo na resposta aos diferentes meios utilizados (Sato et al., 1999).

Observou-se um desenvolvimento maior dos segmentos nodais inoculados em meio WPM. Os meios MS e WPM diferem principalmente na concentração de macro e micronutrientes, sendo o meio MS um meio mais concentrado. Esse fato pode ser atribuído a uma fitotoxidez causada pela alta concentração de nitrato de amônia (Sato et al., 1999).

Quanto à análise de regressão (Figura 3), verifica-se que, dentro do meio MS, o efeito dos níveis crescentes de BAP foi linear sobre o tamanho de brotações, ao passo que, dentro do meio WPM, o efeito foi do tipo senoidal, ambos com coeficientes de determinação altos, ou seja, 86,45 e 99,13%, respectivamente. No presente trabalho, o maior tamanho de brotos foi obtido em meio WPM, suplementado com 6,0 mg.L⁻¹ de BAP. Os dados alcançados no presente estudo diferem dos verificados por Chen, et al. (1995) com brotos apicais, já que esses autores verificaram que doses superiores a 3,0 mg.L⁻¹ de BAP em meio MS resultou numa diminuição do comprimento dos brotos.

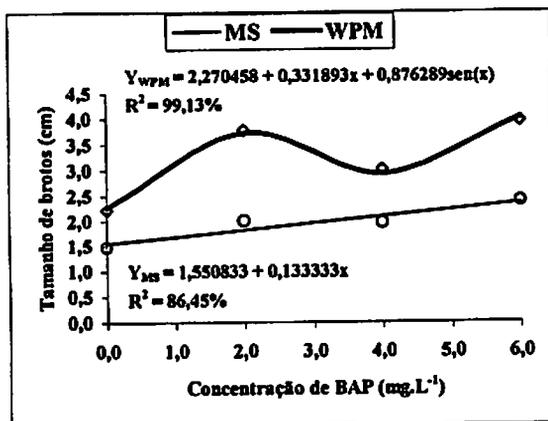


FIGURA 3. Tamanho de brotação de *Rudgea viburnoides* em meio MS e WPM, em função das concentrações de BAP. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Por outro lado, Andrade et al. (2000) constataram um efeito significativo do BAP na concentração de até 4,5 mg.L⁻¹ em meio MS modificado sobre o comprimento de brotação (apical e nodal) de *Myracrodruon urendeuva*, tendo um comportamento linear, mas foi na concentração de 4,5 mg.L⁻¹ que obtiveram a maior média (6,3 cm), e a partir da qual observaram uma tendência de queda no comprimento da parte aérea.

Diversos trabalhos mostram a redução do comprimento dos brotos com base em dada concentração de BAP. Pereira et al. (1995) observaram este efeito com concentrações superiores a 13,3 µM (3,0 mg.L⁻¹) em brotos axilares de *Maytenus ilicifolia*. Por outro lado, Chebel et al. (1998), ao avaliarem concentrações de 0,0 a 30,8 µM de BAP (7,0 mg.L⁻¹), concluíram que o maior comprimento de brotos de *Minthostachys mollis* ocorreu em meio MS/2 sem regulador de crescimento ou na concentração de 2,2 µM de BAP (0,5 mg.L⁻¹), mas, nas doses superiores de BAP houve uma redução do comprimento. Os pesquisadores deduziram ainda que o comprimento de brotos foi geralmente inverso ao número de brotos. Pereira et al. (2000), com *Salix humboldtiana* em

meio MS suplementado com concentrações de 0,8 a 22,2 μM de BAP, verificaram a superioridade da menor concentração de BAP (0,18 mg.L^{-1}). Conceição (2000), com *Derris* sp., registrou o maior tamanho de brotos em explante nodal nas concentrações 0,0 a 4,0 mg.L^{-1} de BAP com 3% de sacarose com tendência quadrática e uma redução significativa do crescimento em concentrações superiores a 1,0 mg.L^{-1} de BAP.

De acordo com Gratapaglia & Machado (1998), a tendência de diminuição do comprimento da brotação a partir de determinada concentração pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de parte aérea até uma dada concentração, o que é específico para cada espécie e, a partir dessa, ocorre um efeito tóxico, que se caracteriza principalmente pelo estufamento excessivo, falta de alongamento das culturas, encurtamento dos entrenós, espessamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento. Pode-se deduzir com base nos resultados observados, que *Rudgea viburnoides* é uma cultura que se beneficia da adição de BAP, sendo tolerante a altas concentrações, ocorrendo alongamento, sem a necessidade da adição de auxina exógena.

Vários estudos relatam o efeito sinérgico da combinação de citocininas e auxinas sobre a multiplicação de brotos e alongamento. Pereira et al. (1995), com *Maytenus ilicifolia*, ao compararem o efeito da adição ou não de AIA, observaram que a adição de 1,1 μM (0,2 mg.L^{-1}) de AIA ao meio MS aumentou significativamente o comprimento dos brotos em todos os níveis de BAP (0,0 a 6,0 mg.L^{-1} de BAP). Ajithkumar & Seenii (1998), com *Aegle marmelos*, verificaram que a combinação de 2,5 mg.L^{-1} de BAP e 1,0 mg.L^{-1} de AIA em meio MS induziu a formação de um número ótimo (12,1) de brotos vigorosos e longos (5,2 cm). Sudha, et al. (1998), com *Holostemma annulare*, observaram que a maior resposta em comprimento de brotos (6,0 a 6,5 cm) ocorreram em meio MS suplementado com 8,86 μM (2,0 mg.L^{-1}) de BAP e 0,27 μM (0,05

mg.L⁻¹) de ANA. Dhar, et al. (2000), com *Pittosporum napaulensis* em meio MS, suplementado com BAP (1,13 mg.L⁻¹) e ANA (0,019 mg.L⁻¹), obtiveram a maior proliferação de gemas, número de brotos e comprimento.

Os resultados obtidos para o comprimento de brotos e estimativa de segmentos nodais total indicam que houve alongamento dos brotos e dos entrenós, sem a necessidade de adição de auxinas.

Com relação à ETRSN, ou seja, os segmentos nodais com aproximadamente 10 mm de comprimento e gemas na porção superior (Tabela 3), verificou-se a superioridade do meio WPM, que apresentou uma média geral de rendimento de segmentos nodais de 4,13 segmentos/explantes superior aos 3,30 do meio MS. Resultados semelhantes foram observados por Parra & Amom-Marco (1998). Eles trabalharam com segmentos nodais oriundos de plântulas de *Myrtus communis* e ao compararem na oitava semana o número de segmentos nodais com 8 semanas com mais de 0,5 cm, obtidos nos meios MS, MS/2, MS com metade do nitrato de amônio e WPM, concluíram que o meio WPM foi superior quanto ao número de segmentos nodais (9,4 segmentos com 0,5 cm de tamanho/explante).

TABELA 3. Médias gerais da estimativa de rendimento total de segmentos nodais (ERTSN), em segmentos nodais por explantes de *Rudgea viburnoides* submetidos aos diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios básicos	ETRSN (Nº) ¹
MS	3,30 b
WPM	4,13 a

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Quanto à análise de regressão (Figura 4), verifica-se que as concentrações de BAP tiveram em efeito linear positivo sobre a ETRSN. Por

meio desses resultados, pode-se inferir que, para cada mg.L^{-1} de BAP que se adicionar, espera-se um aumento médio de 0,586 segmentos nodais/explante. Contudo, esses resultados diferem dos obtidos por Sudha, et al. (1998) que, ao estudarem as concentrações de 0,2 a 2,0 mg.L^{-1} de BAP, obtiveram o maior número de segmentos nodais (propágulos) com a concentração de 0,5 mg.L^{-1} de BAP (3 propágulos/explante), a partir da qual observaram um decréscimo. Os pesquisadores verificaram, ainda, que o rendimento foi superior quando da combinação dessa concentração com 0,05 mg.L^{-1} de ANA (7 propágulos/explante).

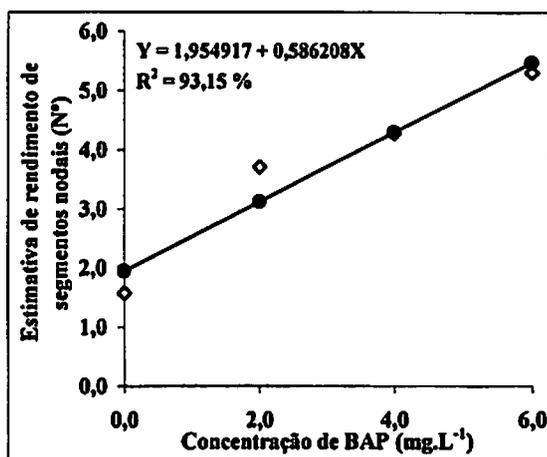


FIGURA 4. Estimativa do rendimento total de segmentos nodais (ETRSN) de *Rudgea viburnoides*, em função das diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Os resultados das análises de variâncias para o peso de matéria fresca de brotos e matéria seca de brotos são apresentados na Tabela 4. Verifica-se que para o peso de matéria fresca de brotos, somente foi significativo o fator regulador, e para o peso de matéria seca de broto, os efeitos do meio e do regulador foram significativos.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para o peso de matéria fresca de brotos (PMFB) e peso de matéria seca de brotos (PMSB) obtidos a partir de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras –MG. 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFB (g)	PMSB (g)
Meio	1	0,050097 ^{NS}	0,001004 *
BAP	3	0,132865 **	0,002912 **
Meio x BAP	3	0,009709 ^{NS}	0,000243 ^{NS}
Resíduo	40	0,015194	0,000240
Média	-	0,12	0,02
C.V. (%)	-	102,41	85,15

¹NS, *, ** = Valor do teste F não significativo, significativo a 5% e significativo a 1%, respectivamente.

Pelos valores médios da Tabela 5, infere-se que não houve diferença significativa entre os meios quanto ao peso de matéria fresca de brotos. Contudo, para o peso de matéria seca, o meio básico WPM proporcionou maior peso que o MS, contrastando com os resultados observados por Bertolucci (2000), que não observou diferença no peso de matéria seca de brotações ao comparar os meios MS, MS/2 e WPM, aos 45 dias.

TABELA 5. Valores médios de peso de matéria fresca de brotos (PMFB) e peso de matéria seca de brotos (PMSB) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos aos diferentes meios de cultura¹. UFLA, Lavras – MG, 2002

Meios básicos	PMFB (g)	PMSB (g)
MS	0,088 a	0,014 b
WPM	0,153 a	0,023 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Com relação à análise de regressão, verifica-se que os níveis crescentes de BAP tiveram um efeito linear positivo sobre o peso de matéria fresca de

brotos (Figura 5) e peso de matéria seca de brotos (Figura 6), permitindo-se inferir que se espera um aumento médio de 0,0248 g e de 0,0060 g, respectivamente, para cada incremento de uma unidade que se aumentar na concentração de BAP.

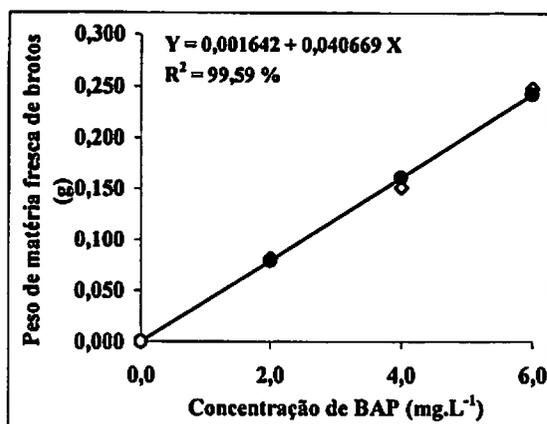


FIGURA 5. Efeito de níveis crescentes de BAP sobre o peso de matéria fresca de brotos em *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

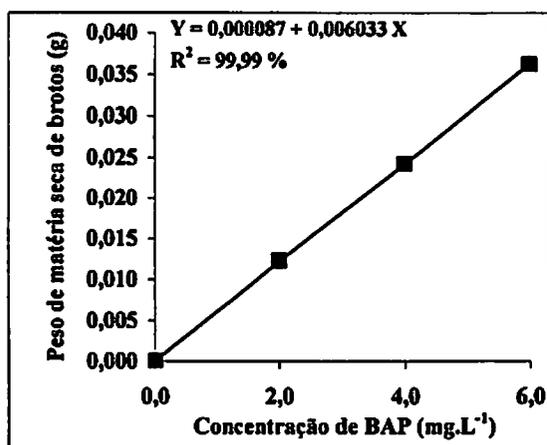


FIGURA 6. Efeito de níveis crescentes de BAP sobre o peso de matéria seca de brotos em *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Resultados semelhantes foram alcançados em timbó por Conceição (2000), quando comparou o meio MS com 3% de sacarose, 0,7% de ágar com e sem BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e verificou que a presença de BAP acarretou um aumento significativo nessas variáveis.

Os dados referentes ao peso de matéria seca de brotos obtidos neste trabalho diferem dos verificados por Bertolucci (2000), que não obteve diferença quanto ao peso seco de parte aérea ao estudar as concentrações de 0,0; 0,5 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP em meio WPM. No presente trabalho, o peso de matéria fresca e de matéria seca tiveram um efeito linear. Forni & Pasqual (1996) também verificaram o efeito linear do BAP sobre o peso de matéria seca de parte aérea de café nas concentrações de 0,0 a $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Neste estudo, a concentração de BAP mais eficiente para essas variáveis foi a de $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$, provavelmente pelo maior número de brotações, uma vez que se aumentando o número de brotos, maior será o peso da matéria fresca e seca das brotações.

No tratamento com $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, principalmente no meio WPM, os brotos apresentaram-se com aspecto hiperhídrico, caules engrossados, certo grau de clorose e necrose de folhas. Sudha et al. (1998) também observaram efeitos negativos do BAP em concentrações de 3,0 a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$. O uso de citocininas estimula um maior desenvolvimento da parte aérea; contudo, quando utilizadas em excesso, tornam-se tóxicos e caracterizam-se principalmente pelo demasiado entufamento e falta de alongamento, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos internos, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (Lane, 1979; Leshem et al., 1988, citados por Grattapaglia & Machado, 1998).

Os resultados de análise de variância para o peso de matéria fresca e seca de calos estão apresentados na Tabela 6. Verifica-se que o peso de matéria fresca de calo foi afetado pelos meios de cultura e pelas concentrações de BAP,

mas não pela interação, ao passo que, para o peso de matéria seca de calos, a interação foi também significativa.

TABELA 6. Resumo da análise de variância para o peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) formado na base dos segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFC (g)	PMSC (g)
Meio	1	0,507030 **	0,048019 **
BAP	3	0,395303 **	0,028349 **
Meio x BAP	3	0,023520 ^{NS}	0,006636 **
Resíduo	40	0,013780	0,000927
Média	-	0,30	0,06
C.V. (%)	-	39,14	50,79

¹NS, ** = Valor do teste F não significativo e significativo a 1%, respectivamente.

Pelos valores médios (Tabela 7) para a variável peso de matéria fresca de calo, infere-se pelo teste F, que no meio WPM houve um maior estímulo à produção de calo.

TABELA 7. Valores médios de peso de matéria fresca de calos (PMFC) formado na base dos segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002

Meios básicos	PMFC (g)
MS	0,197 b
WPM	0,403 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

Por meio da análise de regressão para o peso de matéria fresca de calo, deduz-se um efeito linear dos níveis crescentes de BAP (Figura 7), esperando-se

um incremento médio de 0,069 g no PMFC para cada aumento de uma unidade de BAP.

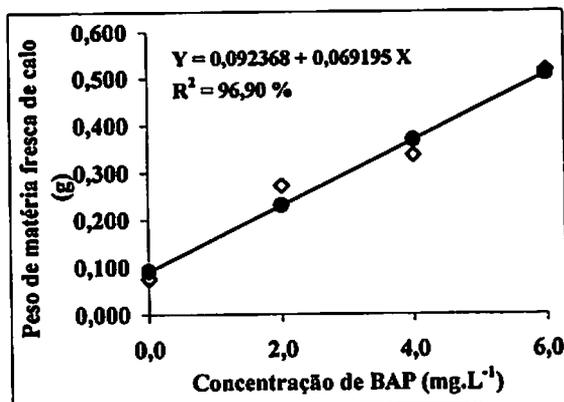


FIGURA 7 – Efeito de concentrações de BAP sobre o peso de matéria fresca de calos formados na base dos segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Pelos valores médios (Tabela 8), para o peso de matéria seca de calos, observa-se que o meio WPM induziu uma maior produção de matéria seca de calo dentro dos níveis de BAP, exceto para o nível zero.

TABELA 8. Valores médios de peso de matéria seca de calos (g) formados na base dos segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002

Meios	BAP (mg.L ⁻¹)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
MS	0,004 a	0,019 b	0,027 b	0,063 b
WPM	0,024 a	0,058 a	0,093 a	0,191 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, comparam os meios dentro de cada concentração de BAP e diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Quanto à análise de regressão (Figura 8), os níveis crescentes de BAP tiveram um efeito linear sobre o peso de matéria seca de calos dentro dos meios MS e WPM, com coeficientes de determinação altos, 90,61 e 92,08%, respectivamente). As estimativas dos coeficientes de regressão fornecem informações de que no meio WPM houve maior formação de calos do que no meio MS, o que neste experimento não é desejável. Comparando-se os valores 0,0268 g (WPM) com 0,00928 (MS), verifica-se uma maior formação de calo em termos de peso de matéria seca no meio WPM.

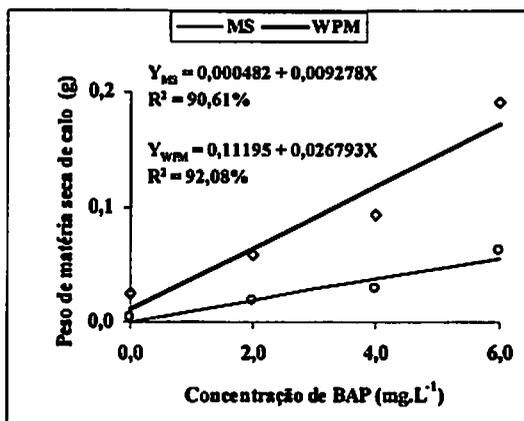


FIGURA 8. Efeito de níveis crescentes de BAP sobre o peso de matéria seca de calo formado na base dos segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* em meio MS e WPM. UFLA, Lavras - MG, 2002.

No presente trabalho, foram verificados a indução de brotos axilares e o entumescimento do caule na extremidade do corte com a emissão de brotos adventícios e a posterior formação de calos. Sudha et al. (1998), estudando *Holostema annulare* em meio MS suplementado com BAP na concentração de 0,0 a 5,0 mg.L⁻¹, também detectaram que a regeneração de brotos em todos os casos foi seguida por entumescimento e subsequente formação de calo na extremidade basal do corte dos explantes.

Ainda, observou-se neste trabalho, que não houve ocorrência de indução de enraizamento, tanto nos meios não suplementados, como nos suplementados com BAP, o que era de se esperar, pois altas concentrações de citocininas induzem a formação de brotações, mas, geralmente, inibem a formação de raízes, conforme Pierik (1987), citado por Bertolucci (2000).

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao número de brotações axilares e brotações adventícias é apresentado na Tabela 9.

TABELA 9. Resumo da análise de variância para número de brotações axilares (BAx) e número de brotações adventícias (BA_d) obtidas de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias de cultivo em meio MS e WPM, submetidos a níveis crescentes de BAP e classificados quanto ao tamanho em brotações < 1 e > 1 cm. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		BAx (N ^o)	BA _d (N ^o)
Meio	1	0,081667 ^{NS}	32,900417 **
BAP	3	0,964444 *	58,825972 **
Tamanho	1	0,960000 ^{NS}	183,153750 **
Meio x BAP	3	0,206111 ^{NS}	9,260417 *
Meio x Tamanho	1	3,681667 **	0,070417 ^{NS}
BAP x Tamanho	3	0,657778 ^{NS}	22,531528 **
Meio x BAP x Tam.	3	0,055000 ^{NS}	5,443750 ^{NS}
Resíduo	80	0,243000	2,893750
Média	-	0,83	2,17
C.V. (%)	-	59,15	78,29

¹NS, *, ** = Valor do teste F não significativo, significativo a 5% e significativo a 1% respectivamente.

Conceição (2000), comparando o meio MS com 3% de sacarose, 0,7% de ágar com e sem BAP (2,0 mg.L⁻¹), verificou que a presença de BAP acarretou um aumento significativo nessas variáveis.

Pela análise de regressão para o número de brotações axilares, concluiu-se que as doses crescentes de BAP tiveram um efeito positivo até a

dose de 1,2 mg.L⁻¹, com um número de brotações axilares de 1,1 broto, a partir da qual níveis crescentes de BAP induziram menor número de brotações axilares (Figura 9).

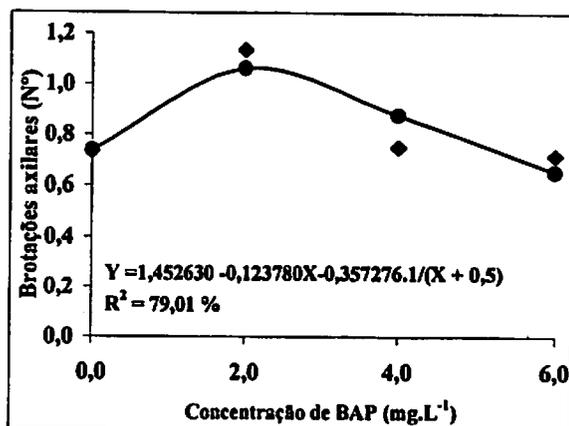


FIGURA 9. Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações axilares em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Observando-se as comparações mostradas na Tabela 10, verifica-se que no meio MS houve uma predominância de brotações < 1,0 cm (0,90 no meio MS contra 0,57 no meio WPM), e no meio WPM houve uma predominância de brotações > 1,0 cm (0,71 no meio MS contra 1,16 no meio WPM).

TABELA 10. Médias do número de brotações axilares conforme o tamanho em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meio	Tamanho		Média geral
	< 1,0	> 1,0	
MS	0,90 a	0,71 b	0,80
WPM	0,57 b	1,16 a	0,86

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura são diferentes pelo teste F ao valor nominal de 5% de probabilidade.

Comparando-se o número de brotações adventícias dos meios MS e WPM dentro de cada dose de BAP, verifica-se a superioridade do meio WPM dentro da dose de 4,0 mg.L⁻¹, com 4,57 brotações adventícias no meio WPM e 1,68 no meio MS (Tabela 11) e, também, na dose de 6,0 mg.L⁻¹.

Na concentração 4,0 mg.L⁻¹ ocorreram os maiores percentuais de indução de brotos adventícios, com 70% e 80% para os meios MS e WPM, respectivamente (Tabela 11).

TABELA 11. Médias dos meios MS e WPM para número de brotações e porcentagem de indução de brotações adventícias em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. Dados transformados para Raiz quadrada de Y + 1,0. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios	BAP (mg.L ⁻¹)				Média geral
	0,0	2,0	4,0	6,0	
MS	(0) ² 0,00 a	(54) 1,78 a	(70) 1,68 b	(61) 2,88 b	1,59
WPM	(0) 0,00 a	(42) 2,38 a	(80) 4,57 a	(76) 4,08 a	2,76

¹ Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam que os meios diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade, dentro dos níveis de BAP considerados.

² Número entre parêntese refere-se à porcentagem de indução de brotos.

A análise de regressão para o efeito do BAP dentro dos meios de cultura indica um efeito linear positivo para o meio MS, aumentando-se o número de brotações adventícias até a concentração máxima, e um efeito quadrático dentro do meio WPM, aumentando-se o número máximo de brotações até a concentração de 5,0 mg.L⁻¹, no qual estima-se em 4,4 o número de brotações adventícias. Ambos os coeficientes de determinação foram altos, isto é, 86,07% e 97,62%, respectivamente, para os meios MS e WPM (Figura 10).

O meio WPM no nível de 4,0 mg.L⁻¹ de BAP propiciou os melhores resultados, notavelmente no que diz respeito ao número de brotações adventícias, principal componente dos brotos totais.

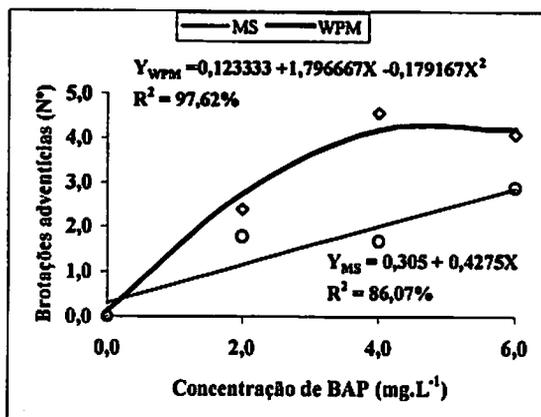


FIGURA 10. Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações adventícias em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* em meio MS e WPM. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Conforme Grattapaglia & Machado (1990), o BAP é muito eficaz para promover a multiplicação de brotos e indução de gemas adventícias em várias espécies. No presente trabalho, o BAP, na concentração de até 4,0 mg.L⁻¹ no meio WPM, foi eficiente na indução de brotações múltiplas, sendo essa expressa principalmente em número de brotos adventícios. Comparável aos resultados obtidos por Jain & Nesler (1996), ao avaliarem o efeito de concentrações de 0,5 a 8,0 mg.L⁻¹ de BAP em meio WPM sobre a propagação clonal de *Camptotheca acuminata*, foi obtido o máximo de brotações com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP (2,9 brotos com 52,5% de frequência), a partir da qual houve uma redução, sendo 2,4 brotos com frequência de 20% na concentração de 6,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Por outro lado, pelos dados obtidos, levanta-se a possibilidade da necessidade da presença de auxinas para induzir a proliferação de brotos axilares, o que é salientado por alguns autores, como Arnand, et al. (1999), que utilizando meio MS suplementado com os micronutrientes do meio WPM, concluíram que a presença de auxina em baixas concentrações é, algumas vezes, favorável para uma ótima multiplicação de brotos em plantas lenhosas, o que

contradiz o verificado por Lisowska & Wysokinska (2000), em que a adição de AIA (0,1 mg.L⁻¹) aos meios SH e WPM principalmente com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP em meio WPM conduziu a um decréscimo na proliferação de brotos, mas melhorou o alongamento dos brotos, e Coelho (1999), em meio MS/2, não recomenda a utilização da combinação de BAP com ANA na indução de brotações múltiplas de sucupira-branca.

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao número de brotações totais (brotações axilares + brotações adventícias) é mostrado na Tabela 12. Percebe-se que o meio, o BAP, o tamanho e a interação BAP x tamanho tiveram efeito significativo sobre o número de brotações totais.

TABELA 12. Resumo da análise de variância para número total de brotações (NTB) obtidas de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias de cultivo em meio MS e WPM, submetidos a níveis crescentes de BAP e classificados quanto ao tamanho em < 1 e > 1 cm. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹
		BT (Nº)
Meio	1	36,260417 **
BAP	3	59,121528 **
Tamanho	1	157,593750 **
Meio x BAP	3	8,213750 ^{NS}
Meio x Tamanho	1	2,733750 ^{NS}
BAP x Tamanho	3	16,353750 **
Meio x BAP x Tam.	3	5,813750 ^{NS}
Resíduo	80	3,188750
Média	-	3,01
C.V. (%)	-	59,40

¹NS, ** = Valor do teste F não significativo e significativo a 1%, respectivamente

Observando-se as médias do número de brotações totais (Tabela 13), verifica-se a superioridade do meio WPM, e esse meio teve aproximadamente 52% mais brotos do que o meio MS (3,62 brotos contra 2,39). Resultados

semelhantes foram obtidos por Coelho (1999) com sucupira-branca, que também, verificou a superioridade do meio WPM. Contudo, esses resultados diferem dos observados por Chen, et al. (1995), quando compararam os meios MS e WPM suplementados com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e 3% de sacarose, que apesar de terem evidenciado a superioridade do meio MS, não observaram diferença entre os meios quanto ao escurecimento e vitrificação dos tecidos. Eles verificaram que o meio MS suplantou o meio WPM, possibilitando dobrar o número de novos brotos (7,8 vs. 3,2 do meio WPM), e dos verificados por Dhar, et al. (2000) que verificaram a superioridade do meio MS sobre os meios WPM, MS/2 e B5. Bertolucci (2000) com *Tournefortia cf paniculara* que não obteve diferença entre os meios MS, MS/2 e WPM avaliados aos 30 e 45 dias.

TABELA 13. Médias do número total de brotações em meio MS e WPM de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios	NTB
MS	2,39 b
WPM	3,62 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que os meios de cultura diferem entre si pelo teste F a 1% de probabilidade.

As médias do número de brotações totais na interação BAP x tamanho indica a predominância de brotos < 1,0 cm sobre os brotos > 1,0 (Tabela 14), sendo que o maior número de brotos foi alcançado no maior nível de BAP. Os dados contrastam com os alcançados aos 90 dias por Pasqual & Barros (1991), os quais encontraram um maior número de brotos > 1,0 cm com o uso de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP no cafeeiro em meio MS.

TABELA 14. Médias para o número de brotações totais < 1,0 e > 1,0 cm no desdobramento da interação BAP x tamanho em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de BAP¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Tamanho	BAP (mg.L ⁻¹)			
	0,0	2,0	4,0	6,0
< 1	0,83 a	4,57 a	5,60 a	6,15 a
> 1	0,63 a	1,87 b	2,15 b	2,25 b

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade, em cada um dos níveis de BAP considerados.

Por meio da análise de regressão, verifica-se que os níveis crescentes de BAP tiveram um efeito quadrático significativo sobre os brotos totais < 1,0 cm (Figura 11) e um efeito não-significativo para o número de brotos totais > 1,0 cm. O número máximo de brotos < 1,0 cm (6,22 brotos) foi obtido na dose de 5,1 mg.L⁻¹ de BAP; portanto, a proliferação de brotos foi proporcional à concentração de BAP utilizada. Contudo, Pasqual & Barros (1992), com *Stryphnodendron adstringen* (barbatimão), obtiveram a maior proliferação de brotos com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP em meio MS, mas o maior número de brotos > 1,0 cm foi observado na ausência do regulador. Por outro lado, concentrações menores têm sido indicadas como mais eficientes. Arello e Pinto (1993), com *Kielmeyera coriacea*, obtiveram a maior proliferação de brotos > 1,0 cm na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP e Pinto et al. (1994), obtiveram com a mesma espécie, a maior porcentagem de brotos > 1 cm com segmentos nodais em comparação aos apicais e a melhor porcentagem de brotos > 1,0 cm foi alcançada com a concentração de 0,5 mg.L⁻¹, ambos em meio MS.

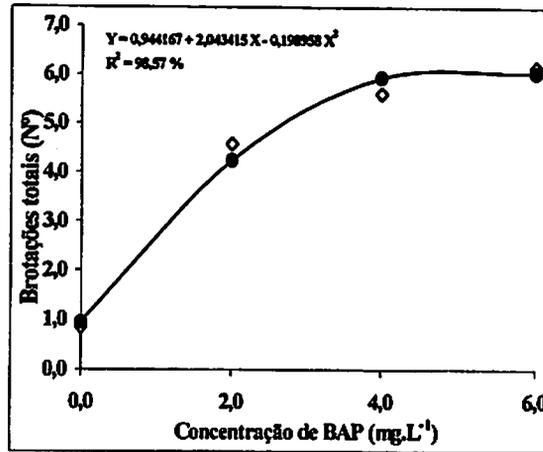


FIGURA 11. Efeito da concentração de BAP sobre o número de brotações totais < 1,0 cm em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

O número de brotações totais, para o tamanho > 1,0 cm, apresentou um comportamento crescente em função da concentração de BAP. O maior aumento ocorreu da dose zero para a dose 2,0 mg.L⁻¹. O número de brotações totais > 1,0 cm obtido (2,15) com 4,0 mg.L⁻¹ não diferiu do número obtido (2,25) com 6,0 mg.L⁻¹. Contudo, o BAP, na concentração de 6,0 mg.L⁻¹, determinou características não desejáveis nos brotos, como o engrossamento exagerado dos caule, vitrificação, amarelecimento, etc. Essas características provavelmente resultantes do efeito tóxico do BAP, levando a sérios problemas na fase de enraizamento (Lane, 1979; Leshem et al., 1988, citados por Grattapaglia & Machado, 1988).

Um outro fator a ser considerado é que sempre são indicados níveis reduzidos de reguladores de crescimento com o objetivo de minimizar a variação clonal (Pereira et al., 2000) e possível efeito residual do BAP, o que poderia interferir nas etapas seguintes de multiplicação (Hoffmann et al., 1998).

Nas Figuras 12 e 13 observam-se os efeitos do BAP na indução de brotos em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* obtidos de plântulas originadas de embriões zigóticos e inoculados em meio MS e WPM, respectivamente e suplementados com 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ de BAP.

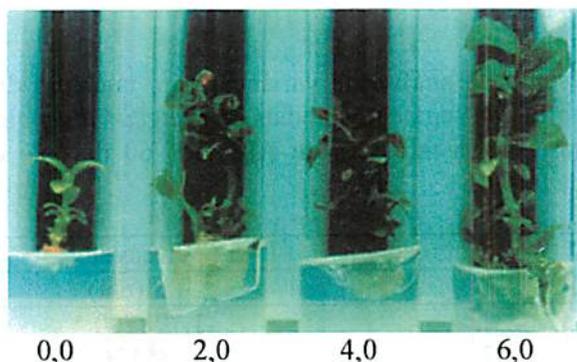


FIGURA 12. Aspecto geral aos 60 dias de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2002.

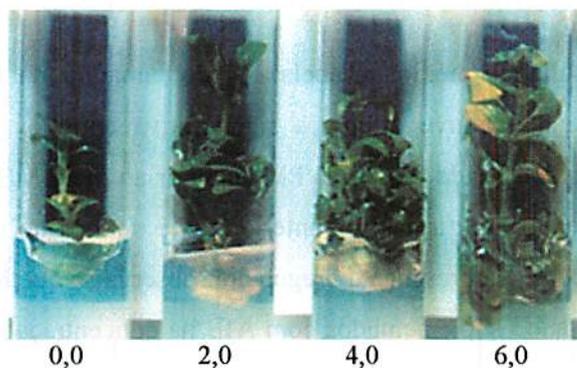


FIGURA 13. Aspecto geral aos 60 dias de segmentos nodais inoculados em meio WPM suplementado com 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 mg.L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2002.

4.2 Efeito do AIB adicionado aos meios MS/2 e WPM sobre a indução de enraizamento de brotações de *Rudgea viburnoides*.

O resumo da análise de variância referente aos dados de tamanho de broto encontra-se na Tabela 15. Nota-se que o efeito do meio e a interação Meio x AIB sobre essa variável foi significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 15. Resumo da análise de variância para tamanho de brotação (Nº) obtido de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variável ¹
		TB (cm)
Meio	1	1,778700 *
AIB	3	0,585156 ^{NS}
Meio x AIB	3	0,868600 *
Resíduo	40	0,273758
Média	-	1,66
C.V. (%)	-	31,42

¹NS, * = Valor do teste F não significativo e significativo a 5% respectivamente

Pelos resultados médios (Tabela 16) do tamanho de broto nos dois meios, conclui-se que houve diferença significativa entre os dois meios na ausência de regulador, sendo o meio WPM superior ao meio MS/2 (2,41 contra 1,56 cm). Esses dados confirmam os anteriormente obtidos no experimento de indução de brotações. Na presença do regulador, observa-se que houve diferença entre os meios quando suplementados com AIB na concentração de 1,0 mg.L⁻¹, e, sendo que mais uma vez o meio WPM superou o MS/2.

Por outro lado, pela análise de regressão, pôde-se verificar que os níveis crescentes de AIB tiveram comportamento diferenciado sobre o tamanho de broto nos dois meios. No meio MS/2, estas concentrações tiveram um efeito linear ligeiramente positivo, mas não significativo, com um coeficiente de determinação muito baixo (6,61%), e média geral de 1,47 cm de tamanho de

broto. No meio WPM (Figura 14), essas mesmas doses tiveram um efeito linear negativo i.e., e o tamanho de brotação teve uma redução conforme o incremento dos níveis de AIB. De acordo com Pereira et al. (2000), o menor crescimento da parte aérea é uma resposta típica dos explantes cultivados em meio suplementado com AIB.

TABELA 16. Médias da interação Meio x AIB para tamanho de brotações (cm) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios básicos	AIB (mg.L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
MS/2	1,56 b	1,44 a	1,23 b	1,66 a
WPM	2,41 a	1,79 a	1,92 a	1,30 a

¹Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam que os meios diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade, nas concentrações de BAP consideradas.

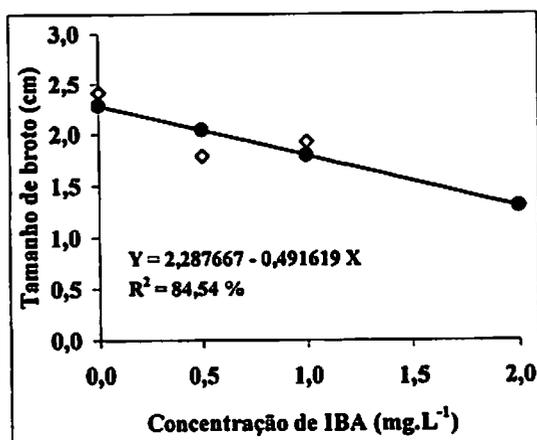


FIGURA 14. Efeito da concentração de AIB sobre o tamanho de broto de *Rudgea viburnoides* em meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Pelo, resumo do resultado da análise de variância dos dados concernentes ao peso de matéria fresca e peso de matéria seca de parte aérea apresentado na Tabela 17, deduz-se que para o peso de matéria fresca, somente foi significativo o efeito do meio, e para o peso de matéria seca, somente o efeito do regulador.

TABELA 17. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca de parte aérea (PMFPA) e peso de matéria seca de parte aérea (PMSPA) obtidos a partir de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFPA (g)	PMSPA (g)
Meio	1	0,021412 *	0,000030 ^{NS}
AIB	3	0,004048 ^{NS}	0,001064 *
Meio x AIB	3	0,004925 ^{NS}	0,000252 ^{NS}
Resíduo	40	0,004562	0,000252
Média	-	0,12	0,03
C.V. (%)	-	54,55	57,58

¹NS, * = Valor do teste F não significativo e significativo a 5% respectivamente

As médias do peso de matéria fresca indicam o meio WPM como superior ao meio MS/2 (Tabela 18).

TABELA 18. Médias do peso de matéria fresca de parte aérea (PMFPA) e peso de matéria seca de parte aérea (PMSPA) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios básicos	PMFPA (g)	PMSPA (g)
MS/2	0,103 b	0,027 a
WPM	0,144 a	0,028 a

¹ Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam que os meios diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Por outro lado, no que diz respeito ao peso de matéria seca, verifica-se pelo teste F que não houve diferença significativa entre os meios. Portanto, o maior tamanho do broto somente se refletiu sobre o peso de matéria fresca, indicando uma maior hidratação do tecido no meio WPM.

A análise de regressão para o peso de matéria fresca de parte aérea (Figura 15) indica um efeito linear negativo para o peso de matéria fresca de parte aérea e uma tendência a redução do peso de matéria seca de parte aérea (Figura 16), mesmo com o ajuste de uma regressão quadrática. Isso possibilita a dedução de uma coincidência entre os dados de peso de matéria fresca e seca obtidos, o que está de acordo com os dados de tamanho de brotação alcançados.

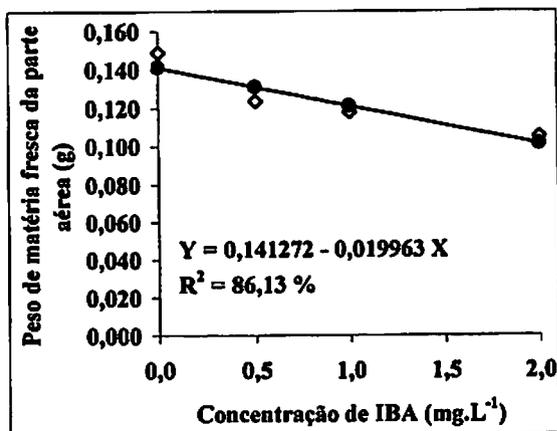


FIGURA 15. Efeito da concentração de AIB sobre o peso de matéria fresca da parte aérea de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

O resumo da análise de variância dos dados referentes ao peso de matéria fresca e peso de matéria seca de calo é apresentado na Tabela 19. Nota-se que para o peso de matéria fresca de calo foram significativos o AIB e a interação do

meio x AIB. Para o peso de matéria seca, a análise não detectou qualquer diferença significativa.

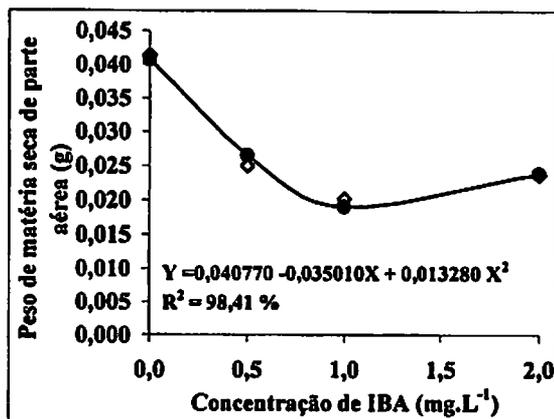


FIGURA 16. Efeito da concentração de AIB sobre o peso de matéria seca de parte aérea de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides*. UFLA, Lavras - MG, 2002.

TABELA 19. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) obtido de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG. 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFC (g)	PMSC (g)
Meio	1	0,012701 ^{NS}	0,000507 ^{NS}
AIB	3	0,041744 ^{**}	0,001497 ^{NS}
Meio x AIB	3	0,057195 ^{**}	0,000620 ^{NS}
Resíduo	40	0,008677	0,000755
Média	-	0,15	0,02
C.V. (%)	-	63,11	118,28

¹NS, ** = Valor do teste F não significativo e significativo a 1%, respectivamente

Pelos resultados médios do peso de matéria fresca de calo, verifica-se que houve uma diferença significativa entre as médias dos meios MS/2 e WPM na ausência de regulador (Tabela 20).

TABELA 20. Médias da interação meio*AIB para peso de matéria fresca de calo (PMFC) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios	AIB (mg.L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
MS/2	(85) ² 0,217 a	(96) 0,117 a	(100) 0,164 a	(100) 0,156 a
WPM	(100) 0,002 b	(91) 0,054 a	(96) 0,250 a	(100) 0,218 a

¹Médias seguidas de letras distintas nas colunas comparam os meios dentro de cada concentração de BAP e diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

²Números entre parêntese referem-se à porcentagem de indução de calos

Observa-se que na ausência de regulador, o meio MS/2 propiciou uma pequena formação de calo; no entanto, no meio WPM, praticamente foi inexistente. Por outro lado, verifica-se que o AIB teve efeito sobre a formação de calo na variável peso de matéria fresca de calo, mas os calos, no que se refere a peso fresco de matéria fresca, foram menores no meio WPM na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de AIB. Contudo, as diferenças detectadas entre os dois meios não foram significativas. No presente estudo, o enraizamento foi acompanhado de formação de calo, principalmente no meio WPM e nas concentrações acima de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB. Nas concentrações inferiores, os calos restringiam-se à extremidade do corte do broto e as raízes, diferenciaram-se lateralmente dos brotos pouco acima do local de formação do calo. Contudo, nas concentrações acima de 1,0 mg.L⁻¹, os calos ocorriam acima e as raízes, na maioria das vezes, surgiam desses. Observação semelhante foi relatada por Sudha & Seeni (1996). Nas concentrações maiores, o calo apresentava um maior crescimento, inclusive ocorrendo na região de formação das raízes, bem como

ocorrendo o surgimento de raízes da região do calo. A formação de calo na base dos explantes pode algumas vezes obstruir a conexão entre a plântula e as raízes (Thorpe et al., 1991, citados por França et al., 1995).

Contudo, segundo Monacelli et al. (1999), o enraizamento induzido por tratamentos com AIB ocorre por origem direta da divisão ativa das células cambiais, resultando no desenvolvimento de um sistema radicular funcional.

A análise de regressão para o peso de matéria fresca de calo dentro do meio MS/2 não foi significativa, e possivelmente à tendência a redução observada seja ao acaso. Contudo, o peso de matéria fresca no meio WPM infere que os níveis crescentes de AIB tiveram um efeito do tipo senoidal sobre o peso de matéria fresca de calo, sendo até a dose de 1,0 mg.L⁻¹ o efeito praticamente linear, a partir da qual parece ocorrer uma estabilização (Figura 17).

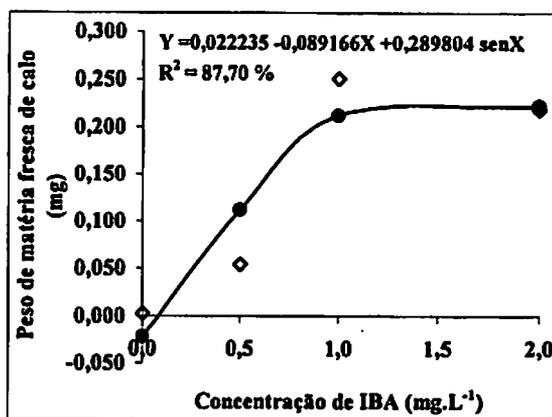


FIGURA 17. Efeito da concentração de AIB sobre o peso de matéria fresca de calo em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* em meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2002.

O uso de baixas concentrações de auxinas, em geral, induz a formação de raízes adventícias, ao passo que altas concentrações induzem a formação de calos. A combinação de concentrações de auxinas e citocininas também é muito utilizada para a indução de calogênese (Gomes, 1999, citado por Santos, 2001).

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao peso de matéria fresca de raiz e peso de matéria seca de raiz é apresentado na Tabela 21. Verifica-se que não houve efeito significativo em nenhuma das fontes de variação sobre as variáveis consideradas.

TABELA 21. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca de raiz (PMFR) e peso de matéria seca de raiz (PMSR) obtidos de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. Dados transformados: Raiz quadrada de Y + 0,5. UFLA, Lavras -MG. 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFR (g)	PMSR (g)
Meio	1	0,000080 ^{NS}	0,000002 ^{NS}
AIB	3	0,000105 ^{NS}	0,000007 ^{NS}
Meio x AIB	3	0,000009 ^{NS}	0,000005 ^{NS}
Resíduo	40	0,000048	0,000003
Média	-	0,71	0,71
C.V. (%)	-	0,97	0,26

¹NS = Valor do teste F não significativo

Na Tabela 22 estão apresentados os valores médios gerais dos meios de cultura para as variáveis PFMR e PMSR. Nota-se que os valores são muito próximos.

TABELA 22. Médias do peso de matéria fresca de raiz (PMFR) e peso de matéria seca de raiz (PMSR) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

Meios básicos	PMFR (g)	PMSR (g)
MS/2	0,713 a	0,709 a
WPM	0,716 a	0,709 a

O resumo do resultado da análise de variância para o número de raízes é registrado na Tabela 23.

TABELA 23. Resumo da análise de variância para número de raízes (NR) obtidos de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras –MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹
		NR (Nº)
Meio	1	8,416875 **
AIB	3	0,275883 NS
Meio x AIB	3	2,224147 **
Resíduo	40	0,492552
Média	-	1,11
C.V. (%)	-	63,32

¹NS, ** = Valor do teste F não significativo e significativo a 1%, respectivamente

Os resultados médios referentes ao número de raízes (Tabela 24) indicam que houve diferença significativa entre os meios e que o meio WPM superou o meio MS/2 no tratamento sem regulador, (1,81 contra 0,41 raízes/expante).

TABELA 24. Médias da interação Meio x AIB para número de raízes (NR) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Meios	AIB (mg.L ⁻¹)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
MS/2	(21,4) ² 0,41 b	(23,0) 0,45 b	(51,8) 0,85 a	(38,5) 1,04 a
WPM	(48,0) 1,81 a	(65,2) 2,18 a	(38,5) 1,07 a	(40,7) 1,04 a

¹ Médias seguidas de letras distintas nas colunas comparam os meios dentro de cada concentração de AIB e indicam que os meios diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

² Números entre parênteses referem-se à porcentagem de indução de enraizamento

Quanto à ocorrência de enraizamento em meio WPM e sem regulador, há concordância com o relato de Bertolucci (2000), que obteve enraizamento de *Tournefortia cf paniculata* em meio WPM, o que discorda do verificado por Santos (2001), que só obteve enraizamento de *Salix humboldtiana* em meio WPM com regulador (AIB) e carvão ativado.

De acordo com George (1996), citado por Santos (2001), o uso de auxinas no meio normalmente é responsável pela indução do enraizamento. No entanto, em algumas espécies, a rizogênese pode ocorrer sem a necessidade de adição de auxinas. Juliani et al. (1999), trabalhando com *Lippia junelliana* em meio MS, constataram um melhor enraizamento em termos de número de raízes/brotos e porcentagem de enraizamento em meio básico isento de regulador de crescimento.

O AIB na dose de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ induziu a formação do maior número de raízes e com maior frequência de indução de enraizamento (65,2%) no meio WPM (2,18 contra 0,45 raiz/explante no meio MS/2). Maiores concentrações passaram a ter um efeito inibitório sobre essa variável. Os dados observados coincidem com os obtidos por Deschamps et al (1993) com sarandi (*Sebastiania schottiana*), que obtiveram o maior número de explantes enraizados e maior número de raízes também com a concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB. Sudha & Seenii (1996) identificaram como ideal a dose de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB em meio MS na propagação *in vitro* de *Rauwolfia micrantha*, uma vez que níveis menores ($0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e maiores ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) inibiram as respostas ao enraizamento.

Contudo, Santos (2001) obteve o melhor resultado com uma dose maior ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB) no enraizamento de *Salix*.

Nas Figuras 18 e 19 observam-se aos 60 dias os efeitos do AIB no enraizamento de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* inoculados em meios MS/2 e WPM, respectivamente, suplementados com 0,0; 0,5; 1,0 e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB.

Nas Figuras 18 e 19 observam-se aos 60 dias os efeitos do AIB no enraizamento de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* inoculados em meios MS/2 e WPM, respectivamente, suplementados com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB.

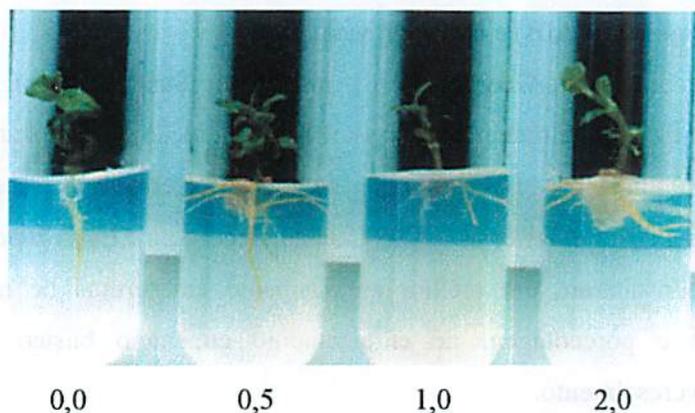


FIGURA 18. Aspecto geral aos 60 dias do enraizamento de segmentos nodais de *Rudgea Viburnoides* em meio MS/2 adicionado de AIB nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹. UFLA, Lavras – MG, 2002.

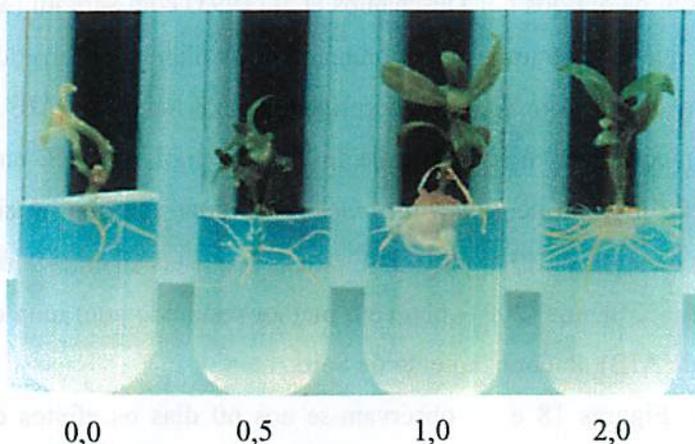


FIGURA 19. Aspecto geral aos 60 dias do enraizamento de segmentos nodais de *Rudgea Viburnoides* em meio WPM adicionado de AIB nas

incrementar a concentração de AIB, apesar de o efeito não ter sido significativo. No meio WPM, o maior número de raízes e frequência de indução de enraizamento foram obtidos com AIB na concentração de 0,5 mg.L⁻¹. A partir desta concentração, houve um decréscimo do número de raízes até a dose de 1,0 mg.L⁻¹, em que aparentemente o efeito inibitório estabilizou (Figura 20). Santos (2001) verificou efeito inibitório do AIB somente em concentrações acima de 3,0 mg.L⁻¹, ao trabalhar com *Salix humboldtiana* em meio WPM.

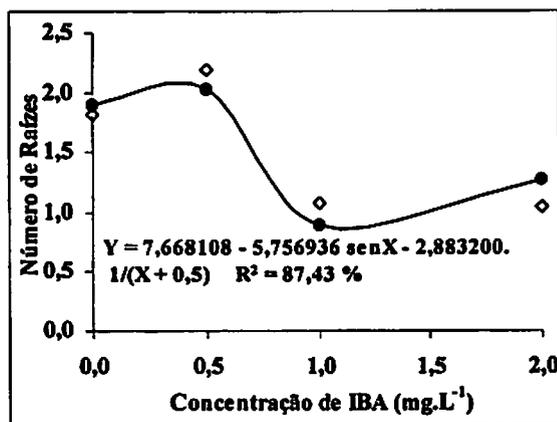


FIGURA 20. Efeito da concentração de AIB sobre o número de raízes em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* em meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Diversos autores obtiveram bons resultados com a utilização do meio MS diluído em várias proporções suplementado com AIB: Ajithkumar & Seeni (1998) com *Aegle marmelos*; Carvalho (1998) com *Bauhinia forficata*; Fidelis (1998) com *Brosimum guadichaudii* em meio líquido; Sudha, et al. (1998) com *Holostemma annulare*; Sansberro et al. (1999) com *Ilex paraguariensis*; Dhar, et al. (2000) com *Pittosporum napaulensis* em meio líquido e Sreekumar, et al. (2000) com *Hemidesmus indicus*.

O resultado da análise de variância dos dados relacionados ao número de raízes secundárias e tamanho de raízes é mostrado na Tabela 25. Observa-se que nenhuma das fontes de variação teve efeito significativo sobre as duas variáveis.

TABELA 25. Resumo da análise de variância para o número de raízes secundárias e tamanho de raízes (TR) obtidos a partir de segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetida a várias concentrações de AIB, aos 60 dias de cultivo. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios ¹	
		RS (Nº)	TR (cm)
Meio	1	6,855408 ^{NS}	0,376302 ^{NS}
AIB	3	1,262939 ^{NS}	0,149024 ^{NS}
Meio x AIB	3	3,429614 ^{NS}	0,333713 ^{NS}
Resíduo	40	1,937132	0,144580
Média	-	1,30	0,60
C.V. (%)	-	107,96	63,18

¹NS = Valor do teste F não significativo

Alguns autores relatam o efeito de níveis crescentes de AIB no incremento do comprimento de raízes. Sudha, et al. (1998), com *Holostemma annulare*, obteve aumento até o nível de 0,3 mg.L⁻¹ em meio MS.

Na Tabela 26 encontram-se os valores médios do número de raízes secundárias e tamanho de raiz em função dos meios de cultura. Verifica-se que os meios não afetaram as variáveis RS e TR; contudo, as médias do meio WPM foram ligeiramente maiores.

De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), durante a fase de enraizamento *in vitro*, uma toxidez de auxina pela alta concentração ou pelo longo período de exposição dos brotos ao meio indutor, poderia se manifestar somente na fase de alongamento das raízes, em que as raízes não continuariam seu crescimento.

TABELA 26 Médias do número de raízes secundárias (RS) e tamanho de raiz (TR) em segmentos nodais de *Rudgea viburnoides* submetidos a vários níveis de AIB¹. UFLA, Lavras – MG, 2002

Meios básicos	RS (Nº)	TR (cm)
MS/2	1,11 a	0,51 a
WPM	1,38 a	0,69 a

¹Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam que os meios diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para melhorar o alongamento das raízes *in vitro*, após a iniciação radicular, alguns pesquisadores transferem os brotos de um meio com auxina para um meio sem reguladores de crescimento (Silvir & Erez, 1980; James & Thurbon, 1981; Lameira, et al., 1994; citados por Costa da, 1995).

No presente trabalho, foi alcançada a indução de enraizamento em meio WPM e MS/2 isentos de carvão ativado e sem a necessidade de utilizar compostos antioxidantes, uma vez que o processo de oxidação comum em plantas lenhosas não foi observado.

Os meios MS/2 e WPM diferem entre si, principalmente pela concentração de nitrogênio (N₂), havendo uma alta proporção de N na forma de NH₄⁺ no meio MS, e a quantidade N é muito maior do que na maioria dos outros meios. Por outro lado, o meio WPM possui N com metade nessas formas, com uma relação NO₃⁻ /NH₄⁺ semelhante (Hoffman et al., 1998). De acordo com George (1993), é importante considerar o total de N₂ no meio e a razão de íons NO₃⁻ /NH₄⁺ para as diferentes espécies de plantas e tipo de cultura, uma vez que o conteúdo total de nitrogênio no meio constitui um fator crucial para o crescimento e a morfogênese.

7 CONCLUSÕES

- O tamanho de brotação aumenta em ambos os meios sem regulador de crescimento;
- A formação de calos ocorre nos meios MS e WPM sendo proporcional ao incremento do nível de BAP e maior no meio WPM;
- O meio WPM sem regulador de crescimento permite obter, em média, um broto axilar > 1,0 cm;
- O meio WPM apresenta uma média geral de rendimento total de segmentos nodais de 4,13 segmentos/explante;
- O maior número de brotos é obtido com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP no meio WPM;
- O meio WPM suplementado com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP mostra superioridade nas variáveis analisadas, com estimativa de rendimento de brotações adventícias de 4,57
- O AIB tem efeito negativo sobre o tamanho de brotação, peso de matéria fresca e seca de parte aérea em meio MS/2;
- Produção de calos maiores ocorre em meio MS/2, comparado ao WPM, quando isentos de regulador de crescimento;
- O meio WPM suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de AIB induz maior número de raízes com ocorrência mínima de calos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJITHKUMAR, D.; SEENI, S. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. *Plant Cell Reports*, Springer Verlag, v.17, n.422-426, 1998.

ANDRADE de, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; MELO de, P.R.A. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ARNAND, A.; RAO, C.S.; BALAKRISHNA, P. *In vitro* propagation of *Syzygium travancoricum* Gamble-an endangered tree species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.56, p.59-63, 1999.

ARELLO, E.F.; PINTO, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*. I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.25-31, 1993.

BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CALDAS, L.S. Cultura de tecidos e biotecnologia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1986. p.37-38.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-70.

CARVALHO de, R.N. Cultivo *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link. 1998. 52p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CHEBEL, A. del V.; KOROCH, A.R.; JULIANI JR., H.R.; JULIÁN, H.R.; TRIPPI, A.S. Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Grieseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant**, Columbia, v.34, p.249-251, 1998

CHEN, L.J.; HU, T.W.; HUANG, L.C. A protocol toward multiplication of the medicinal tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. **In Vitro Cell. Biol.-Plant**, Columbia, v.31, p.193-198, 1995.

COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth) Benth]. 1999. 119p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- CONCEIÇÃO, H.E.O. da; **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris* sp).** 2000. 191p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- COSTA da, M.P. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação.** 1995. 54p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade federal de Lavras, Lavras.
- DESCHAMPS, C.; PINTO, J.E.B.P.; INNECO, R.; SATO, A.Y.; RODRIGUES, B.M. **Estabelecimento e indução de rizogênese *in vitro* de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muel. Arg.).** *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.5, n.1, p.113, 1993.
- DHAR, U.; UPRETI, J.; BHATT, I.D. **Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson – a rare, endemic Himalayan medicinal tree.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.63, p.231-235, 2000.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. ***In vitro* propagation of paradox walnut rootstock.** *HortScience*, Alexandria, v.19, p.507-509, 1984.
- ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L.B.; DELAMARE, A.P.L.; ZENI, A.L.B.; CARRER, R. **Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais.** In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L de; (Coord.). *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.* Guaíba:Agropecuária, 2001. p.257-278.
- FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para windows versão 4.0.** In REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFScar, 2000. p.255-258.
- FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mamacadela) uma espécie considerada medicinal.** 1998. 109p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FORNI, R.C.; PASQUAL, M. **Influência da citocinina, BAP e concentrações dos componentes do meio “MS” na micropropagação do café “catuai”.** *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.20, n.4, p.468-474, 1996.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. (orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p.101-121.

FRANÇA, S.C.; DUARTE, I.B.; MORAES, R.M.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.42, p.291-293, 1995.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell. Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.

GEORGE, E.F. The components of culture media. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. England: Exergetics, 1993. Cap.9. p.275-285.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-170.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA/CNPH. 1998. v.1, p.183-260.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M; CARVALHO, G.R.; CHALFUN, N.N.J.; RAMOS, J.D. **Cultura de Tecidos - tecnologia e aplicações: aplicações na propagação de plantas**. Lavras:UFLA/FAEPE, 1998, 130p. (Curso de Pós-graduação: "Lato Sensu" Especialização a Distancia: Cultura de Tecidos Vegetais – Tecnologia e Aplicações).

JAIN, A.K.; NESSLER, C.L. Clonal propagation of *Camptotheca acuminata* through shoot bud culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.44, p.229-233, 1996.

JULIANI JR, H.R.; KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.49, p.175-179, 1999.

KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K.; SMITH, D.L. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P.J. (ed.) **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.593-613.

LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LISOWSKA, K; WYSOKINSKA, H. *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.60, p.171-176, 2000.

LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.100-127, 1965.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings of annual meeting**, Washinton, v.30, p.421-427, 1981.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética de plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MONACELLI, B.; PASQUA, G.; CUTERI, A.; VITALI, A. *In vitro* plant regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.58, p.81-85, 1999.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

PARRA, R.; AMO-MARCO, B. Factors affecting *In vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L.: a comparison of adult and seedling material. **In Vitro Cell. Biol.-Plant**, Columbia, v.34, p.104-107, 1998.

PASQUAL, M.; BARROS de, I. Efeito de benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na proliferação e alongação de brotações micropropagadas em *Coffea arabica* L. "in vitro". **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.201-204, 1991.

PASQUAL, M.; BARROS de, I. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.7, p.1017-1019, 1992.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.2, n.2, p.17-21, 2000.

PEREIRA, A.M.S.; MORO, J.R.; CERDEIRA, R.M.M.; FRANÇA, S.C. Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on Micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.42, p.295-297, 1995.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.

PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.

PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O.A. Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais. Lavras:UFLA/FAEPE, 2001, 102p. (Curso de Pós-graduação "Lato Sensu" Especialização a Distância: Plantas Mediciniais: Manejo, Uso e Manipulação).

RAO, K.S.; VENKATESWARA, K. Tissue culture of Forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.45, p.185-190, 1996.

ROUSSOS, P.A.; TOLIA-MARIOLI, A.; PONTIKIS, C.A.; KOTSIAS, D. Rapid multiplication of Jojoba seedlings by *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.57, p.133-137, 1999.

SANSBERRO, P.; REY, H.; MROGINSKI, L.; COLLAVINO, M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In vitro Cellular Developmental Biology Plant*, Columbia, v.35, p.401-402, 1999.

SANTOS, B.R. Propagação *In vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd). 2001. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SATO, A.Y.; MARIA, J.; JUNQUEIRA, C.S. Efeito da concentração de nitrato de amônio no desenvolvimento de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com e sem BAP. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*, Brasília, v.11, p.78, 1999. Suplemento do Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 7; 1999, Brasília.

SHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.50, p.199-204, 1972.

SOMMER, H.E.; WETZSTEIN, H.Y. In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A. SHARP, W.R.; YAMADA, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture: Crop Species*. New York: Macmillan Publishing Company, 1984. v.3, cap.19, p.511-540.

SREEKUMAR, S.; SEENI, S.; PUSHPANGADAN, P. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.62, p.211-218, 2000.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. *Principle and procedure of statistics: a biomedical approach*. 3.ed. Boston: Mc Graw-Hill, 1997. 666p.

SUDHA, C.G.; KRISHNAN, P.N.; PUSHPANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Columbia, v.33, 57-63, 1998.

SUDHA, C.G.; SEENI, S. *In vitro* propagation of *Rauwolfia micrantha*, a rare medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.44, p.243-248, 1996

TABATA, M. Plant advances in the production of medicinal substances by plant cell culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M. H. (eds.) *Proceedings in the sciences-plant tissue cultures and in biotechnological applications*. Berlin: Springer Verlag, 1977, p.3-16.

THORPE, T.A. The current status of plant tissue culture. In: BHOJMAN, S. S. **Plant tissue culture: applications and limitations**. New York: Esevier, 1990. p.1-33 (Development in Crop Science, 19).

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.). **Plant cell culture - a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

VAZ, R.L. **Cultura de tecidos: potencial e aplicação**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1986. p.9-10.

CAPÍTULO 3

INDUÇÃO E ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE *RUDGEEA VIBURNOIDES*

1 RESUMO

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. Indução de calos e estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).*

Com o objetivo de estudar a indução e manutenção de calos de *Rudgea viburnoides*, foi testado o efeito do 2,4-D e ANA nos níveis de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ isolados ou em combinação sobre explantes foliares e caulinares mantidos no claro e na ausência de luz. Os explantes foram provenientes de plântulas assepticamente obtidas de embriões zigóticos. Foi estabelecida a curva de crescimento celular de calos mantidos em meio MS, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D na ausência de luz. Pelos resultados alcançados, pode-se inferir que houve variação quanto ao tipo explante, às condições de luminosidade o regulador de crescimento e a procedência dos explantes. Para os explantes foliares, a melhor condição para indução de calos foi no nível de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D na ausência de luz, sejam eles provenientes de plântulas recém-germinadas ou subcultivadas, as quais apresentaram as melhores características. Os explantes caulinares mostraram melhores resultados na indução de calos no nível de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D no claro. Houve um efeito negativo da interação de 2,4-D e ANA sobre o peso de matéria fresca e seca de calos. A curva de crescimento de calos mantidos em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e mantidos na ausência de luz apresentou padrão sigmóide, com cinco fases de crescimento distintas, num período de 56 dias. O máximo de crescimento de calos ocorreu no 48º dia após a inoculação

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes - UFLA.

2 ABSTRACT

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. **Induction and establishment of the growth curve of callus of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth.** Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Thesis – Doctorate in Crop Science).*

With a view to investigating the induction and maintenance of callus of *Rudgea viburnoides*, the effect of 2,4-D and NAA was tested at the levels of 0.0; 0.1 and 1.0 mg.L⁻¹ single or in combination on leaf and stem explants kept in light and dark. The explants were coming from seedlings aseptically obtained from zygotic embryos. The cellular growth curve of callus kept in MS medium supplemented with 1.0 mg. L⁻¹ of 2,4 -D in the absence of light. The results showed difference among the explant, the conditions, the growth regulator and the precedence of the explants. For the leaf explants, the best condition for inducing callus was at the level of 1.0 mg.L⁻¹ of 2,4 -D in dark and for stem explant was at the level of 0,1 mg.L⁻¹ in light. There was a negative effect of the interaction of 2,4-D and NAA on the weight of the fresh and dry matter of callus. The growth curve of callus maintained in MS medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D and maintained in dark, presented a sigmoid pattern with five distinct growth phases over a 56 day period. The maximum growth took place on the 48th day after inoculation.

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor). Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A tecnologia da cultura *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais por meio de micropropagação, cultura de calos e suspensão celular, visando à produção de metabólitos secundários.

A concentração dos reguladores de crescimento, em especial o balanço auxina/citocinina no meio de cultura, influencia a morfogênese na cultura *in vitro*. Geralmente concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos. Segundo Tisserat (1985), a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; contudo, no seu estudo, quando adicionou citocinina, aumentou-se a proliferação do mesmo.

A maioria das culturas de suspensões celulares são obtidas pela transferência de calos friáveis para meio líquido de mesma composição que o meio utilizado para crescimento de calos (Dixon, 1985).

Segundo Echeverrigaray et al. (2001), poucos são os exemplos de utilização em escala comercial de culturas celulares para a produção de metabólitos secundários; contudo, pode ser citada como exemplo bem sucedido a produção de chiconina, de vincristina e vinblastina e de nicotina.

Não foram encontrados na literatura relatos de trabalhos abordando a indução de calos e estudos sobre a curva de crescimento celular de *Rudgea viburnoides*.

Com este trabalho objetivou-se verificar a influência do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e do ácido naftaleno acético (ANA) sobre explantes foliares e caulinares de plântulas asépticamente obtidas na indução e manutenção de calos, bem como estabelecer a curva de crescimento celular de *Rudgea viburnoides*.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Cultura de calos

A cultura de calos consiste na indução e manutenção de células não diferenciadas do parênquima, constituindo-se uma massa de células com um baixo nível de organização, obtido pela inoculação de partes da planta para um meio de nutriente adequado, freqüentemente contendo combinações apropriadas de reguladores de crescimento (Collin & Dix, 1990; Brown, 1990, citados por Bertolucci, 2000).

Geralmente o calo é o material de partida para a produção e acúmulo de metabólitos secundários *in vitro*. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante; entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequadas (Handro & Floh, 1990), tornando a escolha do explante um dos fatores mais importantes para obter a calogênese (Bonga, 1977, citado por Abreu, 1998).

Conforme Murashige (1974), vários fatores relacionados com o explante interferem na calogênese, como: o tamanho do explante, composição do meio de cultura e reguladores de crescimento, órgãos fornecedores do explante, a idade e a época do ano em que é colhido o genótipo da planta doadora. Ainda, a freqüência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionados com o seu tamanho inicial.

Segundo Yeoman & Macleod (1997), apesar de os calos serem tecidos não diferenciados e crescerem como grupos de células desorganizadas, essas podem apresentar composição bioquímica e exigências distintas em relação ao explante e planta de origem.

Durante o estabelecimento dos calos, ocorrem três fases: indução, divisão e diferenciação celular. Na fase de indução, as células preparam-se para

a divisão, o metabolismo é ativado e as células permanecem com o tamanho constante. A duração dessa fase irá depender do estado fisiológico das células. Durante a divisão celular, ocorre a dediferenciação das células para características parenquimáticas, resultando na formação de crescimento padrão (Aitchison, et al., 1977).

De acordo com Smith (1992), o crescimento e o desenvolvimento (diferenciação celular) do calo podem ser verificados pela curva de crescimento, que geralmente apresenta cinco fases distintas: fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag caracteriza-se como fase de maior produção de energia; a fase exponencial, como a fase biossintética; a fase linear, de diminuição da divisão celular, mas de aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, por causa da redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células e, por último, a fase estacionária, quando ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários.

Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985) verificou em seu trabalho que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; entretanto, quando adicionou citocinina, aumentou a proliferação dos mesmos.

4.2 Indução de calos em explantes foliares e caulinares com diferentes reguladores de crescimento em plantas lenhosas medicinais

Kumar (1992), com *Thevetia peruviana* (Apocinaceae), obteve calos esverdeados friáveis em discos foliares cultivados em meio MS suplementado com 9,0 μM de 2,4-D e 4,6 μM de cinetina em 30 dias, observando que o crescimento dos calos inicialmente era lento, mas o subcultivo de calos em

fragmentos de 2-3 mm em meio MS contendo níveis baixos de regulador (4,5 μM de 2,4-D+ 0,46 μM de cinetina) acelerou a taxa de crescimento.

Com *Bauhinia forficata* (Leguminosa) em meio MS modificado (50% de sais), utilizando como explantes embriões, hipocótilos e ápices caulinares, ocorreu a formação de calos na presença de 2,5 mg.L^{-1} de 2,4-D (Carvalho et al., 1993).

A combinação de 2,2 ou 4,4 μM de 2,4-D e 2,4 ou 4,9 μM de AIB em explantes foliares de *Coffea canephora* produziu calos friáveis quando cultivado num meio básico MS adicionado de 2,2 de μM de 2,4-D, 2,4 μM de AIB e 9,8 μM de 2iP por 4 semanas e depois num meio básico de indução com 4,4 μM 2,4-D e 17,8 μM de BAP por 10 semanas. Durante o primeiro cultivo no primeiro meio, os calos eram brancos e compactos, e tornaram-se bege; quando transferidos após 3-4 semanas para um segundo meio, os calos gradualmente tornaram-se marrom. Novos calos amarelos friáveis foram observados na superfície do explante dos explantes após dez semanas no segundo meio. Após esse período de tempo, os calos que não foram subcultivados perderam a cor amarelada e a capacidade de regeneração (Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996).

Num estudo com *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), ocorreu a indução e manutenção de calos em segmentos caulinares com 3,0 a 4,0 cm de comprimento inoculados em meio MS suplementado com 2,04; 0,58; 2,04 e 13,0 μM de TDZ. Houve formação de calos em 100% dos explantes quando o meio foi suplementado com 2,04 e 6,13 μM de TDZ. Os calos, quando transferidos para meio fresco de cultura, continuaram crescendo (Lameira, 1997).

Carvalho (1998), num experimento com *Bauhinia forficata* em meio $\frac{1}{2}$ MS acrescido de níveis de 0,1; 0,25; 0,5; 2,5; e 5,0 mg.L^{-1} de 2,4-D utilizando como explantes embriões zigóticos, ápices caulinares e radiculares, constatou que concentrações menores que 1,0 mg.L^{-1} foram suficientes para a indução de

calo para todos os explante. O 2,4-D mostrou-se eficiente na indução de calos na maioria dos explantes testados em concentrações superiores a 0,5 mg.L⁻¹ em 30 dias após a inoculação em concentrações superiores a 0,25 mg.L⁻¹. Observou, ainda, que em meios contendo até 0,25 mg.L⁻¹ houve a formação de raízes adventícias, sem a formação de parte aérea.

Sansbero et al. (1999), ao estudarem a propagação *in vitro* de *Ilex paraguariensis* (Aquifoliácea), testaram a combinação de níveis de ANA (0,0 a 5,4 µM) e BAP (0,0 a 4,4 µM, verificaram que as concentrações de 0,54 e 5,4 µM de ANA promoveram a formação de raízes. A formação de calo também ocorreu particularmente nos tratamentos com altas concentrações de auxinas.

Landa (1999) estudou a indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense*), em meio WPM suplementado com BAP (2,2 e 4,4 µM de BAP), ANA (10,7 µM) e BAP (10,7 µM) combinado com ANA (2,2 e 4,4 µM) na presença e na ausência de luz, verificou que na presença do BAP isolado houve pequena formação de calos, mas quando em combinação com o ANA, os calos formados foram maiores, indicando uma interação entre os reguladores de crescimento. A melhor indução de calos foi observada na ausência de luz inoculados em meio contendo a combinação de 10,74 µM de ANA e BAP (1,11 e 2,22 µM). A manutenção dos explantes foliares na ausência de luz induziu a formação de calos com melhor aspecto visual. O enraizamento ocorreu a partir do 45º dia após a inoculação no mesmo meio de inoculação, somente nos explantes mantidos na ausência de luz.

Monacelli et al. (1999) estudaram a indução de calos de *Vismia guianensis* (Hypericaceae) em explantes de segmentos caulinares em meio MS suplementado com 4,52 µM de 2,4-D combinado com 0,46 µM de cinetina (KIN) ou 1,11 ou 2,22 µM de BAP, ou suplementado com 2,26 µM de 2,4-D combinado com 1,11 µM de BAP. A produção de calos ocorreu em todos os tratamentos suplementados com reguladores de crescimento. Contudo, segundo

os autores, a maior massa de calos foi observada em meio contendo 4,52 μM de 2,4-D e 0,46 μM de KIN. Os calos no início eram escuros, duros e de crescimento lento, mas após cinco a seis subcultivos, tornaram-se mais claros e friáveis e tinham um crescimento mais rápido.

Bertolucci (2000) estudou a indução de calos de *Tounerfortia cf paniculata* em explantes foliares no claro e na ausência de luz, inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg.L^{-1} de ANA + 1,0 mg.L^{-1} de BAP e com 0,5 mg.L^{-1} de ANA e 2,0 mg.L^{-1} de BAP, constatou que o melhor tratamento na indução de calos foi a combinação de 0,5 mg.L^{-1} de ANA e 2,0 mg.L^{-1} de BAP, sob ausência de luz.

Figueiredo et al. (2000), ao estudar o estabelecimento e condições de crescimento de suspensões celulares de *Rollinia mucosa*, várias combinações de reguladores de crescimento (2,4-D, BAP, ANA e GA_3) e quatro níveis de picloram (PIC), na ausência de luz. Constataram que os calos formados na presença de 2,4-D mostraram um crescimento limitado, ao passo que o tratamento com ANA mostrou o menor crescimento aos 84 dias; o GA_3 não estimulou significativamente o crescimento de calos ao passo que o picloram induziu o desenvolvimento de calos brancos, suaves e friáveis, independente da concentração. O incremento total no peso fresco dos calos cultivados em PIC foi significativamente maior do que os observados nos meios com 2,4-D e ANA, sendo a concentração de 20,8 μM de PIC a que induziu a maior produção de calo.

Num estudo com *Salix humboldtiana*, Santos (2001) utilizou folhas jovens como explantes para indução de calos em meio MS no claro. Os reguladores testados foram o 2,4-D nos níveis de 0,0 a 12 mg.L^{-1} , BAP e ANA (0,0 a 8,0 mg.L^{-1}) e combinações de ANA e BAP. Constatou que explantes foliares de *Salix* inoculados em meio MS desprovido de reguladores de crescimento não apresentaram a formação de calos friáveis. A produção de calos

friáveis foi favorecida pela adição de 2,4-D isolado ou em combinação de BAP e ANA, sendo a concentração de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D recomendável para a indução de calos friáveis. Observou ainda que as concentrações individuais de ANA ou BAP induziu a formação de calos, seguida de rizogênese nos explantes.

Conceição (2000) estudou a indução de calos em explantes foliares de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro*, inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D nos níveis de 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 35 dias no claro. Verificou que a melhor resposta à indução ocorreu na concentração de $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, após 28 ou 35 dias de cultivo *in vitro*. As análises de regressão para os peso de matéria fresca e peso de matéria seca de calos mostraram efeito significativo das concentrações de 2,4-D e podem ser estimadas por equações quadráticas. As produções máximas foram obtidas com $7,24 \mu\text{M}$ de 2,4-D ($1,35 \text{ mg.L}^{-1}$).

4.3 Estabelecimento da curva de crescimento de calos

Conforme George (1993), citado por Conceição (2000), o crescimento e desenvolvimento de calos podem ser verificados pela curva de crescimento de calos, que normalmente exhibe cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag caracteriza-se como a fase de maior produção de energia; a fase exponencial é a fase biossintética; a fase linear caracteriza-se pela diminuição da divisão celular; a fase de desaceleração é a fase indicada para repicagem das culturas, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células, e finalmente a fase estacionária, em que ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992; Shimizu, 1977; Sragg & Allan, 1993; citados por Santos (2001). Contudo, conforme Aitchison, et al. (1977), citados por Santos (2001), o acúmulo de metabólitos secundários pode ocorrer em diferentes fases do crescimento celular, e pode ser durante a fase

estacionária, com relação inversa entre crescimento e acúmulo e durante a fase logarítmica, com uma relação direta com a divisão celular.

Vários autores estabeleceram curvas de crescimento para espécies vegetais medicinais lenhosas, ficando evidenciado que o padrão da curva é influenciada pela espécie vegetal.

Lameira (1997), em *Cordia verbenácea*, trabalhou com calos e células de erva-baleeira, após terem sido subcultivados três vezes a intervalos de 28 dias e avaliados durante um período de 30 a 32 dias, apresentando curvas de crescimento com cinco fases distintas: a fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. O maior percentual de crescimento de calos e de células foi observado na fase exponencial e o menor percentual de crescimento ocorreu na fase lag. A utilização de TDZ em altas concentrações tende a estimular a formação de calos à custa do crescimento de brotos axilares.

Landa (1999), ao estudar o crescimento de calos de *Caryocar brasiliense* em meio WPM com 10,7 μM de ANA e 4,4 μM de BAP, observou cinco fases de crescimento distintas, sendo a fase lag até o 7º dia, a fase exponencial entre o 7º e 35º dia, a fase linear entre o 36º e o 45º, o período de desaceleração entre o 46º e 49º dia e a estacionária a partir do 50º dia.

Bertolucci (2000), no estabelecimento da curva de crescimento celular de calos mantidos em meio MS suplementado com 0,5 mg.L^{-1} de ANA e 1,0 mg.L^{-1} de BAP, verificou que a curva de crescimento de calos oriundos de explantes foliares e caulinares apresentou um padrão sigmóide com cinco fases distintas, num período de 40 dias de crescimento *in vitro*, sendo a fase lag até o 6º dia; exponencial, do 6º ao 12º dia; linear, do 12º segundo dia ao 24º dia; desaceleração do 24º o quarto dia ao 26º e estacionária a partir do 26º dia.

Conceição (2000), ao estabelecer a curva de crescimento de calos em explantes foliares e caulinares, verificou que apresentaram cinco fases distintas: lag até o 6º dia; exponencial, do 6º ao 12º dia; linear, do 12º dia ao 24º dia;

desaceleração, do 24º dia ao 26º dia e estacionária a partir do 27º dia. O melhor tratamento na indução de calos foi a combinação de 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, sob ausência de luz

A necessidade de se determinar quando o calo deve ser transferido para um meio fresco e a possibilidade de utilização em suspensões celulares visando à produção de metabólitos secundários tornam essenciais o estudo cinético do crescimento do calo. A produção de metabólitos secundários vegetais está relacionada como o crescimento e desenvolvimento da planta, estando limitada a determinados órgãos ou tecidos. A expressão do metabolismo secundários em calos também está relacionada ao seu estágio de desenvolvimento (Misawa, 1994).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides*

Com a finalidade de avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides*, foi conduzido um experimento utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição (parcela) constituída por quatro tubos de ensaio. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 2 x 2 x 3, sendo constituídos pelas combinações dos dois tipos de explantes (folha e caule) com as duas condições (presença e ausência de luz) e com as concentrações de 2,4-D (0,0 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹).

Foram utilizados como explantes folhas (1 cm²) e caules (1,0 cm de comprimento) de plantas asépticamente germinadas de embriões e mantidas em ambiente asséptico. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 ml de meio nutritivo MS suplementado com as diferentes

concentrações de 2,4-D a 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ durante 60 dias, na presença e na ausência de luz. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: área coberta pelo calo, cor do calo, consistência do calo, ocorrência de raízes, ocorrência de brotos, peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 x 3 (2 explantes, 2 condições e 3 concentrações de 2,4-D) com 5 repetições, sendo cada uma constituída de 4 tubos de ensaio.

5.2 Efeito do 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes foliares de *Rudgea viburnoides*

Com a finalidade de avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes foliares de *Rudgea viburnoides*, foi conduzido um experimento utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição (parcela) constituída por cinco tubos de ensaio. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 2 x 3 x 3, sendo constituídos pelas combinações das condições (presença e ausência de luz), com três concentrações de 2,4-D (0,0 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) e três concentrações de ANA (0,0 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹).

Foram utilizados como explantes segmentos foliares (1,0 cm²) de plantas mantidas em subcultivo em meio MS suplementado com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP a cada 60 dias a partir de segmentos nodais e mantidas em ambiente asséptico. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 ml de meio nutritivo MS suplementado com 2,4-D e ANA nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ durante 60 dias, no claro ou na ausência de luz. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: peso de matéria fresca do calo (PMFC) e peso de matéria seca do calo (PMSC).

5.3 Efeito do 2,4-D e ANA sobre a indução de calos em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides*.

Com a finalidade de avaliar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D e ANA na indução de calos em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides*, foi conduzido um experimento utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição (parcela) constituída por cinco tubos de ensaio. Os tratamentos foram dispostos num esquema fatorial 2 x 3 x 3, sendo constituídos pelas combinações das condições (presença e ausência de luz), com três concentrações de 2,4-D (0,0 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) e três concentrações de ANA (0,0 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹).

Foram utilizados como explantes segmentos caulinares (10 mm) de plantas mantidas em subcultivo em meio MS suplementado com 4,0 mg.L⁻¹ de BAP subcultivadas a cada 60 dias a partir de segmentos nodais e mantidas em ambiente asséptico. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 ml de meio nutritivo MS suplementado com 2,4-D e ANA nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ durante 60 dias, no claro ou na ausência de luz. Os efeitos de tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: peso de matéria fresca do calo (PMFC) e peso de matéria seca do calo (PMSC).

Para os dados obtidos em 3.1, 3.2 e 3.3, as variáveis foram submetidas à análise de variância de acordo com modelo sugerido por Steel et al. (1997) para os experimentos fatoriais. Quando houve efeito significativo dos tratamentos, aplicou-se o teste F para comparar os dois tipos de explantes, tanto nas concentrações isoladas 2,4 -D e ANA, como na combinação de cada concentração de 2,4-D e ANA, e utilizou-se a análise de regressão para avaliar o comportamento das variáveis analisadas em função das concentrações de 2,4-D e ANA. A escolha do melhor modelo de regressão foi feita observando-se a

significância da cada modelo de regressão e as estimativas do coeficiente de determinação.

As análises de variância e de regressão foram realizadas utilizando-se o programa computacional SISVAR, sistema de análise de variância (Ferreira, 2000).

5.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Rudgea viburnoides*

Calos derivados de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* oriundos de plântulas assepticamente desenvolvidas de embriões zigóticos foram mantidos na ausência de luz em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. Após três subcultivos a intervalos de quatro semanas, os calos foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 1 cm^3 e inoculados em tubos de ensaio $25 \times 150 \text{ mm}$ contendo meio MS com 6% de ágar e 3% de sacarose suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, e mantidos na ausência de luz.

Para a determinação da curva de crescimento, 10 calos subcultivados e aleatoriamente selecionados foram pesados a intervalos de 4 dias, durante um período de 56 dias. As variáveis determinadas foram o peso de matéria fresca e peso de matéria seca. O peso de matéria seca foi determinado colocando-se os calos em estufa com circulação forçada de ar a 45° até peso constante.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeito do 2,4-D na indução de calos em explantes foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides*

O resumo da análise de variância dos dados referentes ao peso de matéria fresca de calo (PMFC) e o peso de matéria seca de calo (PMSC) é apresentado na Tabela 27. Observa-se que o 2,4-D, na interação Explante x

Condições, Explante x 2,4-D, Condições x 2,4-D e interação tripla Explante x Condições x 2,4-D teve efeitos significativos sobre o peso de matéria fresca de calo e peso de matéria seca de calo.

TABELA 27. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca (PMFC) e peso de matéria seca (PMSC) de calos foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias após a inoculação. UFPA, Belém - PA, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFC (g)	PMSC (g)
Explante	1	0,000058 ^{NS}	0,000255 ^{NS}
Condições	1	0,003517 ^{NS}	0,000074 ^{NS}
2, 4-D	2	3,062564 ^{**}	0,014892 ^{**}
Explante x Condições	1	0,604448 ^{**}	0,001726 [*]
Explante x 2, 4-D	2	0,830621 ^{**}	0,004378 ^{**}
Condições x 2, 4-D	2	0,649528 ^{**}	0,002204 ^{**}
Expl. x Cond. x 2, 4-D	2	0,233856 [*]	0,000925 [*]
Resíduo	48	0,054897	0,000275
Média	-	0,453	0,032
C.V. (%)	-	51,69	51,19

¹NS, *, ** = Teste F não significativo, significativo a 5% e significativo a 1% de probabilidade respectivamente

Pelos dados obtidos de peso de matéria fresca de calo (Tabela 28), infere-se que a resposta dos tipos de explantes foi variável conforme a condição de luminosidade e a concentração do regulador. Identificam-se duas situações: na luz, o maior peso de matéria fresca de calo foi obtido com o explante caulinar na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e na ausência de luz, o melhor resultado em termos de peso de matéria fresca foi obtido com a folha na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Os tratamentos sem regulador de crescimento não apresentaram calogênese, exceto para o explante caulinar na ausência de luz, no qual foi mínima. Landa (1999), em meio WPM, não constatou a presença de calo em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* na presença ou ausência de

luz em meio sem regulador de crescimento Santos (2001) também verificou a ausência de calogênese em explantes foliares de *Salix humboldtiana* nas duas condições de luminosidade.

TABELA 28. Valores médios do peso de matéria fresca de calo (g) em função dos tipos de explantes foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias, para cada combinação de condições de luminosidade com concentrações de 2,4-D¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

Explante	Claro			Escuro		
	0,0	0,1	1,0	0,0	0,1	1,0
Folha	0,000 a	0,398 b	0,680 a	0,000 a	0,427 a	1,208 a
Caule	0,000 a	1,220 a	0,467 a	0,028 a	0,412 a	0,598 b

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, indicam que tipos de explantes diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Quanto à análise de regressão, verifica-se que os níveis crescentes de 2,4-D tiveram um efeito significativo. Para o peso de matéria fresca de calos obtidos de explantes foliares na concentração de 0,0 a 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D na luz e na ausência de luz, as equações de regressão (Figuras 21) indicam o máximo esperado de incremento (1,81 g) no peso de matéria fresca de calo na ausência de luz, quando se adiciona uma grande quantidade de 2,4-D. Conceição (2000) observou efeito quadrático sobre o peso de matéria fresca e matéria seca de calos obtidos de explantes foliares de *Derris urucu*, obtendo estímulo até a concentração de 1,6 mg.L⁻¹ de 2,4-D na luz. Resultados semelhantes foram observados por Santos (2001) com *Salix humboldtiana*.

Para o peso de matéria fresca de calos utilizando segmentos caulinares na presença de luz, um maior peso de matéria fresca de calo foi encontrado na 0,10 mg.L⁻¹, mas apesar da significância da análise, não foi possível ajustar um modelo que explique a relação entre o peso de matéria fresca nessa condição de

luminosidade e a concentração de 2,4-D. Por outro lado, na ausência de luz, o maior valor encontrado foi no nível de 1,0 mg.L⁻¹ (Figura 22).

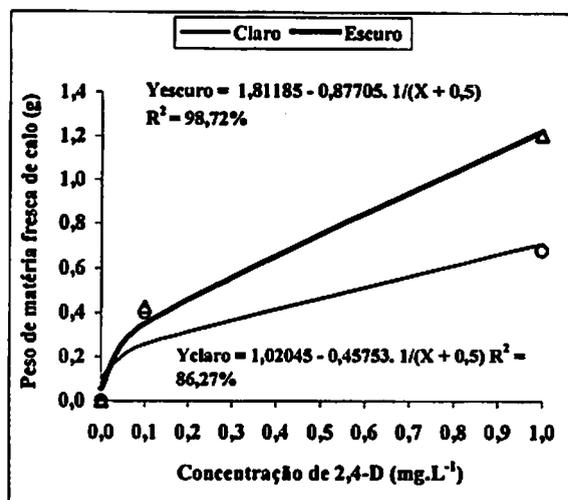


FIGURA 21. Peso de matéria fresca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides* na presença e na ausência de luz, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

De acordo com as médias do peso de matéria seca de calo (Tabela 29), as respostas também variaram conforme o explante utilizado, a condição de luminosidade e a concentração de 2,4-D, e na luz, constata-se a superioridade do explante caulinar na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D (0,091 g), ao passo que na ausência de luz, o explante foliar na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ supera a média do peso de matéria seca de calo caulinar. O comportamento dos dados obtidos para o peso de matéria seca de calo está de acordo com os registrados para o peso de matéria fresca de calo.

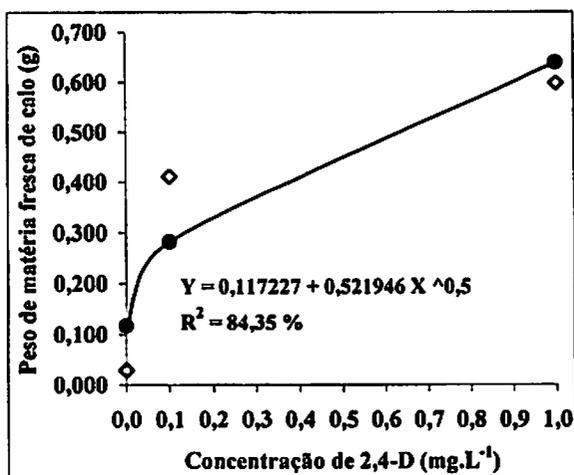


FIGURA 22. Peso de matéria fresca de calo (g) de caule de *Rudgea viburnoides* na ausência de luz, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

TABELA 29. Valores médios do peso de matéria seca de calo (g) em função dos tipos de explantes foliares e caulinares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias, para cada combinação de condições de luminosidade com concentrações de 2,4-D¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

Explante	Claro			Escuro		
	0,0	0,1	1,0	0,0	0,1	1,0
Folha	0,000 a	0,031 b	0,047 a	0,000 a	0,032 a	0,072 a
Caule	0,000 a	0,091 a	0,031 a	0,004 a	0,041 a	0,039 b

¹ Médias seguidas de letras distintas nas colunas indicam que tipos de explantes diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

A análise de regressão para os dados referentes ao peso de matéria seca de calo indica efeito significativo das concentrações crescentes de 2,4-D. O peso de matéria seca para os calos induzidos de explantes foliares tiveram seu efeito explicado por equações que estimam os maiores pesos de matéria seca na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de regulador de crescimento na presença e na ausência de luz (Figuras 23 e 24).

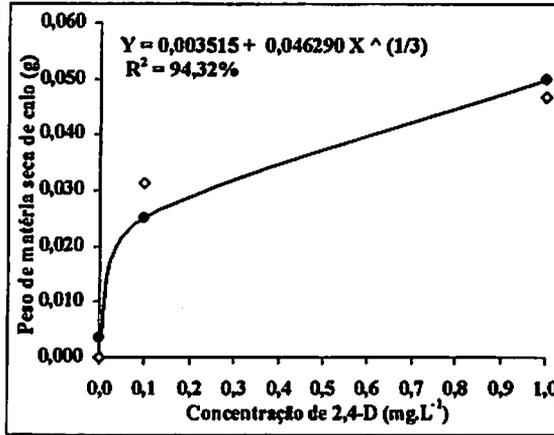


FIGURA 23. Peso de matéria seca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides* na presença e na ausência de luz, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

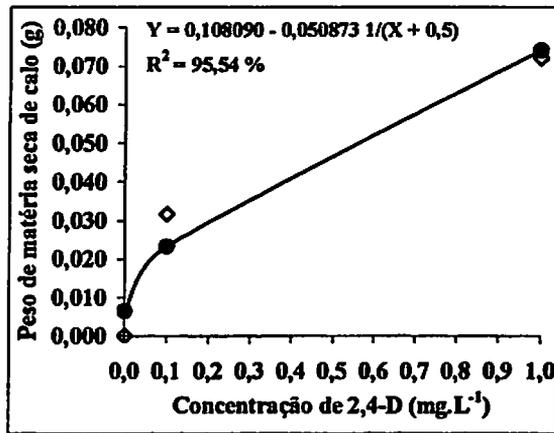


FIGURA 24. Peso de matéria seca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides* na presença e na ausência de luz, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Na figura 25 e 26 observam-se detalhes de explantes foliares primários submetidos a concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D no claro e na ausência de luz, respectivamente.

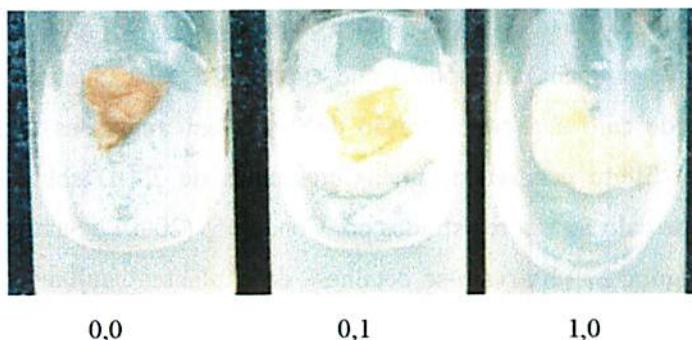


FIGURA 25. Aspecto geral de calos induzidos de explantes foliares primários de plântulas de *Rudgea viburnoides* germinadas *in vitro*, em meio MS, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹, após 60 dias de inoculação no claro. UFLA, Lavras – MG, 2002.

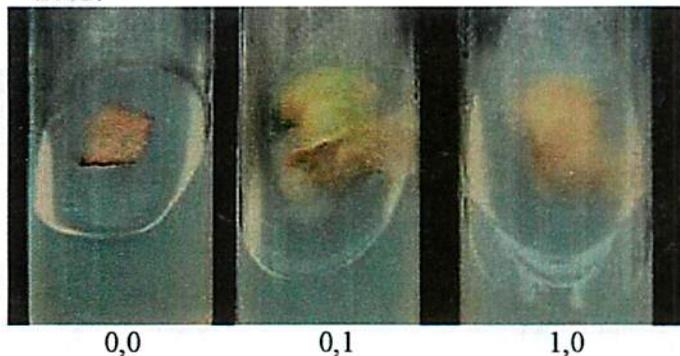


FIGURA 26. Aspecto geral de calos induzidos de explantes foliares primários de plântulas de *Rudgea viburnoides* germinadas *in vitro*, em meio MS, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹, após 60 dias de inoculação na ausência de luz. UFLA, Lavras – MG, 2002.

A cor dos calos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides*, em geral, variou de branco-amarelados a amarelo-escuros.

Por outro lado, para os calos oriundos de explantes caulinares em ambas as condições de luminosidade, o máximo de peso de matéria seca foi alcançado na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ e, apesar do efeito do 2,4-D ter sido significativo, não foi possível ajustar um modelo que explique a relação entre o peso de matéria seca de calo e a concentração de 2,4-D em ambas as condições de luminosidade. Efeito positivo de níveis crescentes de 2,4-D sobre o peso de matéria seca de calo foram registrados por Conceição (2000) e Santos (2001).

Na Figura 27 observam-se detalhes de explantes caulinares primários submetidos a níveis de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D no claro e na ausência de luz.

A cor dos calos de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides*, em geral, variou de branco a branco-amarelados, tanto no claro como no escuro.

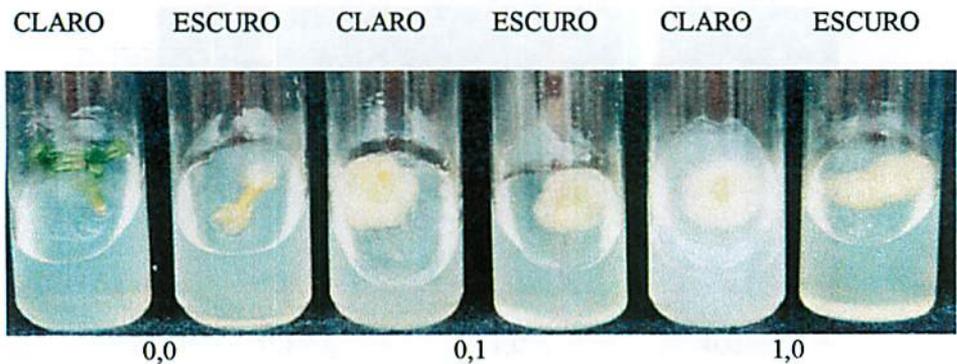


FIGURA 27. Aspecto geral de calos induzidos de explantes caulinares primários de plântulas de *Rudgea viburnoides* germinadas *in vitro*, em meio MS, suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹, após 60 dias de inoculação na luz e no escuro. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Nas Tabelas 30 e 31 encontram-se registradas algumas respostas morfológicas observadas em calos de *Rudgea viburnoides* oriundos de explantes foliares e caulinares, respectivamente. De modo geral, no explante foliar ocorreu somente calogênese, exceto na menor concentração (0,1 mg.L⁻¹) na luz, em que também ocorreu rizogênese. Para o explante caulinar, a concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D induziu a formação de raízes, independente da condição de luminosidade. O 2,4-D, na maior concentração, somente induziu calogênese em ambos os explantes. No meio básico sem regulador de crescimento não ocorreu a formação de calo em nenhuma das condições no explante foliar, e na luz, o explante caulinar produziu brotos e no escuro, ocorreram os três processos.

TABELA 30. Respostas morfológicas (%) observadas aos 60 dias em explantes foliares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹). UFLA e nos tipos de luminosidades. Lavras - MG, 2002

2,4-D (mg.L ⁻¹)	Luz			Escuro		
	Calo	Broto	Raiz	Calo	Broto	Raiz
0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0,1	40,0	0,0	35,0	45,0	0,0	0,0
1,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0

TABELA 31. Respostas morfológicas (%) observadas aos 60 dias em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹) em explante foliar de plântulas desenvolvidas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D (mg.L ⁻¹)	Claro			Escuro		
	Calo	Broto	Raiz	Calo	Broto	Raiz
0,0	0,0	45,0	0,0	15,0	25,0	10,0
0,1	100,0	35,0	35,0	85,0	0,0	15,0
1,0	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0

Pelo fato de ter ocorrido os três processos morfogênicos, isso não significa que tenham ocorrido plantas inteiras. Nos explantes em que ocorreu organogênese, essa ocorreu após a formação do calo aproximadamente aos 45 dias de inoculação. Outros autores têm obtido resultados semelhantes; segundo Carvalho (1998), em concentrações menores que $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, ocorre a formação de raízes adventícias em calos de vários explantes de *Bauhinia forficata* no claro. Landa (1999) observou rizogênese ao combinar ANA e BAP no escuro em explantes foliares de *Caryocar brasiliense*; Sansberro também observou (1999), com explantes nodais de *Ilex paraguariensis* com ANA ($0,1$ a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) no claro, e Bertolucci (2000), ao combinar ANA e TDZ no escuro com explantes foliares de *Tournefortia cf paniculata*. Contudo, Santos (2001), com explantes foliares inoculados em meio MS com ANA e BAP isolados em concentrações de $0,0$ a $8,0 \text{ mg.L}^{-1}$ no claro, também verificou o fenômeno de rizogênese e recomenda a combinação de ambos os reguladores para evitá-lo.

De um modo geral, os calos produzidos pela adição de 2,4-D ao meio apresentaram coloração oscilando entre o branco e o branco-amarelado e de consistência friável. Conceição (2000) também obteve calos de *Derris urucu* amarelos e friáveis na presença de 2,4-D; Yan-Xiu, et al. (1993), citados por Landa (1999), obtiveram calos brancos amarelados e friáveis. Contudo, outros autores enfatizam a necessidade de combinação de auxinas e citocininas para a obtenção de calos friáveis, como Kumar (1992) e Monacelli et al. (1999), com 2,4-D e cinetina; Berthouly & Michaux-Ferriere (1996), com 2,4-D, AIB e 2iP; o que não foi verificado por Landa (1999), com ANA e BAP; por outro lado, outros autores recomendam a utilização de outras auxinas, como o picloram (Figueiredo, 2000).

Nas Tabelas 32 e 33 está registrada a variável quanto à aparência dos calos, podendo-se verificar que os calos provenientes de folhas tiveram um bom desenvolvimento no escuro, isto é, explantes totalmente cobertos pelo calo. Os calos oriundos de segmentos caulinares e que cobriam os calos totalmente cobrindo o explante ocorreram no claro, ambos na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

TABELA 32. Respostas morfogênica (%) observadas aos 60 dias quanto ao desenvolvimento em calos de *Rudgea viburnoides* induzidos com três concentrações de 2,4-D (mg.L⁻¹) em explante foliar de plântulas desenvolvidas *in vitro* na presença de luz e no escuro. UFLA, Lavras - MG, 2002

Nota ¹	Claro			Escuro		
	0,0	0,1	1,0	0,0	0,1	1,0
0	0,0	50,0	0,0	0,0	10,0	0,0
1	100,0	22,5	15,0	100,0	20,0	0,0
2	0,0	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	5,0	0,0	0,0	10,0	0,0
4	0,0	0,0	85,0	0,0	60,0	100,0

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

- 0= Não houve indução de calo;
- 1= Indução de calo na extremidade;
- 2= Indução de calo em ambas as extremidades;
- 3= Calo cobrindo as margens e as nervuras;
- 4= Calo cobrindo todo o explante.

TABELA 33. Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias quanto ao desenvolvimento em calos de *Rudgea viburnoides* induzidos com três concentrações de 2,4-D em explante caulinar de plântulas desenvolvidas *in vitro* na presença de luz e no escuro. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Nota ¹	Claro			Escuro		
	0,0	0,1	1,0	0,0	0,1	1,0
0	0,0	0,0	0,0	75,0	10,0	0,0
1	100,0	10,0	0,0	10,0	20,0	0,0
2	0,0	5,0	0,0	10,0	0,0	0,0
3	0,0	20,0	0,0	5,0	10,0	20,0
4	0,0	65,0	100,0	0,0	60,0	80,0

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

0= Não houve indução de calo;

1= Indução de calo na extremidade;

2= Indução de calo em ambas as extremidades;

3= Calo cobrindo todo o explante (identificável);

4= Calo cobrindo todo o explante (não identificável).

6.2 Efeito do 2,4-D e do ANA sobre a indução de calos em explantes foliares de *Rudgea viburnoides*

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) é mostrado na Tabela 34. Constata-se que as condições, o 2,4-D e a interação Condição*2,4-D tiveram efeitos significativos ($p < 0,01$) para o peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC).

Pelos resultados médios dos dados de peso de matéria fresca e matéria seca obtidos, (Tabela 35) deduz-se superioridade da condição de escuro na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D

TABELA 34. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias após a inoculação em meio MS suplementado com 2,4-D e ANA.. Dados transformados: Raiz quadrada de Y + 0,5. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFC (g)	PMSC (g)
Condições	1	0,127825 **	0,000588 **
2, 4-D	2	0,040139 **	0,000182 **
ANA	2	0,008409 NS	0,000043 NS
Condições x 2,4-D	2	0,043914 **	0,000205 **
Condições x ANA	2	0,009515 NS	0,000055 NS
2,4-D x ANA	4	0,006690 NS	0,000044 NS
Cond. X 2,4-D x ANA	4	0,006222 NS	0,000028 NS
Resíduo	72	0,006132	0,000029
Média	-	0,077	0,005
C.V. (%)	-	10,39	0,75

¹NS, ** = Teste F não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente

TABELA 35. Valores médios para o peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) obtidos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias, em função das condições de luminosidade e em cada concentração de 2,4-D¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

Condição	PMFC (g)			PMSC (g)		
	2,4-D			2,4-D		
	0,0	0,1	1,0	0,0	0,1	1,0
Claro	0,000 a	0,029 a	0,010 b	0,000 a	0,003 a	0,001 b
Escuro	0,068 a	0,061 a	0,293 a	0,005 a	0,004 a	0,017 a

¹Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, comparam as condições nas concentrações de 2,4-D e diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Pela análise de regressão, verifica-se que o 2,4-D teve um efeito linear positivo e significativo sobre o peso de matéria fresca de calo (Figura 28) e peso de matéria seca de calo (Figura 29), ambos com coeficientes de determinação

altos, (99,99%) e (98,82%), respectivamente, permitindo-se inferir que níveis crescentes do regulador possibilitaram incrementos proporcionais no peso de matéria fresca e seca de calo.

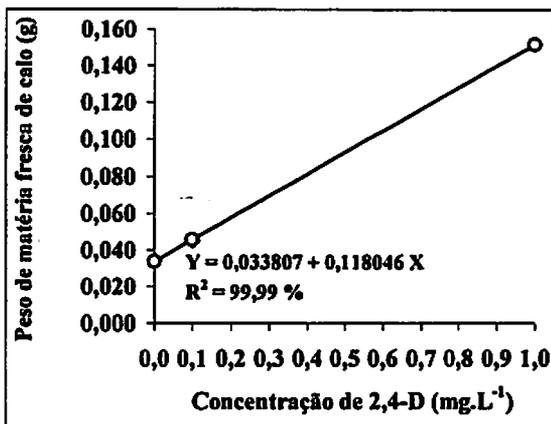


FIGURA 28. Peso de matéria fresca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

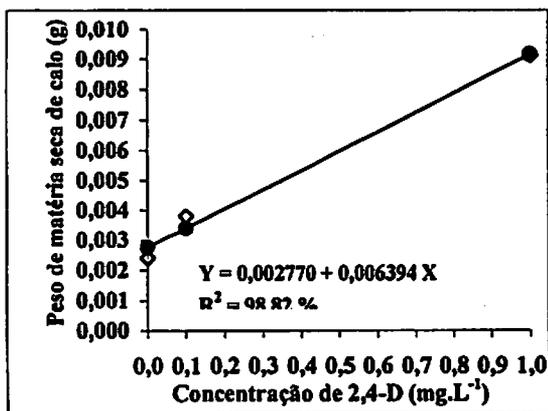


FIGURA 29. Peso de matéria seca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

A análise de regressão para o efeito do ANA sobre o peso de matéria fresca e seca de calo não foi significativa: contudo, é possível verificar que os níveis crescentes de ANA tiveram uma tendência de incrementos lineares sobre o peso de matéria fresca e seca de calo, sendo esses incrementos não significativos

Santos (2001) obteve efeito quadrático do ANA sobre a indução de calos em explantes foliares, apesar de ter ocorrido rizogênese. Contudo, efeito do ANA isolado não foi verificado por Landa (1999) que, ao utilizar a concentração de 10,74 μM de ANA ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), não verificou indução de calos em explantes foliares de *Caryocar brasiliense* na presença ou ausência de luz. Por outro lado, alguns autores recomendam a utilização de ANA e citocinina, como o TDZ (Bertolucci, 2000), ou BAP (Santos 2001).

A análise de regressão para o efeito do 2,4-D no claro não foi significativa para o peso de matéria fresca de calo e peso de matéria seca de calo no claro.

Para o efeito do 2,4-D sobre o peso de matéria fresca de calo no escuro (Figura 30) e peso de matéria seca de calo no escuro (Figura 31), a análise de regressão indica um efeito linear positivo significativo do 2,4-D sobre as variáveis, ambas com coeficientes de determinação elevados, indicando um bom ajuste do modelo. O incremento nas concentrações de 2,4-D resultou em aumentos do peso de matéria fresca e seca de calo no escuro .

Na Tabela 36 encontram-se os resultados sistematizados de variáveis qualitativas em calos de *Rudgea* oriundos de explantes foliares. De modo geral, a cor dos calos foi predominantemente entre branco-escuro (BE) e amarelo-escuro (AE) no claro e branco-amarelado (BA) na ausência de luz. A consistência foi sempre friável na presença de 2,4-D no claro no escuro em todas as combinações de reguladores.

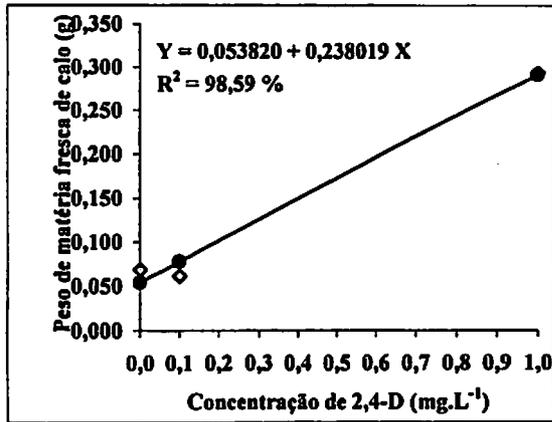


FIGURA 30. Peso de matéria fresca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides* no escuro, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

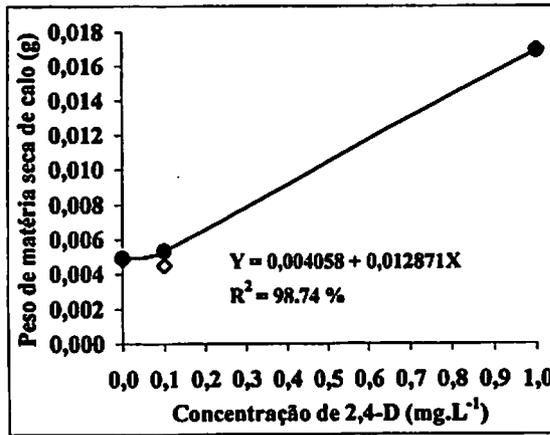


FIGURA 31. Peso de matéria fresca de calo (g) de folha de *Rudgea viburnoides* no escuro, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

TABELA 36. Respostas de variáveis qualitativas na interação Condições x 2,4-D x ANA para a consistência do calo (C) e cor do calo (CC) observadas aos 60 dias em calos obtidos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Claro		Escuro	
		C ¹	CC ²	C	CC
0,0	0,0	-	-	-	-
0,0	0,1	-	-	F	BA
0,0	1,0	-	-	F	AE
0,1	0,0	F	AE	F	BA
0,1	0,1	F	AE	F	BA
0,1	1,0	F	BE	F	B
1,0	0,0	F	BE	F	BA
1,0	0,1	-	-	F	BA
1,0	1,0	-	-	F	B

¹ F = friável; SF = semi friável; NF = não friável

² B = branco; BA = branco-amarelado; BE = branco-escuro; AE = amarelo-escuro;

Os calos foliares na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg.L⁻¹ de ANA na ausência de luz apresentaram um bom desenvolvimento, ou seja 60% de indução de calos sem a formação de outras estruturas, e os calos em sua maioria, foram de tamanho grande (Tabelas 37 e 39). Na presença de luz, a formação de calos e o tamanho foram menores que na ausência de luz (Tabelas 37 e 38).

TABELA 37. Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias em calos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Claro			Escuro		
		Calo	Broto	Raiz	Calo	Broto	Raiz
0,0	0,0	0	0	0	0	0	0
0,0	0,1	0	0	0	20	0	0
0,0	1,0	0	0	0	30	0	10
0,1	0,0	20	10	10	20	0	0
0,1	0,1	10	0	0	55	0	0
0,1	1,0	10	0	0	20	0	0
1,0	0,0	20	0	0	60	0	0
1,0	0,1	0	0	0	40	0	0
1,0	1,0	0	0	0	80	0	0

TABELA 38. Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias em calos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA no claro. Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Nota				
		0	1	2	3	4
0,0	0,0	0	0	0	0	0
0,0	0,1	0	0	0	0	0
0,0	1,0	0	0	0	0	0
0,1	0,0	0	0	0	100	0
0,1	0,1	0	0	0	100	0
0,1	1,0	0	100	0	0	0
1,0	0,0	0	0	100	0	0
1,0	0,1	0	0	0	0	0
1,0	1,0	0	0	0	0	0

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

0= Não houve indução de calo;

1= Indução de calo na extremidade;

2= Indução de calo em ambas as extremidades;

3= Calo cobrindo as margens e as nervuras;

4= Calo cobrindo todo o explante.

TABELA 39 - Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias em calos de explantes foliares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA na ausência de luz. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Nota				
		0	1	2	3	4
0,0	0,0	0	0	0	0	0
0,0	0,1	0	50	0	50	0
0,0	1,0	0	67	33	0	0
0,1	0,0	0	50	50	0	0
0,1	0,1	0	12,5	25	25	37,5
0,1	1,0	0	100	0	0	0
1,0	0,0	0	0	0	17	83
1,0	0,1	0	25	0	50	25
1,0	1,0	0	8	0	25	67

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

- 0= Não houve indução de calo;
- 1= Indução de calo na extremidade;
- 2= Indução de calo em ambas as extremidades;
- 3= Calo cobrindo as margens e as nervuras;
- 4= Calo cobrindo todo o explante.

6.3 Efeito do 2,4-D e ANA sobre a indução de calos em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides*.

O resumo do resultado da análise de variância dos dados referentes ao peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) é apresentado na Tabela 40. Para o peso de matéria fresca, foram significativos os efeitos do ANA, da interação condições x 2,4-D e para a interação 2,4-D x ANA. Para o peso de matéria seca, somente foi significativa a interação tripla condições x 2,4-D x ANA.

TABELA 40. Resumo da análise de variância para peso de matéria fresca de calo (PMFC) e peso de matéria seca de calo (PMSC) de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias após a inoculação em meio MS suplementado com 2,4-D e ANA. UFLA, Lavras – MG, 2002.

Fonte de Variação	GL	Variáveis ¹	
		PMFC (g)	PMSC (g)
Condições	1	0,002092 ^{NS}	0,000010 ^{NS}
2,4-D	2	0,156398 ^{NS}	0,000601 ^{NS}
ANA	2	0,353370 *	0,000258 ^{NS}
Condições x 2,4-D	2	0,380561 **	0,001344 ^{NS}
Condições x ANA	2	0,100645 ^{NS}	0,000050 ^{NS}
2,4-D x ANA	4	0,496802 **	0,001328 ^{NS}
Cond. x 2,4-D x ANA	4	0,041675 ^{NS}	0,000483 *
Resíduo	48	0,075460	0,000181
Média	-	0,414	0,025
C.V. (%)	-	66,34	52,20

¹NS, *, ** = Teste F não significativo, significativo a 5% e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente

A análise de regressão para o efeito dos níveis crescentes de ANA sobre o peso de matéria fresca de calo foi significativa (Figura 32), sendo o incremento maior até o nível de 0,1 mg.L⁻¹ e, a partir do qual, o efeito foi linear com incrementos mínimos sobre o peso de matéria fresca. O maior peso observado (0,477 g) foi na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. Esses resultados diferem dos observado para os calos de origem foliar, em que o ANA em níveis crescentes não teve efeito significativo.

Os valores médios do peso de matéria fresca de calo em função das condições de luminosidade e dentro das concentrações de 2,4-D indicam os maiores pesos de matéria fresca de calo verificados na presença de luz dentro da concentração de 0,0 mg.L⁻¹ e na ausência na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, não houve diferenças significativas entre as condições (Tabela 41).

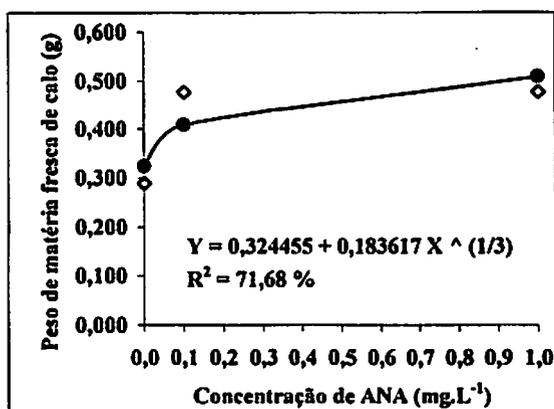


FIGURA 32. Peso de matéria fresca de calo (g) de caule de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002.

TABELA 41. Valores médios para o peso de matéria fresca de calo (PMFC) obtidos a partir de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias e em cada concentração de 2,4-D¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

Condição	2,4-D (mg.L ⁻¹)		
	0,0	0,1	1,0
Claro	0,534 a	0,479 a	0,215 b
Escuro	0,325 b	0,475 a	0,456 a

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas colunas, comparam as condições dentro das concentrações de 2,4-D e diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Carvalho (1998) verificou a ocorrência de indução de formação de calos friáveis em meios isentos de fitorreguladores de explantes de segmentos de entrenós e segmentos nodais de *Bauhinia forficata*. Os calos eram pequenos, com cor clara nos locais de corte, resultando numa camada periférica ativa em divisões celulares, podendo ser considerado uma resposta à injúria.

Neste trabalho, ao se compararem os calos oriundos de explantes foliares e caulinares provenientes de plântulas recém-germinadas e plântulas subcultivadas, observa-se que houve uma maior produção de calos nos explantes de plântulas subcultivadas. Foi observado que os explantes das plântulas subcultivadas, principalmente os caulinares, eram mais desenvolvidos. Os explantes caulinares de plântulas mais jovens, talvez por possuírem menos assimilados acumulados e menor teor endógeno de hormônio, na maioria das vezes não sobreviveram; pois quando iniciavam a formação do calo, amareleciam, definhavam e morriam. Nesses casos, o calo ficava restrito à extremidade do explante caulinar.

Por outro lado, é interessante ressaltar que a espécie em estudo tem uma boa capacidade de formação de calos, principalmente de explantes caulinares. A indução de calos é resultado de interação físico-química. A indução de calos pode se originar de injúria física dos tecidos (lesão física) ou mais comumente ser consequência da suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento (química). Esses agem sobre a expressão gênica, fazendo com que, a partir de células de tecidos organizados, forme-se uma massa desorganizada de células.

Ainda, conforme Pierik (1987), na cultura de calos, um suprimento exógeno de reguladores de crescimento é freqüentemente necessário na indução em um explante qualquer. Esse requerimento exógeno de regulador (tipo, concentração e razão auxina/citocinina) depende fortemente do genótipo e conteúdo endógeno de hormônios.

A análise de regressão para o efeito do 2,4D sobre o peso de matéria fresca de calo nas duas condições somente foi significativo na presença de luz; no geral, as concentrações crescentes de 2,4-D tiveram um efeito linear negativo, ou seja, com o incremento do regulador, houve uma redução no peso de matéria fresca, sendo a maior média observada no meio sem regulador de crescimento

(Figura 33). Nesse caso, espera-se um decréscimo médio de 0,309 g no PMFC para cada unidade que se aumenta na concentração de 2,4-D.

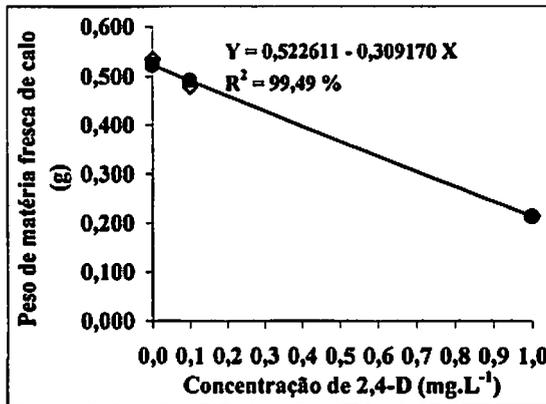


FIGURA 33. Peso de matéria fresca de calo (g) de *Rudgea viburnoides* de explantes caulinares na presença de luz, em função das concentrações de 2,4-D. UFLA, Lavras - MG, 2002.

A análise de regressão para o efeito da interação 2,4-D x ANA indica um efeito significativo das concentrações 0,0 e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D em cada uma das concentrações de ANA. (Figuras 34 e 35). Dentro de 0,0 mg.L⁻¹ de ANA, o peso de matéria fresca de calo teve um incremento maior na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, a partir da qual os incrementos foram menores com tendência linear; o máximo de peso de matéria fresca foi obtido na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 36).

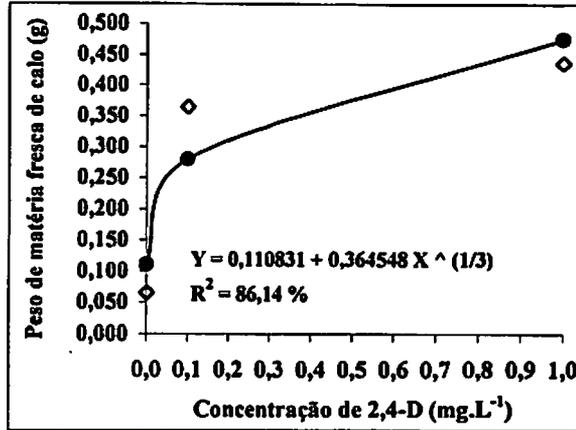


FIGURA 34. Peso de matéria fresca de calo (g) de caule de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de 2,4-D dentro da concentração de 0,0 mg.L⁻¹ de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002.

As concentrações de 2,4-D combinadas com o ANA tiveram um efeito sinérgico negativo sobre o peso de matéria fresca, e no nível 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, não foi significativo.

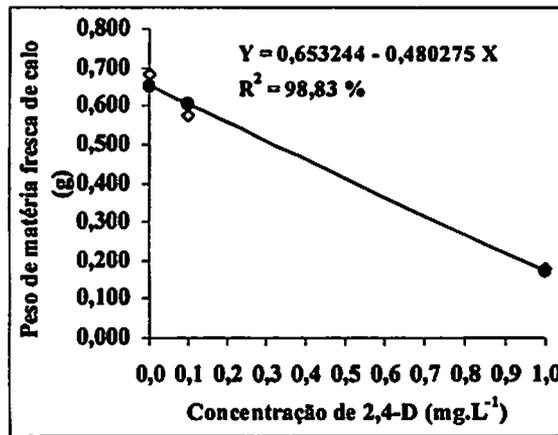


FIGURA 35. Peso de matéria fresca de calo (g) de caule de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de 2,4-D dentro das concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de ANA, o peso de matéria fresca de calo teve uma tendência de redução linear e significativa, sendo o maior peso de matéria fresca encontrado dentro do nível de 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 51).

Agora, fazendo o estudo da influência das concentrações de ANA em cada concentração de 2,4-D, verificou-se na análise de regressão um efeito significativo dentro do nível de 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 36) e não significativo para os níveis de 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹.

Dentro da concentração 0,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, o maior peso de matéria fresca de calo foi obtido na maior concentração de ANA (0,680 g). Mas, na concentração de 0,1 mg.L⁻¹, o maior PMFC foi obtido na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de ANA, mesmo não havendo diferença significativa em relação às outras concentrações (0,0 e 0,1). Por outro lado, na maior concentração (1,0 mg.L⁻¹), o maior PMFC ocorreu na ausência de ANA.

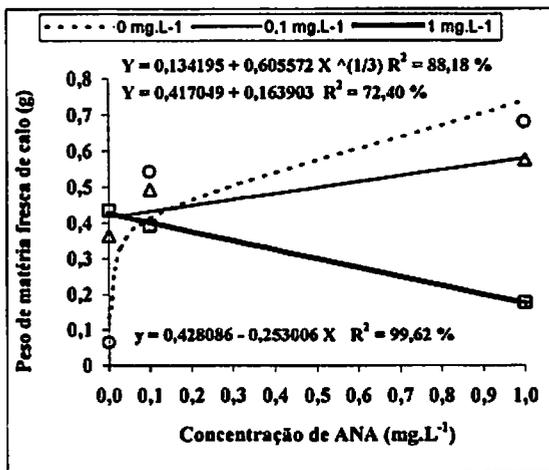


FIGURA 36. Peso de matéria fresca de calo (g) de caule de *Rudgea viburnoides*, em função das concentrações de 2,4-D dentro das concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002.

Pelos valores médios do peso de matéria seca de calo para a interação condição x 2,4-D x ANA (Tabela 42), infere-se que a condição no claro propiciou maior PMSC que na ausência de luz, na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de ANA e ausência de 2,4-D. Já na condição de ausência de luz houve maior PMSC na presença de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, combinado com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

TABELA 42. Valores médios do peso de matéria seca de calo (g) obtidos de explante caulinar de *Rudgea viburnoides* aos 60 dias em função das diferentes condições de luz e nas diversas combinações de 2,4-D e ANA¹. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA (mg.L ⁻¹)	Condição	
		Luz	Escuro
0,0	0,0	0,015 a	0,007 a
	0,1	0,022 a	0,018 a
	1,0	0,053 a	0,028 b
0,1	0,0	0,028 a	0,032 a
	0,1	0,044 a	0,026 a
	1,0	0,026 a	0,029 a
1,0	0,0	0,025 a	0,028 a
	0,1	0,013 b	0,039 a
	1,0	0,009 a	0,020 a

¹ Médias seguidas de letras distintas, nas linhas, comparam as condições luz e ausência de luz, nas diferentes combinações das concentrações de ANA, e diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Na Tabela 43 encontram-se os resultados sistematizados de variáveis qualitativas em calos de *Rudgea* oriundos de explantes caulinares. De modo geral, a cor dos calos foi predominantemente de branca (B) a branco-amarelada (BA), no claro e na ausência de luz, entre branco-amarelada (BA) e amarelo-escura (AE). A consistência foi de friável a semifriável na ausência de 2,4-D no claro; no escuro, em qualquer das combinações de reguladores, foi friável.

TABELA 43. Respostas de variáveis qualitativas na interação Condições x 2,4-D x ANA para a consistência do calo (C) e cor do calo (CC) observadas aos 60 dias em calos obtidos de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Claro		Escuro	
		C ¹	CC ²	C	CC
0,0	0,0	SF	BA	F	AE
0,0	0,1	SF	B	F	BA
0,0	1,0	F	BA	F	AE
0,1	0,0	F	BE	F	BA
0,1	0,1	F	BA	F	AE
0,1	1,0	F	B	F	B
1,0	0,0	FN	BA	F	B
1,0	0,1	F	AE	F	BA
1,0	1,0	F	A	F	BA

¹ F = friável; SF = semi friável; NF = não friável

² B = branco; BA = branco-amarelado; BE = branco-escuro; AE = amarelo-escuro; A = amarelo

Respostas morfológicas (%) observadas aos 60 dias em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Claro			Escuro		
		Calo	Broto	Raiz	Calo	Broto	Raiz
0,0	0,0	60	90	10	80	20	0
0,0	0,1	70	10	10	80	0	20
0,0	1,0	90	0	0	100	0	10
0,1	0,0	90	0	0	100	0	0
0,1	0,1	100	30	20	100	0	0
0,1	1,0	90	0	0	100	0	0
1,0	0,0	90	0	0	90	0	0
1,0	0,1	50	0	0	90	0	0
1,0	1,0	50	0	0	90	0	0

Quanto às respostas morfológicas, os dois tratamentos tiveram um comportamento semelhante, com 90% de indução de calo sem a produção de brotos e raízes (Tabela 44). Contudo, o peso do calo no escuro foi superior e de

melhor qualidade; calos maiores ocorreram no escuro na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (Tabelas 45 e 46).

TABELA 45. Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA na presença de luz. Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	Nota				
		0	1	2	3	4
0,0	0,0	0	67	33	0	0
0,0	0,1	0	0	17	66	17
0,0	1,0	0	0	11	22	67
0,1	0,0	0	0	11	22	67
0,1	0,1	0	0	60	40	0
0,1	1,0	0	11	11	22	56
1,0	0,0	0	11	0	78	11
1,0	0,1	0	0	0	100	0
1,0	1,0	0	20	20	60	0

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

0= Não houve indução de calo;

1= Indução de calo na extremidade;

2= Indução de calo em ambas as extremidades;

3= Calo cobrindo as margens e as nervuras;

4= Calo cobrindo todo o explante.

TABELA 46. Respostas morfogenéticas (%) observadas aos 60 dias em explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* submetidos a três combinações de concentrações de 2,4-D e ANA na ausência de luz. UFLA, Lavras - MG, 2002

2,4-D	ANA	NOTA				
		0	1	2	3	4
0,0	0,0	0	12,5	87,5	0	0
0,0	0,1	0	25	0	25	50
0,0	1,0	0	0	10	60	30
0,1	0,0	0	0	20	40	40
0,1	0,1	0	0	10	60	30
0,1	1,0	0	10	0	40	50
1,0	0,0	0	11	0	33	56
1,0	0,1	0	11	0	11	88
1,0	1,0	0	0	22	33	45

¹ As notas foram atribuídas conforme os seguintes critérios:

- 0= Não houve indução de calo;
- 1= Indução de calo na extremidade;
- 2= Indução de calo em ambas as extremidades;
- 3= Calo cobrindo as margens e as nervuras;
- 4= Calo cobrindo todo o explante.

6.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *Rudgea viburnoides*

N Figura 55 estão as curvas de crescimento de calos determinadas em segmentos caulinares de *Rudgea viburnoides* oriundos de plântulas asépticamente desenvolvidas, mediante os dados referentes às médias do peso de matéria fresca de calo e peso de matéria seca de calos caulinares cultivados em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D na ausência de luz. Verifica-se que a curva apresentou um padrão do tipo sigmóide, podendo-se distinguir cinco fases distintas, conforme mencionado na literatura para outras espécies medicinais lenhosas (Lameira, 1997; Landa, 1999; Betolucci, 2000 e Conceição, 2000).

Analisando-se a Figura 37, observa-se um aumento no peso fresco e seco dos calos de cerca de 3,45 e 4,15 vezes, respectivamente, do valor inicial após 56 dias de cultivo.

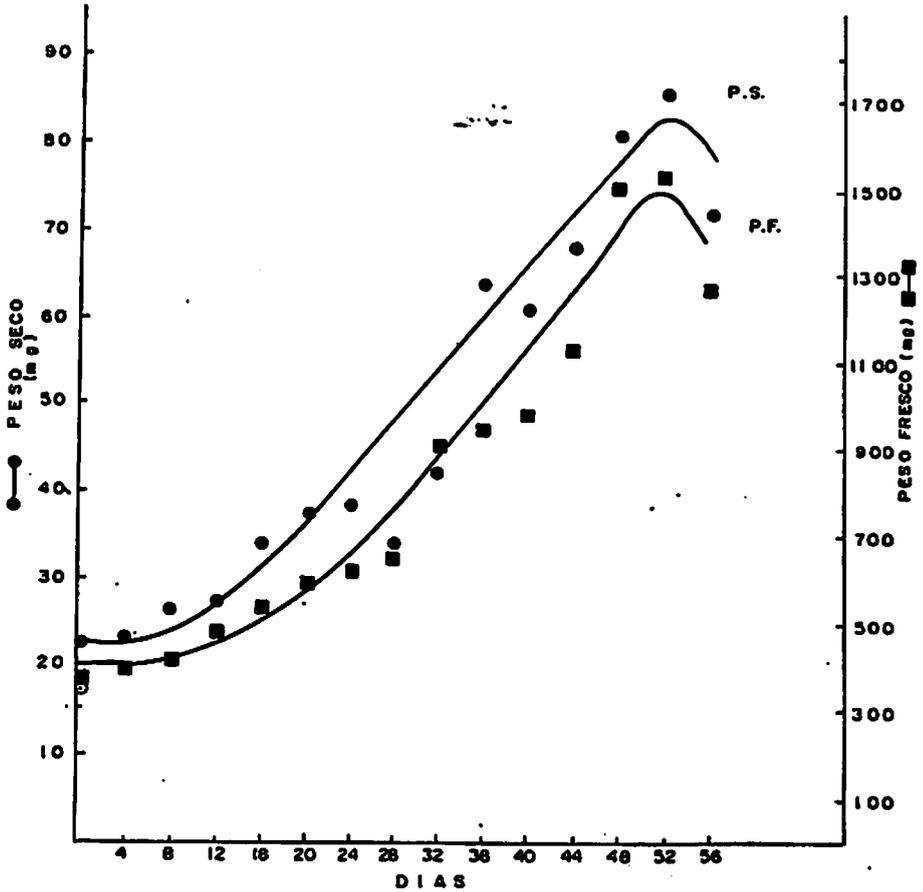


FIGURA 37– Representação gráfica da curva de crescimento da matéria fresca e seca (g) de calos obtidos de explantes caulinares de *Rudgea viburnoides* durante 56 dias. UFLA, Lavras - MG, 2002.

A primeira fase, a fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão celular, prolongou-se até o 8º dia, e segundo Scragg & Allan (1993), citados por Landa (1999), pode ser considerada como uma fase produtora de energia,

quando ocorre a síntese de proteínas e de metabólitos específicos necessários à divisão celular.

A segunda fase, a fase exponencial, ocorreu entre o 9º e o 32º dia de cultivo, e segundo Scragg & Allan (1993), citados por Landa (1999), corresponde à fase em que a divisão celular é máxima, formando agregados.

A terceira fase, a fase linear, ocorreu entre o 33º e 48º dia; nessa fase, segundo Smith (1992), o crescimento e desenvolvimento celular é evidente, isto é, as células cessam de se dividir e começam a crescer.

A quarta fase, a fase de desaceleração, teve lugar entre o 49º e 52º dia. Essa fase, segundo Smith (1992), é a indicada para se efetuar a transferência da cultura para meio fresco, em virtude das limitações nutricionais, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células e dos calos.

A última fase, a fase de estacionária, ocorreu a partir do 53º dia. Nessa fase não ocorre mais divisão celular nem síntese de biomassa. A fase estacionária está relacionada com o máximo de acúmulo de metabólitos secundários (Nakagawa, et al., 1986; citados por Lameira (1997).

O padrão de crescimento neste trabalho coincide com o observado por Landa (1999), que verificou uma fase lag mais prolongada e uma maior longevidade das culturas, se comparado ao constatado por outros autores (Lameira, 1997; Bertolucci, 2000 e Conceição, 2000), que verificaram uma precocidade da fase estacionária aos 27º, 37º e 27º dia após a inoculação, respectivamente. No presente estudo, o máximo de crescimento alcançado ocorreu no 48º dia, também coincidindo com o verificado por Landa (1999).

7 CONCLUSÕES.

- Ocorre indução de calos no meio MS isento de regulador de crescimento após a inoculação com explantes caulinares provenientes de plântulas subcultivadas, sendo essa maior na presença de luz;
- O tratamento mais eficiente na indução de calos de explantes foliares de plântulas recém-germinadas e de plântulas subcultivadas é o de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D na ausência de luz, o que concordam com as melhores respostas morfogênicas e características de calos;
- Em material proveniente de plântulas subcultivadas, o ANA, em concentrações de até $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, não apresenta efeito na indução de calos foliares, mas sim sobre os explantes caulinares;
- O tratamento mais eficiente para indução de calos e características de explantes caulinares subcultivados é o de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA no claro;
- A concentração de 2,4-D mais eficiente na indução de calos de explantes caulinares de plântulas recém-germinadas é o de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ no claro, apesar da ocorrência de respostas morfogênicas e de características não desejáveis;
- Há um efeito negativo da interação do 2,4-D e ANA sobre o peso de matéria fresca e seca de calos de explantes caulinares subcultivados;
- A curva de crescimento de calos mantidos em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e mantidos na ausência de luz apresenta padrão sigmóide, com cinco fases de crescimento distintas, num período de 56 dias;
- O máximo de crescimento de calos ocorre no 48º dia após a inoculação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. (ed.) **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. California: Blackwell Scientific Publications, 1977. p.267-306.

BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.M. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.44, p.169-176, 1996.

BERTOLUCCI, S.K.V. **Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham**. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CARVALHO de, R.N.; MELO, M. de; AMARAL, A.F.C.; CROCOMO, O.J. Calogênese e embriogênese somática de unha-de-vaca (*Bauhinia forficata* L.). **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.110, 1993.

CARVALHO de, R.N. **Cultivo *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link**. 1998. 52p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CONCEIÇÃO, H.E.O. da; **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de reotenóides em timbós (*Derris* sp)**. 2000. 191p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: DIXON, R.A. (ed.). **Plant cell culture – a practical approach**. Oxford: IRL Press. 1985. p1-20.

ECHEVERRIGARAY, S.; ANDRADE, L.B.; DELAMARE, A.P.L.; ZENI, A.L.B.; CARRER, R. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. de; AZEVEDO, J.L de; (Coord.). **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para windows versão 4.0. In REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFScar, 2000. p.255-258.

FIGUEIREDO, S.F.L.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; CAMPOS, V.R. *Rollinia mucosa* cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.63, p.85-92, 2000.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.203-212.

KUMAR, A. Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in callus culture of *Thevetia peruviana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.31, p.47-50, 1992.

LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). 1997. 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LANDA, F. de S.L. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 1999. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MISAWA, M. Introduction. In: MISAWA, M. (ed.). *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites*. Toronto: FAO, 1994. p-1-3.

MONACELLI, B.; PASQUA, G.; CUTERI, A.; VITALI, A. *In vitro* plant regeneration of *Vismia guianensis* through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.58, p.81-85, 1999.

MURASHIGE, T. Plant regeneration through tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology*, Washington, v.25, p.135-166, 1974.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 345p.

SANSBERRO, P.; REY, H.; MROGINSKI, L.; COLLAVINO, M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *In vitro Cellular Developmental Biology Plant*, Columbia, v.35, p.401-402, 1999.

SANTOS, B.R. Propagação *In vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humboldtiana* Willd). 2001. 89p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras

SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. *Principle and procedure of statistics: a biomedical approach*. 3.ed. Boston: Mc Graw-Hill, 1997. 666p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis in plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.). *Plant cell culture – a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

YEOMAN, N.M.; MACLEOD, A.J. Tissue callus culture techniques. In: STREET, H.E. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. Berkeley: University of California, 1977. p.31-59.

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO DE *RUDGEA VIBURNOIDES* A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL *IN VIVO*.

1 RESUMO

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. Extração e identificação do princípio ativo de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth em material vegetal *in vivo*. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).*

Foram estudados os extratos brutos em hexano, clorofórmio acetato de etila, etanol e metanol de material vegetal obtidos *in vivo* (folhas, caules e raízes) e *in vitro* (calos) de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., planta nativa do cerrado brasileiro e considerada empiricamente como uma planta com propriedades terapêuticas. A purificação dos extratos foi efetuada por cromatografia líquida em coluna (CLC), com solventes em ordem crescente de polaridade e monitoradas com cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa em sílica gel G 60. Pelos resultados das análises fitoquímicas dos extratos das folhas, do caule e, da raiz, constatou-se a presença de taninos, alcalóides, açúcares redutores, álcoois, esteróis e terpenóides. Três substâncias foram isoladas e purificadas dos extratos das folhas, do caule e da raiz. Na folha, identificou-se uma substância altamente polar de ponto de decomposição de 46 ± 2 °C, solúvel em metanol, ácido acético e H₂O, a qual provavelmente é um açúcar. Por meio das análises por composição CG/MS, verificou-se a similaridade entre os compostos isolados do caule e da raiz, identificados pelo banco de dados do equipamento como “óxido de cariofileno”, com PM de 253 g/mol. Esse apresentou como cristais com ponto de fusão 220 – 230 e 218 – 230 °C, solubilidade em metanol e as características espectrais no IV (KBr, cm⁻¹): 3500 – 3000; 1610 – 1608; 1400 – 1380 e 1053 – 1026.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador),
Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA.

2 ABSTRACT

BONILLA, Marvin Gerardo Olivas. Extraction and identification of the active principle of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. from in vivo and in vitro plant material. Lavras: UFLA, 2002. 162p. (Thesis – Doctorate in Crop Science).*

The crude extracts in hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol and methanol of plant material obtained in vivo (leaves, stems and roots) and in vitro (callus) of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth; a plant native to the Brazilian cerrado (savanna) and regarded empirically as a plant with therapeutic properties. The purification of the extracts was accomplished through column liquid chromatography (CLC), eluted with solvents in decreasing order of polarity and monitored with thin layer chromatography (TLC) preparative in G 60 silica gel. From the results of the phytochemical analyses of leaves, stems and roots. The presence of tannins, alkaloids, reducing sugars, alcohols, sterols and terpenoids was found. Three substances were isolated and purified from the extracts of leaves, stems and roots. In the leaf, a highly polar substance of decomposing point of 46 ± 2 °C, soluble in methanol, acetic acid and H₂O was identified, which is probably a sugar. By means of the composition analyses GC/MS, a similarity among the compounds isolated from the stem and root was observed, identified by the data bank of the equipment as “kariophylene oxide” with a MW of 253 g/mol. This one presented itself as crystals with fusion point 220 – 230 e 218 – 230 °C, solubility in methanol and the spectral characteristics at IV (KBr cm⁻¹): 3500 – 3000; 1610 – 1608; 1400 – 1380 and 1053 - 1026.

* Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

As plantas superiores biossintetizam e acumulam substâncias químicas que vêm sendo utilizadas como remédios, cosméticos, antioxidantes na conservação de alimentos, adoçantes, óleos essenciais, biocidas, etc. Essas substâncias químicas ou princípios ativos das plantas podem ser produtos do metabolismo primário e/ou secundário.

No caso das plantas que proporcionam princípios ativos utilizados na medicina, existem inúmeros exemplos com importância econômica, como: acetildigoxina (cardiotônico), aescina (antiinflamatório), atropina (anticolinérgico), emetina (amebicida), vincristina, vimblastina e taxol (antineoplásicos), pilocarpina (parassimpaticomimético), quinina (antimalárico), reserpina (anti-hipertensivo), efedrina (simpaticomimético) e outros (Balandrin & Klocke, 1988).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar a sua presença. Para atingir tal objetivo, são estabelecidas etapas que iniciam com a coleta, preparação do material vegetal, análise fitoquímica preliminar, fracionamento, isolamento e purificação de substâncias e elucidação estrutural (Falkenberg, et al., 1999).

O material vegetal é submetido a sucessivas extrações com solventes de polaridade crescente; em seguida, esse material é isolado, para que se possa obter extratos semipuros, frações e, por último, compostos puros. A cromatografia líquida em coluna (CLC) é uma das técnicas mais utilizadas no processo de separação. Uma vez estando purificada a amostra, a determinação da estrutura molecular é obtida mediante uso concomitante de técnicas espectrais, tais como: ultravioleta (UV); infravermelho (IV); espectroscopia de massa (EM), que pode ser acoplada a um cromatógrafo de fase gasosa (CG/EM); ressonância magnética protônica (RMN ¹H) e de carbono 13 (RMN ¹³C), os

quais têm permitido propor com segurança a estrutura molecular das substâncias naturais (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Falkenberg, et al., 1999).

Com relação à espécie-objeto da pesquisa, o único relato obtido sobre sua constituição química é o de Pio Corrêa (1984), segundo o qual as cascas da raiz e do caule de *Rudgea viburnoides* encerram vários alcalóides, entre eles a paracotoína e a cotoína, e o aldeído fórmico agindo sobre esse último, forma um alcalóide artificial, a fortoína, que se apresenta em cristais amarelos sem sabor e com a aroma de canela, muito solúveis na água e pouco solúvel no álcool e na benzina. Esses alcalóides e, às vezes as próprias cascas, tem sido empregado na Europa por médicos eminentes e com ótimo resultado, para combater o reumatismo, gota, os suores noturnos dos tuberculosos, enterite catarral e as úlceras de estômago. A fortoína é um verdadeiro tônico específico contra diarreia.

Objetivou-se com o presente estudo identificar princípios ativos presentes em material vegetal “in vivo” e “in vitro” de *Rudgea viburnoides*, uma espécie considerada medicinal.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Metabólitos primários e secundários

As plantas sintetizam uma série de substâncias, as quais são divididas, de um modo geral, em compostos primários e compostos secundários.

Os compostos primários são aqueles que são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento fisiológico. Estão presentes em quase todos os seres vivos, em quase todos os seus órgãos, sendo acumulados em alguns desses (sementes, frutos e raízes). Destacam-se nesse grupo carboidratos, açúcares, óleos, gorduras, ácidos graxos, entre outros, que são matérias-primas da indústria alimentícia (Balandrin & Clocke, 1988).

Os compostos secundários são sintetizados a partir de um metabólito primário em uma via metabólica alternativa, sem função direta no crescimento e desenvolvimento fisiológico do vegetal. São compostos de baixo peso molecular e normalmente de estrutura complexa (Fowler, 1982).

O interesse crescente por compostos naturais, principalmente de aplicação farmacêutica, e as dificuldades já conhecidas para assegurar o fornecimento constante de plantas, têm estimulado a investigação do potencial de culturas de tecidos e células *in vitro* para a produção de metabólitos secundários (Grattapaglia & Machado, 1990).

4.1.1 Biossíntese de metabólitos secundários

Os princípios ativos são classes do metabolismo secundário constituídos de uma substância ou conjunto de substâncias quimicamente bem definidas produzidas por plantas que apresentam propriedades biológicas. Com poucas exceções, esses compostos são sempre sintetizados segundo a rota biossintética proveniente da via dos ácidos mevalônico, malônico e do chiquímico. Compostos sintetizados do metabolismo primário, que podem ser utilizados farmacologicamente como polissacarídeos ácidos (mucilagem) e proteínas, estão incluídos nesse grupo (Swain, 1977, citado por Abreu, 1998).

4.1.2 Metabólitos secundários *in vivo*

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, parece que isso ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do grau de diferenciação e desenvolvimento dos mesmos, dificultando a extração, isolamento e purificação dessas substâncias. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio

de desenvolvimento do vegetal, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais, como clima, luz, presença de pragas, nutricionais, composição química do solo, umidade (Balandrin & Kloecke, 1988; e Costa, 1994).

4.1.3 Metabólitos secundários *in vitro*

O crescimento celular pode ser dividido em duas fases: aumento do número de células e aumento de volume celular, e, na maioria das vezes, esses eventos ocorrem simultaneamente (Sakuta & Komamine, 1987). Em suspensão celular, células cultivadas exibem um crescimento sigmoidal em cinco fases: lag, logarítmica (exponencial, log), linear, desaceleração e estacionária. A fase lag pode ser considerada como sendo de produção de energia, e a logarítmica, como uma fase biossintética (Shimizu et al., 1977).

Relativamente pouca atenção tem sido dada ao relacionamento entre crescimento celular e acumulação de metabólitos secundários. Contudo, dois tipos de acumulação têm sido observados: durante a fase estacionária com uma relação inversa entre crescimento e acúmulo, e durante a fase logarítmica, tal como a acumulação de betacianina em *Phytolacca americana*, que está associada com a divisão celular (Sakuta, et al., 1986). Na maioria das espécies, o acúmulo de metabólitos ocorre na fase estacionária, como observado por Lameira (1997) em *Cordia verbenácea*.

Os metabólitos secundários são influenciados por fatores ambientais. Em cultura de suspensão de células, reguladores de crescimento e fatores nutricionais afetam a produção de metabólitos secundários, bem como o crescimento celular (Sakuta & Komamine, 1987).

A maioria das suspensões celulares são obtidas pela transferência de calos friáveis para meio líquido de mesma composição do meio usado para crescimento de calos (Dixon, 1985; Tisserat, 1985).

Entre as vantagens da produção de compostos secundários *in vitro*, pode-se citar a maior facilidade na purificação dos extratos, em virtude da ausência de quantidades significativas dos pigmentos, resultando em redução dos custos de produção (Baladrin & Klocke, 1988). Entretanto, tem-se observado que as culturas de tecidos produzem quantidades muito pequenas do composto desejado. De acordo com Alfermann & Petersen (1995), cafeína, dopa, ajmalicina e serpentina são os únicos compostos usados em farmácia que são produzidos em grandes quantidades pelas culturas de tecidos.

4.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos secundários que contêm em sua estrutura o elemento nitrogênio, cujos precursores são aminoácidos e geralmente são sintetizados em tecidos com crescimento ativo. Eles têm como precursores basicamente quatro aminoácidos: ornitina, lisina, tirosina e triptofano (Goodwin & Mercer, 1983). Esses compostos são classificados de acordo com seus precursores; por exemplo, os alcalóides isoquinolínicos são derivados do aminoácido tirosina (Robinson, 1974). Os alcalóides compreendem uma grande classe de substâncias secundárias de plantas; geralmente incluem substâncias básicas, são heterocíclicos e geralmente exibem atividade fisiológica significativa em humanos e animais. Tais compostos são as mais velhas drogas e ainda são de grande uso na medicina moderna (Conn & Stumpf, 1981). Na Figura 38, são apresentadas as estruturas químicas básicas dos alcalóides verdadeiros.

Os alcalóides são geralmente ausentes nas gimnospermas, pteridófitas, musgos e plantas inferiores e sua função nas angiospermas é ainda obscura, embora se tenha relato do envolvimento de substâncias individuais na regulação do crescimento, repelentes e atraentes de insetos. A teoria sobre a função de reserva de nitrogênio não é ainda bem aceita (Harbone, 1984).

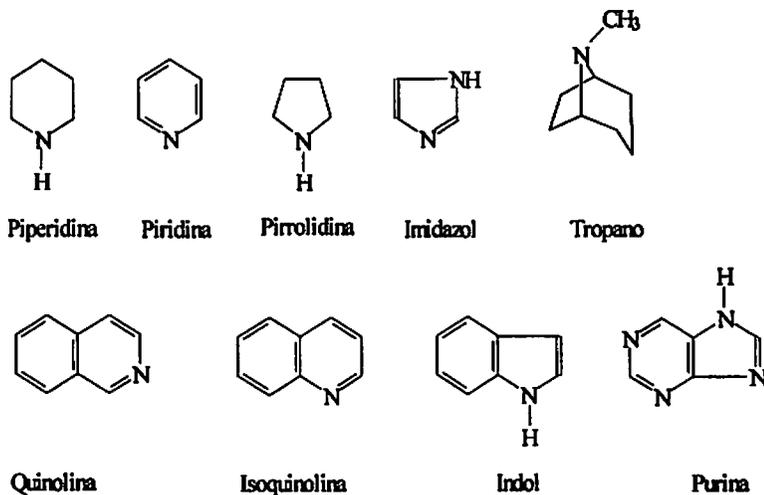


FIGURA 38. Estruturas químicas básicas dos alcalóides. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Os alcalóides apresentam a tendência de acumularem-se principalmente nos tecidos em crescimento ativo, nas células epidérmicas, na bainha vascular e vasos laticíferos (Goodwin & Mercer, 1983). Esse acúmulo depende do grau de diferenciação do tecido e do estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta (Balandrin & Kloche, 1988).

4.3 Flavonóides

Os flavonóides caracterizam-se estruturalmente por serem polifenólicos derivados de C6-C3-C6, ligados na orientação cabeça-cauda e que podem conter como substituintes, hidroxilas ou seus derivados funcionais, tais como ésteres, metoxilas, além de glicosídeos, isoprênicos, etc, presos em posições específicas dos anéis (Figura 39). Algumas reações levam à formação de flavonóides contendo um anel de cinco membros, as auronas (Figura 40), outras, por isomerização, levam à formação de flavonóides de cadeia aberta, as chalconas (Figura 41) (Cardoso et al., 2001).

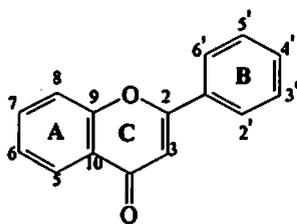


FIGURA 39. Estrutura básica dos flavonóides.

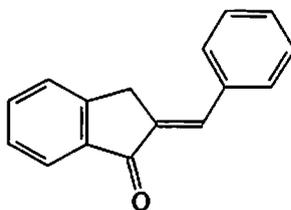


FIGURA 40. Estrutura química básica das auronas

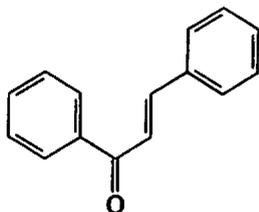
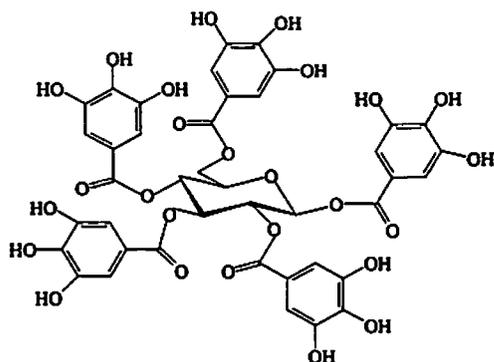


FIGURA 41. Estrutura química básica das chalconas.

4.4 Taninos

São compostos fenólicos, de sabor adstringente, derivados de fenilpropanos capazes de formar complexos com proteínas, açúcares e alcalóides indólicos. Dividem-se em duas categorias: derivados de esqueletos $(C_6-C_1)_n$, chamados de taninos hidrolisáveis (Figura 42 e 43) e derivados de esqueleto $(C_6-C_3-C_6)_n$, chamados de taninos condensados ou prontocianidinas (Figura 44) (Cardoso et al., 2001).



β -1,2,3,4,6-pentagaloiil-D-glucose

FIGURA 42. Exemplo de um tanino hidrolizável da classe dos galotaninos.

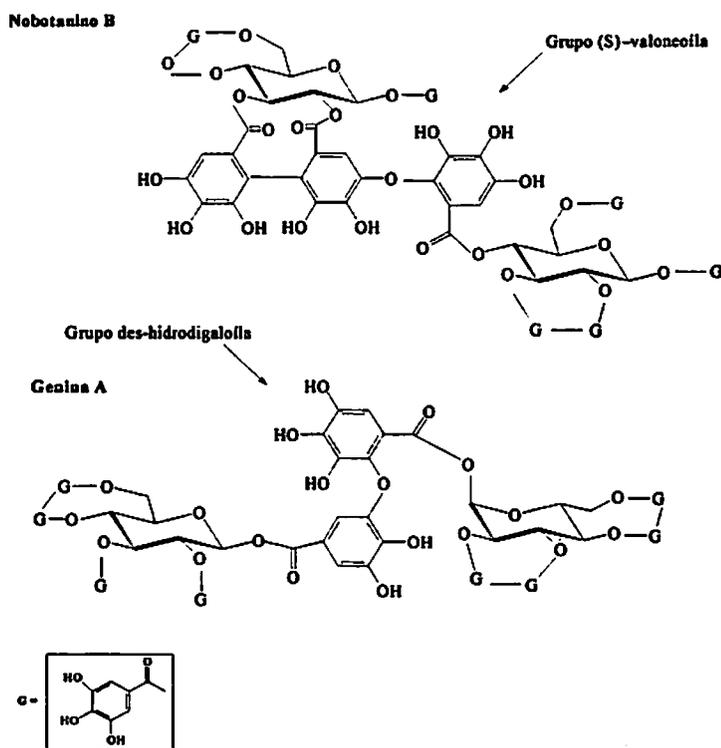


FIGURA 43. Exemplo de taninos hidrolizáveis da classe dos elagitaninos.

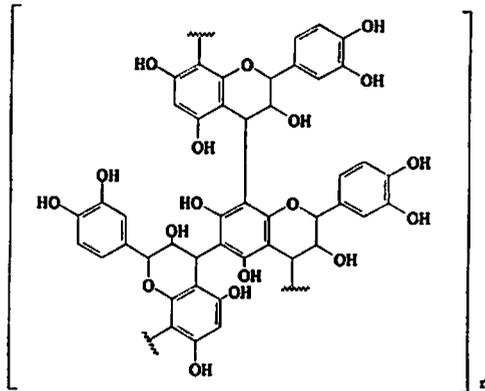


FIGURA 44. Estrutura básica de tanino condensado.

4.5 Análise e determinação química

De acordo com Matos (1988), estudo fitoquímico consiste na extração e identificação dos metabólitos secundários, buscando conhecer a composição e a estrutura dessas substâncias. Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior quantidade são isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito complexa e longa; geralmente, os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

A análise fitoquímica preliminar, no entanto, pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Os passos básicos para o desenvolvimento desse estudo consistem em: escolha da planta a ser estudada, identificação botânica, coleta e preparação do material vegetal, prospecção preliminar de sua composição química, isolamento e purificação dos constituintes principais, determinação da estrutura molecular dos compostos químicos isolados e purificados (Matos, 1988; Simões et al., 1999).

Quando se pretende obter substâncias ativas em plantas, a seleção baseia-se em informações da medicina popular, pois, é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pela mesma do que aquelas escolhidas ao acaso. Deve-se, porém, dar sempre importância às informações botânico-taxonomias e químico-taxonomias. Como a constituição química da maioria das plantas difere significativamente em relação às distintas partes, parece mais viável inicialmente estudar aquela empregada na medicina popular e, posteriormente, as outras partes da planta, que também podem conter princípios ativos (Tortoriello et al., 1995; Ferri, 1996 e Montellan, 1975; Farnsworth, 1981; Unander, 1995, citados por Pereira, 1999).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para se identificar, isolar e purificar os seus constituintes fixos (Matos, 1988). A escolha por um determinado método de extração vai depender da textura e do conteúdo de água presente no material a ser extraído, bem como do tipo de substância que se deseja isolar (Ferri, 1996).

Para se proceder à caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes em um vegetal, deve-se primeiro extrair compostos com um solvente adequado, para depois caracterizá-los no extrato. A caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido investigada por meio de reações químicas, que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (Simões et al., 1999).

Após a extração, são realizadas técnicas de fracionamento dos extratos vegetais com vistas ao isolamento, das quais se obtêm extratos semipuros, frações e, finalmente, os compostos puros (Cechinel Filho & Yunes, 1998).

4.6 Extração, separação e identificação de princípio ativo em material vegetal e calos de *Rudgea viburnoides*

Em estudos químicos de material vegetal, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, é necessário submetê-lo a sucessivas extrações com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade crescente conforme apresentado na Tabela 47.

TABELA 47 - Tipos de substâncias encontradas na extração por solventes, em ordem crescente de polaridade, de acordo com Falkenberg, et al. (1999).

Solventes	Tipos de substâncias preferencialmente extraídas
éter de petróleo, hexano: diclorometano, clorofórmio:	lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas; bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, glicosídeos carditônicos;
acetato de etila, butanol: etanol, metanol:	flavonóides, cumarinas simples; heterosídeos, em geral
misturas hidroalcoólicas, água:	saponinas, taninos;
água acidificada:	alcalóides;
água alcalinizada:	saponinas

É importante ressaltar que o solvente a ser utilizado deve ser o mais seletivo possível, pois é graças a essa característica que o mesmo pode extrair apenas as substâncias desejadas e em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (Falkenberg, et al., 1999). Na escolha de um solvente, além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo, devem ser considerados a toxicidade e/ou risco que seu manuseio representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente (Prista, et al., 1981).

A separação e purificação dos constituintes químicos de extratos vegetais é realizada por meio de técnicas cromatográficas, nas quais os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases que se encontram em contato íntimo; a fase estacionária e a fase móvel, que se desloca através daquela. Durante o deslocamento da fase móvel através da fase estacionária, os componentes em mistura são retidos seletivamente pela fase estacionária. Como resultado dos diferentes graus de afinidade de cada um dos componentes em mistura com a fase estacionária, ocorrem migrações diferenciais (Collins, 1997).

Apesar de já terem sido desenvolvidas técnicas de cromatografia modernas que possibilitam uma separação dos componentes em mistura de extratos de plantas mais rápida e eficiente, a cromatografia líquida em coluna (CLC), mesmo sendo mais demorada, é extensamente empregada, por ser uma técnica simples e não exigir instrumentação sofisticada. Mas, é indispensável um monitoramento das características das amostras em cromatografia de camada delgada (CCD) antes de se usar a CLC (Costa, 1982; Shriner et al., 1983; Falkenberg, et al., 1999).

A CLC ou de adsorção consiste em um tipo de cromatografia em que se utiliza uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária), sendo a sílica gel e a alumina as mais utilizadas, e uma fase móvel líquida, em que dependendo do extrato, é eluída com uma mistura de solventes que devem ser anteriormente determinados por CCD. A CLC é muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. O processo de adsorção consiste num aumento da concentração do material (que se encontra em excesso na fase móvel) entre as superfícies da fase móvel e estacionária (Collins, 1997; Degani, et al., 1998).

A cromatografia destaca-se entre os métodos mais modernos e eficientes de análise, por causa da facilidade em ser efetuada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de

infravermelho e ultravioleta (IV, UV) ou a espectroscopia de massa (EM). A análise de IV é muito sensível à multiplicidade de ligações e à composição atômica dos grupos funcionais. Sendo assim, em grande parte, com um ensaio dos grupos funcionais da molécula, pode-se inferir algumas conclusões gerais sobre a sua estrutura e, através da EM, pode-se obter a fórmula molecular, assim como o padrão de fragmentação da molécula (Shriner et al., 1983; Ferri, 1996; Collins, 1997).

Uma outra característica a ser determinada e utilizada como auxiliar em análises fitoquímicas é o ponto de fusão. Toda substância sólida, cristalina e pura está definida pelo seu ponto de fusão. Essa constante física é determinada com o fim de avaliar o estado de pureza das substâncias isoladas. Às vezes, essas decompõem-se antes de se fundirem; contudo, se tal transformação se realizar à mesma temperatura, pode-se utilizar o mesmo modo de reconhecimento. O comportamento da substância em CCD e a análise elementar de CHN também são métodos de determinação da pureza (Costa, 1982; Matos, 1988).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) fornece informações sobre tipos, números e conectividade dos átomos em particular. A RMN pode ser aplicada em moléculas em qualquer estado de matéria. A determinação de quase todas as moléculas orgânicas e biológicas começa com essa técnica, que é a ferramenta química mais direta para identificar a estrutura, tanto de compostos puros quanto de misturas de compostos. O processo envolve várias representações experimentais para deduzir a estrutura molecular de propriedades magnéticas dos núcleos atômicos e dos elétrons circunvizinhos (Lambert et al., 1998).

Uma vez fracionada a amostra, o uso em conjunto de técnicas espectrais, como UV, IV, EM, que pode ser acoplada a um cromatógrafo gasoso (CG/EM), e técnicas refinadas, como a ressonância magnética protônica (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) tem permitido propor com segurança a estrutura molecular

de substâncias naturais. O resultado desses e o uso de análises de determinação da atividade ótica e da difração por Raio-X permitem avaliar a estereoquímica real dessas substâncias (Cechinel Filho & Yunes, 1998; Falkenberg, et al., 1999).

Com o desenvolvimento das técnicas espectroscópicas, tem-se conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas (Cechinel Filho & Yunes, 1998). Diversos pesquisadores citam a identificação de compostos puros por meio de estudos científicos aplicados para cada caso específico. Sendo assim, têm sido possível identificar novos compostos, como a alantoína, que foi identificada em *Cordia verbenaceae* Vell. (Boraginaceae) pelo uso da análise elementar de CHN, IV e RMN ^1C e ^{13}C (Saito, et al., 1985). Outros compostos identificados em folhas e células de *Cordia verbenaceae* L. foram caracterizados como sendo flavonóides 7,4'-diidroxí-5 carboximetoxiisoflavona e 7,4' diidroxí-5'-metilisoflavona, por meio de espectrometria no IV, UV, EM e RMN ^1H (Lameira, 1997). Nas partes aéreas de *Eugenia moraviana* Berg, conhecida por Cambuí, as estruturas dos compostos identificados por espectros IV, EM e RMN ^1H foram caracterizadas como triterpeno ácido 6- α -hidroxibetulínico, nor-triterpeno ácido platânico e β -sitosterol (Lunardi, et al., 1998). Em folhas de *Maytenus truncata*, ou espinheira-santa, foram isolados, por Salazar et al. (1998), os triterpenos pentacíclicos α -friedelinol, β -friederinol e friedelina e o poliol dulcitol, utilizando dados de espectrometria no IV e ponto de fusão misto, comparados com aqueles encontrados na literatura de amostra autêntica. Viana, et al. (1998), em cascas de *Bauhinia guianensis* Aublet., conhecida popularmente como jaboti, elucidaram através de RMN ^1H , IV e EM o β -sitosterol e estigmasterol nas formas livres e glicosiladas. As naftoquinonas (lapachol, desidro- α -lapachina e α -lapachona) foram quantificadas no extrato etanólico das raízes de *Zeyheria montana* Mart.

(Bignoniaceae), sendo suas estruturas confirmadas comparando-se os dados das espectrometrias no IV, RMN ^1H e ^{13}C e de massa com dados de literatura (Jacomé et al., 1999). A elucidação do flavonóide trixol em folhas frescas de *Trixis vauthhieri* DC (Asteraceae), que mostrou efeito tripanossomicida eficiente em ensaios in vitro, foi possível graças à utilização de técnicas modernas de RMN e EM (Ribeiro et al., 1999).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta do material

O material vegetal (folhas, caule e raízes) foi coletado no município de Itumirim – MG, nos períodos da manhã dos dias 10, 11 e 12 de agosto de 1999. Após a coleta, o material foi imediatamente levado para o Laboratório de Química Orgânica no Departamento de Química, da UFLA; no laboratório, foi realizada “toalette” e, posteriormente, o material foi triturado com o auxílio de um triturador tipo Politron®. Em seguida, foram pesados 500 g de folhas e 500 g de caules. As raízes foram primeiramente lavadas e colocadas para secar em estufa ventilada à temperatura de 30 °C e por causa da heterogeneidade do material e dificuldade de trituração, foram classificadas em frações conforme a seguir: pequenas (raízes com comprimento menor do que 2,0 cm), médias (2,0-3,0 cm) e grandes (6,0-7,0 cm), correspondendo a 137,2 g; 122,44 g e 115,66 g, respectivamente

5.2 Obtenção dos extratos

Para obtenção dos extratos, o material foi submetido a extração a frio com solventes de polaridade crescente e condicionado em local isento de luz. Primeiramente, macerou-se o material verde, deixou-se em repouso por 8 dias em hexano; em seguida, filtrou-se a vácuo, em funil de Büchner, sendo

concentrado em evaporador rotatório modelo Büchi R-14 sob pressão reduzida. O concentrado, foi levado à estufa a 40 °C para completa evaporação do solvente, obtendo-se, desta forma, o extrato hexânico. A torta resultante foi colocada para secar em estufa ventilada a 30 °C. Prosseguindo, o resíduo foi colocado em clorofórmio, submetendo-o a mesma metodologia anterior e, assim, sucessivamente com o acetato de etila e o metanol. O processo de obtenção dos extratos brutos encontra-se esquematizado na Figura 45.

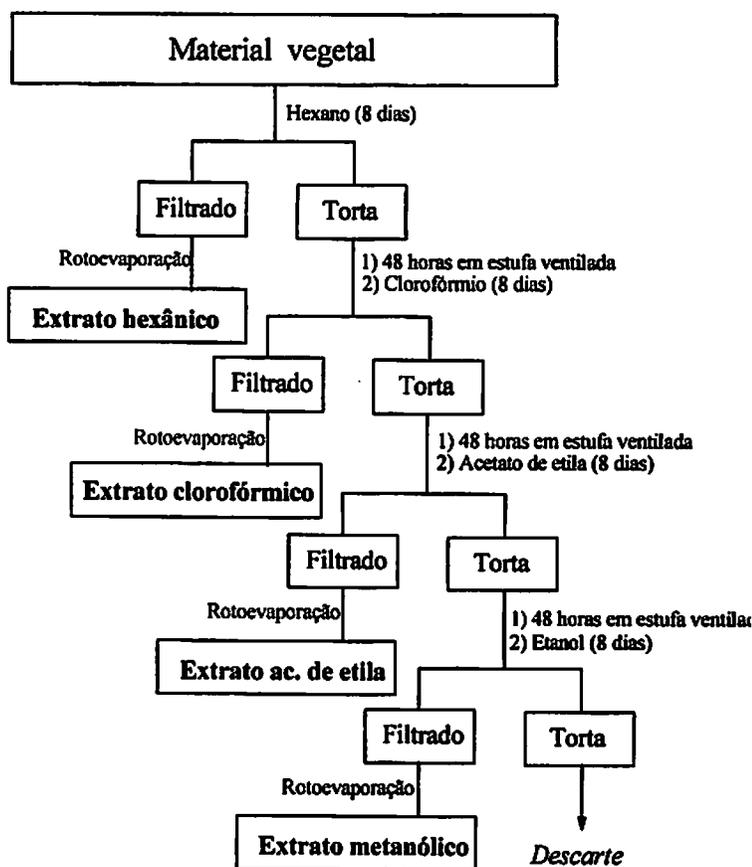


FIGURA 45. Esquema geral de obtenção dos extratos brutos de *Rudgea viburnoides* com solventes de polaridade crescente modificado. (Shan, 2002). UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

5.3 Avaliação fitoquímica

Os extratos brutos foram submetidos aos testes de solubilidade nos seguintes solventes (polaridade crescente): hexano, éter de petróleo, ciclohexano, pentano, tetracloreto de carbono, benzeno, diclorometano, clorofórmio, éter etílico, acetato de etila, acetona, butanol, isopropanol, propanol, etanol, metanol e água. Posteriormente, esses foram submetidos à cromatografia líquida de coluna CLC, em coluna de 50 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro e recheada com sílica gel 70-230 mesh Merck® e eluídos com hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e ácido acético. Esses solventes foram definidos pela série eluotrópica em cromatografia de camada delgada (CCD).

Após a evaporação dos solventes, algumas das frações dos extratos apresentaram a formação de cristais, evidenciando que se encontravam-se puros e foram determinados os pontos de fusão das amostras selecionadas, usando-se o tubo de Thiele, em que pequenas quantidades das amostras foram introduzidas em tubos capilares com uma das extremidades fechadas. Amostras do mesmo material foram submetidas a testes de solubilidade e espectrofotometria de IV e RMN¹H e RMN¹³C. Foram ainda colhidas informações de característica físicas e organolépticas, como: cor, odor, aparência dos cristais formados, higroscopicidade e indicação de mistura.

Das raízes, somente foi observada a formação de cristais na fração raiz média, sendo isoladas do extrato bruto hexânico duas amostras: amostra 1 - eluída na fração metanol e a amostra 2 - eluída na fração intermediária metanol e ácido acético. Da folha foram separadas três amostras, duas do extrato bruto hexânico: amostra 3 - eluída na fração intermediária metanol e ácido acético e a amostra 4 - eluída também da fração intermediária metanol e ácido acético; e uma do extrato bruto clorofórmico; amostra 5 - eluída da fração metanol. Do caule, foram separadas três amostras, sendo uma do extrato bruto em acetato de

etila, amostra 6 – eluída da fração intermediária metanol e ácido acético; uma do extrato bruto hexânico, amostra 7 – eluída da fração metanol e uma do extrato bruto clorofórmico; amostra 8 – eluída da fração intermediária etanol e metano. Dos calos, foram separadas duas amostras do extrato bruto metanólico: amostra 9 – eluída da fração intermediária ácido acético e água e a amostra 10 – eluída da mesma fração intermediária.

As amostras isoladas após a CLC e evaporação dos solventes apresentaram-se inodoras, com cristais com aparência de pó fino e higroscópicas, exceto as amostras 9 e 10 oriundas de material *in vitro* (calos), que apresentaram odor adocicado (rapadura) e cristais com aparência de pó um pouco mais grosso.

As substâncias isoladas foram caracterizadas pelo seu fator de retenção (Rf), que consiste na relação entre a distância percorrida desde a origem pela substância em estudo e a distância percorrida desde a origem pela fase móvel, sendo esse valor obtido a média de três placas. As manchas foram reveladas em atmosfera saturada de iodo.

A espectrofotometria de infravermelho (IV) foi obtida utilizando-se espectrômetro modelo FTIR – 8201 A- Shimadzu, empregando-se pastilhas de KBr como suporte.

As substâncias isoladas dos extratos brutos hexânico do material vegetal *in vitro* foram submetidas a reações para a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse, por meio de reações químicas específicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico, conforme modelo de triagem fitoquímica preconizado por Matos (1988), utilizando-se os reagentes descritos na Tabela 48.

TABELA 48. Reagentes utilizados na identificação das classes de metabólitos presentes em material vegetal de *Rudgea viburnoides*.

Classe de metabólito	Reagentes
Ácidos orgânicos	Reativo de Pascová
Açúcares redutores	Reativo de Fehling
Polissacarídeos	Lugol
Proteínas e aminoácidos	Reativo de Molish
Lactonas e Sesquiterpenlactonas	HONH ₃ +Cl-10 % /KOH 10 % /FeCl ₃ 1 %
Azulenos	Reativo de Kaiser
Carotenóides	Ácido trifluoracético
Esteróides e Triterpenoides	Reação de Liebermann-Burchard
Depsídeos e depsidona	Éter /Metanol /FeCl ₃
Cumarinas	Éter /NaOH 1N /luz U.V.
Saponinas	Solução de etanol a 80%
Taninos	Solução ácida de cloreto férrico a 1%
Flavonóides	Teste de cianidina
Flavonóides	Solução acidificada / magnésio
Alcalóides	Reagente de Bouchardat
Alcalóides	Reativo de Mayer
Alcalóides	Reativo de Dragendorff
Alcalóides	Reativo de Bertrand
Antraquinonas	Reação de Bornträger
Purinas	HCl 6N/H ₂ O ₂ 30 %
Catequinas	Vanilina 1 % / HCl

Os calos provenientes de material vegetal cultivado *in vitro* obtidos em meio contendo 2,4-D (amostra 5) e 2,4-D + ANA (amostra 6) foram submetidos à secagem em estufa ventilada a 45° C e pesados (6,9555 g). Posteriormente, o

material foi triturado em cápsula de porcelana com torpedo e colocado em metanol por 8 dias em local protegido da luz. Em seguida, filtrou-se em funil de Büchner, evaporou-se em evaporador rotatório, concentrou-se e levou-se à estufa a 40 °C para completa evaporação do solvente.

As amostras de calos foram diluídas em metanol e também submetidas a CLC e monitoradas conforme metodologia anterior. Posteriormente, foram submetidas a testes de solubilidade, determinação do ponto de fusão, espectrometria de IV e RMN.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 49 estão relacionadas as principais características das substâncias isoladas.

TABELA 49. Características das substâncias isoladas após a cromatografia líquida de coluna (CLC) e evaporação dos solventes: UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Substância	Origem	Coloração	P.F (°C) ¹	Solubilidade	IV
Amostra 1	Folha	Branca/ amarelada	46 – 48	Metanol	Fig. 46-48
Amostra 2	Raiz M	Amarela	220 – 230	Metanol	Fig. 49
Amostra 3	Raiz M	Rósea	270 –275	Metanol	
Amostra 4	Caule	Bege	218 – 230	Metanol	Fig. 50
Amostra 5	Calo	Marrom		Clorofórmio Ácido acético/Água	
Amostra 6	Calo	Marrom		Ácido acético/Água	

¹Ponto de fusão;

As amostras foram, em sua maioria, solúveis em metanol e na mistura ácido acético/água, indicando tratar-se de substâncias com caráter altamente

polar. O ponto de fusão das substâncias pode ser considerado alto para substâncias orgânicas; entretanto, não ocorreu decomposição.

De forma geral, as substâncias isoladas foram solúveis nos mesmos solventes nos quais seus respectivos extratos brutos foram extraídos (Tabela 50).

TABELA 50. Solubilidade dos estratos brutos hexânico (H), clorofórmico (C), acetato de etila (AE) e metanol (M), das substâncias isoladas após CLC e evaporação dos solventes¹. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Amostra	Origem	Extrato bruto	H	C	AE	M	H ₂ O
1	Raiz M	H	S	S	S	PS	I
2	Raiz M	H	S	S	S	PS	I
3	Folha	H	S	S	S	PS	I
4	Caule	AE	S	S	S	PS	I
5	Calo	M	I	PS	S	S	PS
6	Calo	M	PS	PS	I	S	PS

¹ S = solúvel

PS = pouco solúvel

I = insolúvel

A triagem fitoquímica realizada nas substâncias isoladas indicou a presença de taninos, açúcares redutores na folha, caule e raiz e alcalóides no caule (Tabela 51), comprovado pelos testes de solubilidade, inferindo-se a presença de grupos hidroxílicos e amínicos altamente polares nessa classe de compostos.

Os espectros de IV, obtidos dos extratos foliares, das figuras 46 – 48 são similares, apresentando sinais de absorção bem característicos. No intervalo de 3500 – 3000 cm⁻¹, observa-se uma banda larga, a qual é atribuída à presença de ligação O–H de álcoois primários, secundários ou terciários, sobrepostos com grupos metilas (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e metínicos (-CH) presentes. A presença de duplas ligações é evidenciada pelo sinal forte em 1610 – 1608 cm⁻¹.

Na região compreendida entre 1400 – 1380 cm^{-1} (Figura 54), observa-se um duplete, o qual é característico de ramificação isopropila. Esses provêm da interação das deformações angulares simétricas do CH_3 de ambos os grupamentos metila em fase e fora de fase. A presença de um sinal centrado em 1053 – 1026 cm^{-1} confirma a presença da ligação C-O de álcoois, que de acordo com a literatura, pode ser característica de álcoois. A feição de espectro na região entre 3500- 1026 cm^{-1} , aliado à presença dos sinais de 1053 a 1026 cm^{-1} , inferiram que se tratava de um açúcar.

TABELA 51. Reações observadas nos extratos hexânicos da folha, caule e raiz. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Reação	Folha	Caule	Raiz
Taninos	+	+	+
Flavonoides	-	-	-
Alcalóides	-	+	-

Os espectros de IV, obtidos dos extratos do caule, das figuras 49 e 50, apresentam-se bastante similares. Nesses, observa-se no intervalo compreendido entre 3500 – 3000 cm^{-1} uma banda larga, a qual é atribuída a presença da ligação O-H de álcoois primários, secundários ou terciários, sobrepostos com grupos metilas ($-\text{CH}_3$), metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$). A presença de duplas ligações é evidenciada pelo sinal centrado em 1600 – 1608 cm^{-1} , conjugado com um sinal centrado em 1400 cm^{-1} . Na região compreendida entre 1150 – 1085 cm^{-1} , observa-se um sinal fraco o qual é atribuído a deformação axial assimétrica de C-O-C.

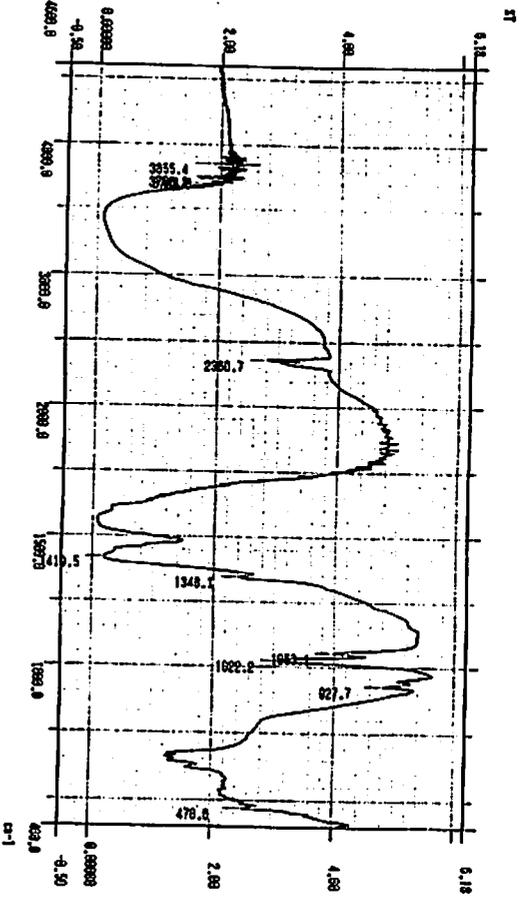


FIGURA 46. Espectro no infravermelho da amostra de folhas de *Rudgea viburnoides* obtidas *in vivo*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

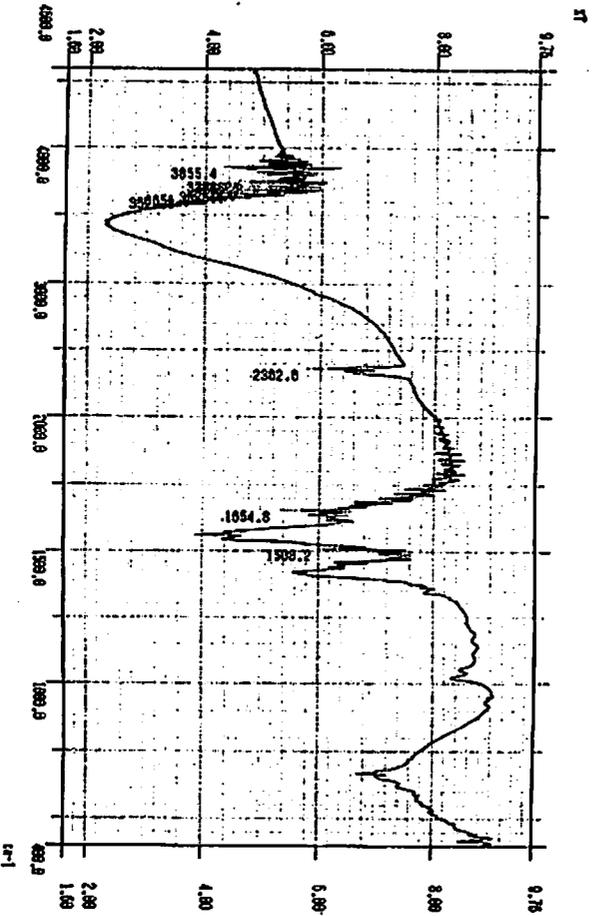


FIGURA 47. Espectro no infravermelho da amostra de folhas de *Rudgea viburnoides* obtidas *in vivo*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

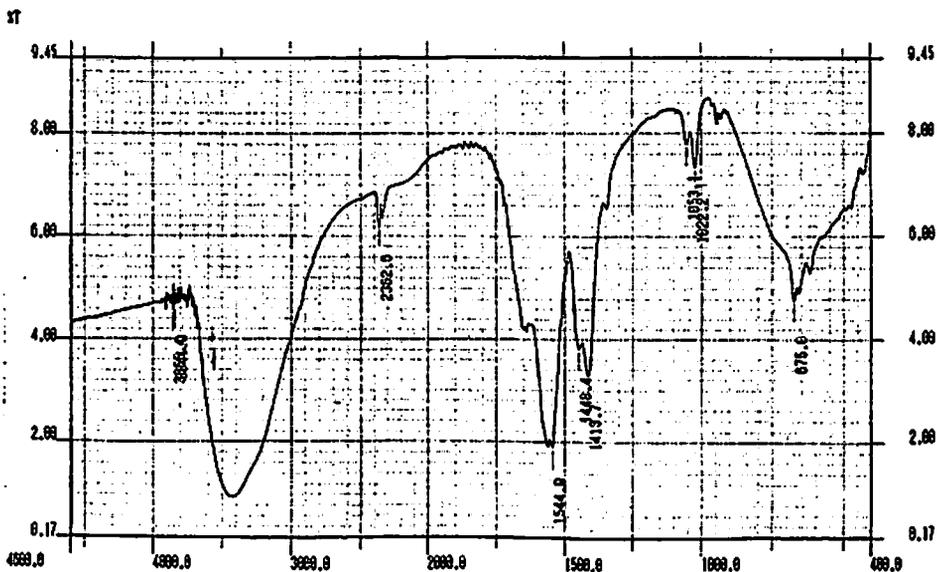


FIGURA 48. Espectro no infravermelho da amostra de folhas de *Rudgea viburnoides* obtidas *in vivo*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

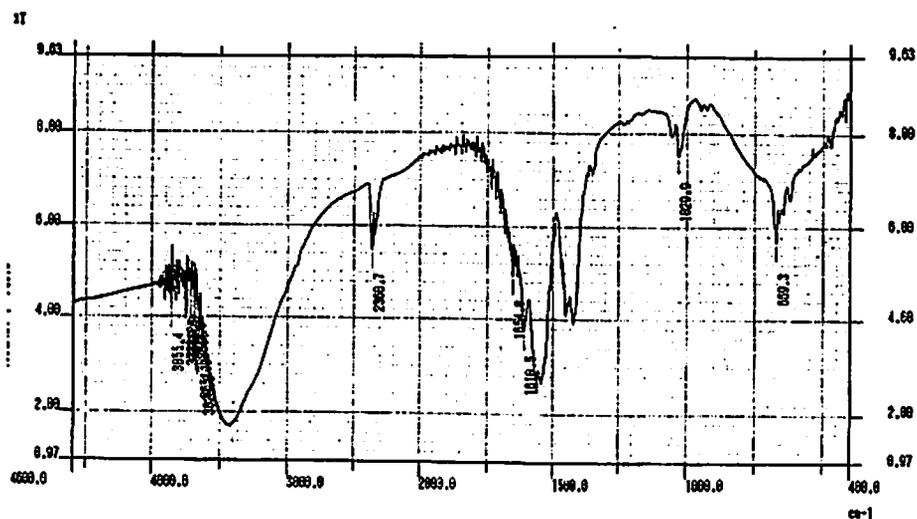


FIGURA 49. Espectro no infravermelho da amostra de raízes média de *Rudgea viburnoides* obtidas *in vivo*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002

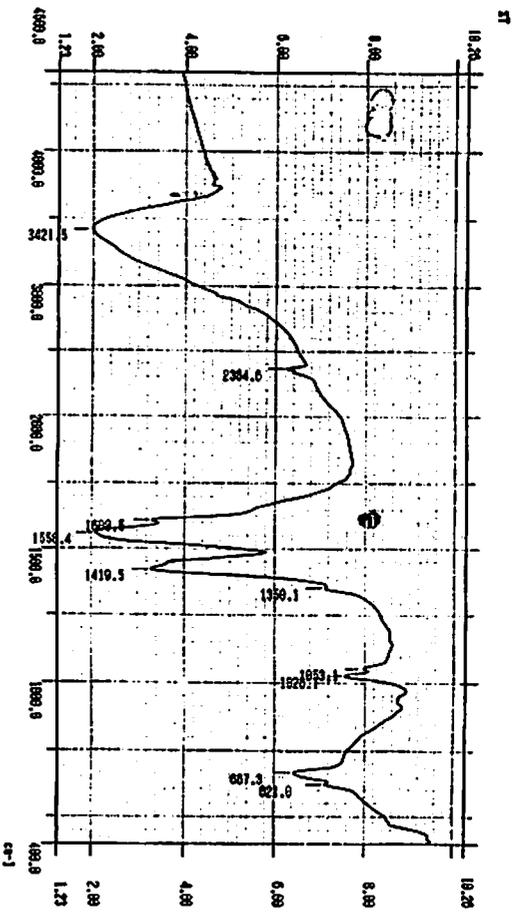


FIGURA 50. Espectro no infravermelho da amostra de raízes média de *Rudgea viburnoides* obtidas *in vivo*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

Os valores de Rf (fator de retenção) obtidos estão apresentados na Tabela 52. Todos os valores foram obtidos por média de três repetições.

TABELA 52.-Valores de Rf das substâncias isoladas e misturas binárias utilizadas nas cromatoplacas. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Amostra	Solubilidade	Eluentes	Rf	Figura
2	Metanol	Metanol/Ácido acético (1:9)	0,88	51
3	Metanol	Metanol/Ácido acético (3:7)	0,84	52
4	Metanol	Metanol/Ácido acético (3:7)	0,92	53
6	Metanol	Metanol/Ácido acético (3:7)	0,90	54

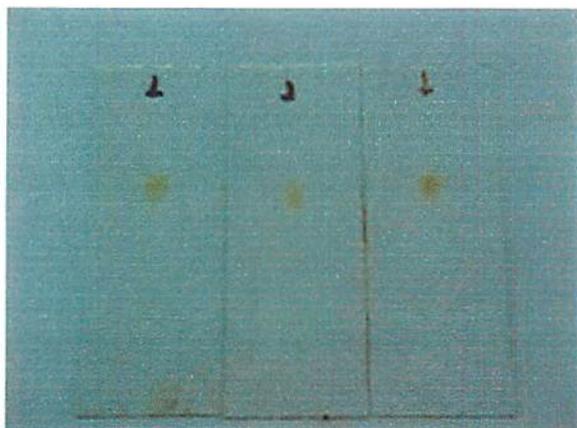


FIGURA 51. Cromatogramas da amostra 2 desenvolvidas em metanol e ácido acético 1:9 e reveladas à exposição a vapores de iodo. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

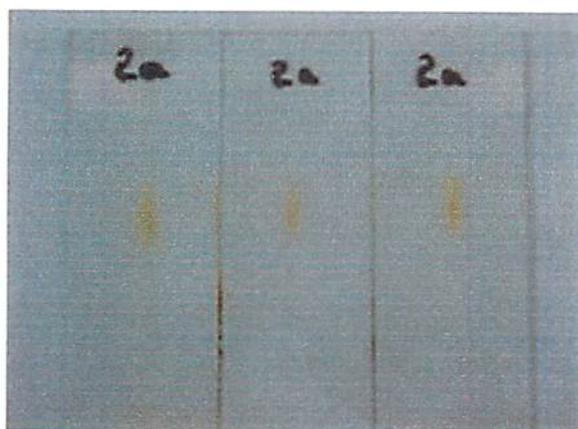


FIGURA 52. Cromatogramas da amostra 3 desenvolvidas em metanol e ácido acético 3:7 e reveladas à exposição a vapores de iodo. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

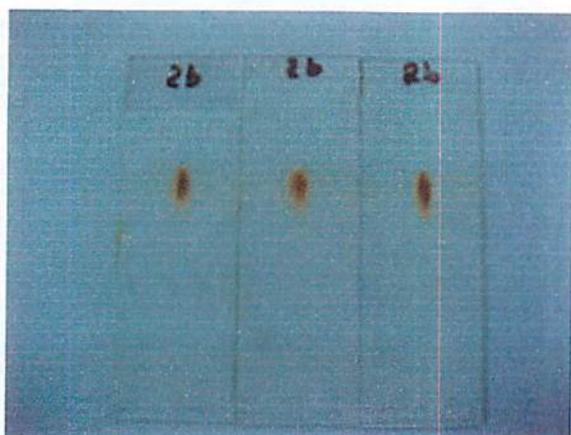


FIGURA 53. Cromatoplasmas da amostra 4 desenvolvidas em metanol e ácido acético 3:7 e reveladas à exposição de vapores de iodo. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

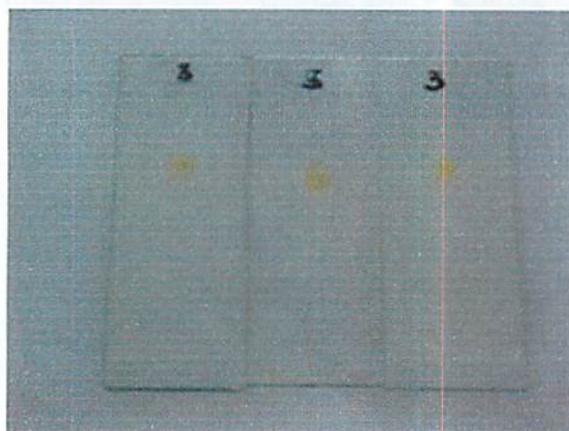


FIGURA 54. Cromatoplasmas da amostra 6 desenvolvidas em metanol e ácido acético 3:7 e reveladas à exposição de vapores de iodo. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

Observa-se pelos dados da Tabela 51 e das Figuras 53 e 54, que os valores de Rf são praticamente os mesmos, utilizando-se a mesma mistura binária metanol/ácido acético (3:7). Assim, infere-se que o composto majoritário

presente na amostra 4 provavelmente estará presente na amostra 6. No entanto, não se pode dizer o mesmo sobre as amostras 2 e 3, em que os valores são diferentes.

Na Figura 55 encontra-se o espectro de massa da substância isolado, do material vegetal (caule, raiz) de *Rudgea viburnoides*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002.

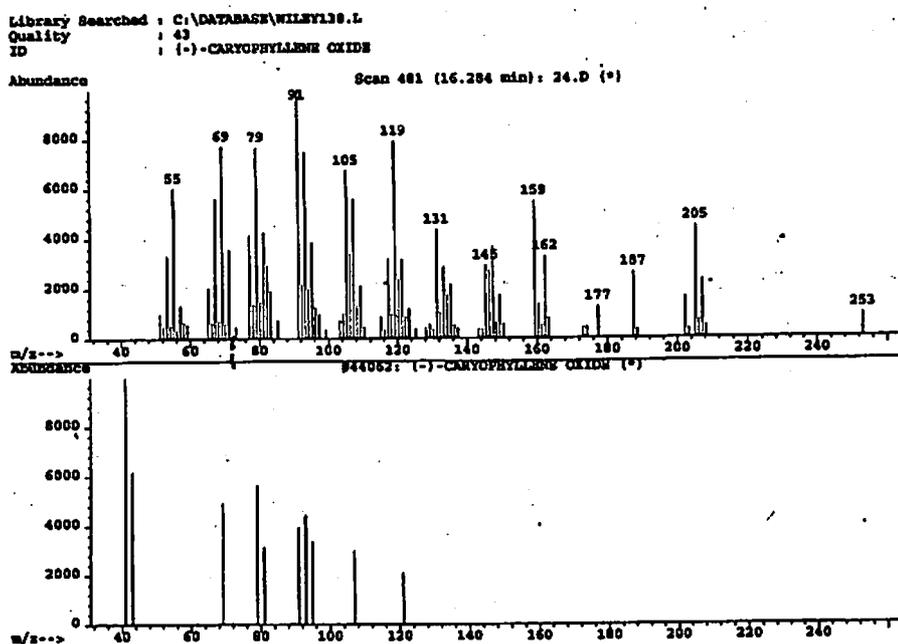


FIGURA 55. Espectro de massa da substância isolada de material vegetal (caule e raiz) de *Rudgea viburnoides*. UFLA/DQI, Lavras - MG, 2002

Os espectros de massa das substâncias isoladas do caule e da raiz, apresentaram como composto majoritário o óxido de cariofileno hidroxilado, com peso molecular de 253 g/mol e de fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_3$ (Figura 56).

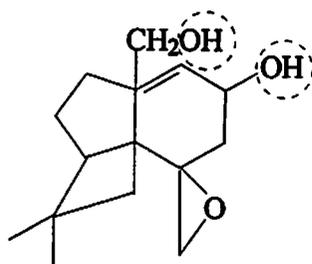


FIGURA 56. Representação gráfica da estrutura molecular da substância isolada do caule e raiz de *Rudgea viburnoides*. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

O cariofileno, provavelmente o precursor básico, também denominado de β -cariofileno, possui o núcleo do cariofilano : dois ciclos, o maior com nove átomos de cariofileno, e o segundo do dimetil ciclo butano e ligações duplas (Figura 57).

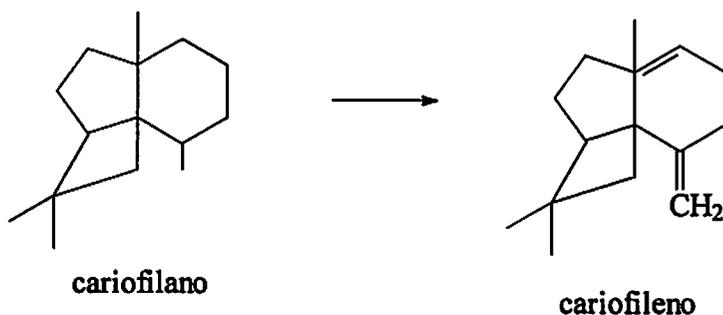


FIGURA 57. Representação gráfica da estrutura do cariofileno e do cariofilano. UFLA/DQI, Lavras – MG, 2002.

No entanto, para uma elucidação final da posição das duas hidroxilas, há necessidade de outras análises.

7 CONCLUSÕES

Isolaram-se três substâncias dos extratos de folhas, caules e raiz. As análises físico-químicas e espectrométricas mostraram que, uma das substâncias presentes nas folhas é um açúcar, ao passo que no caule e na raiz, foi encontrado como constituinte no caule e raiz o óxido de cariofileno, composto de fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_3$ e peso molecular de 253 g/mol.

8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho, cujo objetivo foi estabelecer um protocolo eficiente para propagação *in vitro* e estudo dos compostos secundários presentes na espécie, foi realizada uma série de estudos preliminares.

Foram utilizadas plântulas provenientes da germinação de embriões zigóticos, uma vez que a utilização de material proveniente da germinação de sementes foi inviável, pois a grande maioria das sementes em condições de campo encontram-se comprometidas pelo ataque de brocas e posterior infestação por agentes patogênicos. A cultura dos embriões sadios teve êxito e a partir desse momento todo o material vegetal utilizado provinha dessa fonte.

Na tentativa de induzir a calogênese, foi tentada a utilização de explantes foliares e caulinares jovens de plantas *in vivo*. Contudo, o índice de contaminação, mortalidade e oxidação dos explantes tornou inadequada a sua utilização.

Em *Rudgea viburnoides*, a utilização de BAP não diminuiu o tamanho das brotações. Contudo, observando-se que o tamanho de brotações no nível de $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ foi de 3,0 cm e que o número de brotações totais $< 1,0$ foi de 5,6; infere-se que a espécie tem um grande potencial de brotação, e um alongamento maior viabilizaria sua utilização na multiplicação. Verificou-se que a maior

contribuição ao rendimento de segmentos nodais total provém dos brotos adventícios. Para algumas espécies, a combinação de auxina e citocinina parece ser positiva no incremento do número e altura de brotos. Por outro lado, seria interessante estudar o efeito do GA₃ em baixas concentrações com o objetivo de estimular o alongamento dos brotos axilares, pois conforme visto por meio da estimativa total de rendimento de segmentos nodais (ERTSN), verifica-se que apesar de ocorrer aumento do número de brotos como efeito do BAP, esses não possuíam um comprimento ideal para um posterior subcultivo.

No presente trabalho, a auxina foi adicionada ao meio e, dessa maneira, sua presença ocorreu durante todas as fases de rizogênese. Parece, como foi verificado em outras espécies, principalmente nas espécies frutíferas, que a presença de auxina durante as outras fases de enraizamento pode ser inibitória.

Uma questão a ser estudada é o efeito das condições de luminosidade, uma vez que, em algumas espécies, a rizogênese é estimulada pela condição de baixa luminosidade, como observado quando da adição de carvão ativado em algumas culturas.

Uma outra consideração quanto ao enraizamento é o estudo da possibilidade de enraizamento *ex vitro* utilizando apenas pulsos de exposição dos segmentos a auxinas ou auxinas menos estáveis. O que sempre deve ser levado em consideração é minimizar os gastos com mão-de-obra, evitando-se o máximo possível uma fase específica de alongamento *in vitro*.

Foi tentada a aclimatação da cultura utilizando-se os segmentos enraizados *in vitro* e plantando-os após "toalette" dos propágulos em bandejas contendo como substrato Plantimax® em estufa e protegendo-se as plântulas com sombreamento, mas houve um baixo rendimento de plantas viáveis, sendo necessário o estudo de um outro substrato ou condições ambientais.

A observação quanto à diferença de indução de calos de material recém-germinado, ou seja, após um único subcultivo, comparado com o material várias vezes subcultivado, merece um posterior estudo mais detalhado.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. 1998. 113p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALFERMANN, A.W.; PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.43, p.199-205, 1995.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J. Medicinal, aromatic, and industrial materials from plant. In BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Medicinal and aromatic plant 1*. Berlin: Springer Verlag, 1988. p.3-33. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4).

BERTOLUCCI, S.K.V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham. Lavras:UFLA, 2000. 79p. (Dissertação – Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica).

CARDOSO, M. das G.; SHAN, A.Y.K.V.; PINTO, J.E.B.P.; DELU, FILHO, N.; BERTOLUCCI, S.K.V. Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal. Lavras:UFLA, 2001. 81p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, São Paulo, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Coord). *Introdução a métodos cromatográficos*. 7.ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279p.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*. New York: Academic Press, 1981. 798p. (Secondary Plant Products, v.7).

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982. v.3, p.193, 926, 940.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.1, p.436-441.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Química Nova**, São Paulo, n.7, 21p, 1998.

DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A. (ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.1-20.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis:UFRGS/UFSC, 1999. p.163-179.

FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. Cap.10, p.129-156.

FOWLER, M.W. Plant cell culture: fact and fantasy. **Biochemical Society Transaction**, Aberdein, v.11, 23-28, 1982.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. **Introduction to plant biochemistry**. Orford: Plorjamon. Press, 1983. 671p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-170.

HARBONE, J.B. **Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant analysis)** 2.ed. London: Chapman end Hall, 1984. 288p.

JACOMÉ, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MÜLLER, A.; WAGNER, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria Montana* M. (bolsa-de-pastor). **Química Nova**, São Paulo, v.2, n.22, p.175-177, 1999.

LAMBERT, J.B.; SHURVELL, H.F.; LIGHNER, D.A.; COOKS, R.G. **Organic structural spectroscopy**. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 568p.

LAMEIRA, O.A. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.). Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia).

LUNARDI, I.; PEIXOTO, J.L.B.; VIDOTTI, G.J. Constituintes químicos das partes aéreas de espécie vegetal *Eugenia moraviana* Berg. Mirtaceae. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 21, 1998, Poço de Caldas. Anais..., Poço de Caldas: SBQ, 1998. v.2, 124- PN.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 1988. 128p.

PEREIRA, F.D. Propagação in vitro e identificação de metabolitos secundários em chapéu de couro (*Echirodons cf scaber* RATAJ) uma planta medicinal. Lavras: UFLA. 1999. 112p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal / Ministério da Agricultura, 1984. v.2, p. 363.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. Técnicas farmacêuticas e farmácia galena. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1981. 520p.

RIBEIRO, A.; PILÓ-VELOSO, D.; HOWARTH, O.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. Constituintes tripassomicidas da *Trixis vauthieri* DC (Asteraceae). In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 5., 1999, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: ICB/UFJF, 1999. p.8.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. *Science*, Massachusetts, v.184, n.4135, p.430-435, Apr. 1974.

SHAN, A.Y.K.V. Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L. Lavras: UFLA. 2002. 58p. (Dissertação – Mestrado em Agroquímica e Agrobiotecnologia).

SAITO, M.L.; OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A. Alantoína e outros constituintes químicos de *Cordia ecalyculata* Vell. *Revista de Farmácia e Bioquímica da USP*, São Paulo, v.1, n.21, p.14-19, jan./jun. 1985.

SAKUTA, M.; KOMAMINE, A. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plant*. California: Academic Press, 1987. v.4, p.97-111.

SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca Americana* L. *Journal Plant Physiology*, Stuttgart, v.125, p.337-343, 1986.

SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v.40, n.1, p.125-129, 1977.

SALAZAR, G.D.C.M.; SILVA, G.D.F.; SUZUKI, Y.; FIGUEIREDO, R.C.; FREITAS, J.S. Constituintes químicos de folhas de *Maytenus truncata*, In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 12, 1998, Ouro Preto. Anais..., Ouro Preto: UFOP, 1998. p.135.

SHRINER, R.L.; FUSON, R.C.; CUTIN, D.Y.; MORRIL, T.C. *Identificação sistemática dos compostos orgânicos*. 6.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Dois, 1983. 520p.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta: ao medicamento*. Florianópolis: UFSC, 1998. 21p.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.). *Plant cell culture - a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

VIANA, E.P.; ROSA, R.S.S.; SANTOS, L.S. Esteróides glicosilados de *Bauhinia guianensis*, In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 21, Poço de Caldas. Anais..., Ouro Preto: SBQ, 1998. v.2, 103 PN.

