

**PROPAGAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO*,  
CALOGÊNESE, NUTRIÇÃO MINERAL E  
QUANTIFICAÇÃO DE MUCILAGEM EM  
*Cissus sicyoides***

**ILKA NACIF DE ABREU**

**1998**

Faint, illegible text at the top left of the page.

**Job avartanssaA**

Faint, illegible text in the lower left quadrant.

Faint, illegible text at the bottom left.

43774

MPN 30668

**ILKA NACIF DE ABREU**

**PROPAGAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO*, CALOGÊNESE,  
NUTRIÇÃO MINERAL E QUANTIFICAÇÃO DE MUCILAGEM  
EM *Cissus sycyoides***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRA  
1998**



Ficha catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA.

**Abreu, Ilka Nacif de**

Propagação *in vivo e in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides* / Ilka Nacif de Abreu. – Lavras : UFLA, 1998.

113 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.  
Dissertação (mestrado) – UFLA.

**Bibliografia.**

1. *Cissus sicyoides*. 2. Calogênese. 3. Propagação. 4. Mucilagem. 5. Nutrição. 6. Cipó-puca. 7. Insulina vegetal. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 583.279  
- 633.883279

**ILKA NACIF DE ABREU**

**PROPAGAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO*, CALOGÊNESE,  
NUTRIÇÃO MINERAL E QUANTIFICAÇÃO DE MUCILAGEM  
EM *Cissus sycyoides***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Mestre”.

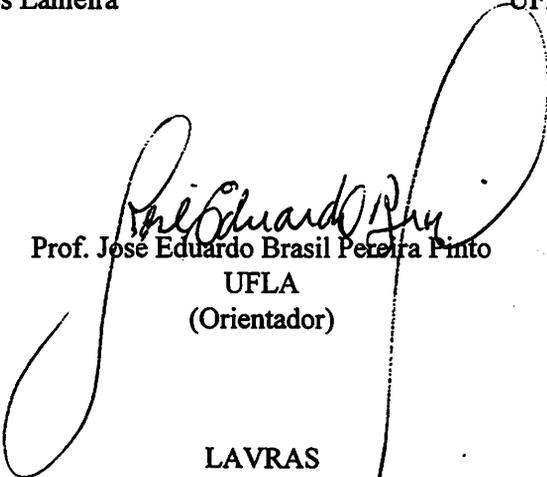
APROVADA EM: 02 DE MARÇO DE 1998

Prof. Antônio Eduardo Furtini Neto

UFLA

Pesq. Osmar Alves Lameira

UFLA



Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

A todos que de alguma forma se  
preocupam em estudar as plantas  
aromáticas e medicinais

## **OFEREÇO**

“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda em vão,  
Que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
Que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
Que em conformidade viver...”

(Martin Luther King)

Aos meus pais,  
Joaquim de Abreu Filho e  
Manira Nacif de Abreu

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES e Universidade Federal de Lavras-UFLA, pela oportunidade e incentivo financeiro e educacional que me foram dados.

À FINEP e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Ao Professor José Eduardo Brasil P. Pinto, pela grande amizade, orientação e agradável convívio de tantos anos.

Aos Professores Antônio Eduardo Furtini Neto e Ângela M. Ladeira, pela valiosa orientação na condução dos trabalhos.

Ao Instituto de Botânica do Estado de São Paulo por permitir a realização de parte dos trabalhos.

Ao Prof. Wagner Ramos Barbosa, pelas informações referentes à espécie.

À estudante de iniciação científica, Clara Geromel, sem a qual os trabalhos não teriam sido concluídos.

A Josirley de Fátima Corrêa da pré-banca, pelo apoio.

Aos amigos Jannayna, Isabela, Gabriela, Evaldo, Márcia, Flávia, Solange, Laura, Yoko, Paulino, Luciane, Flavinha, Lucivane e todos que estiveram presentes no decorrer do curso e me apoiaram de uma forma ou de outra.

Aos amigos Andrei, Inês, Flávio, Carlos e Gordo pelos bons momentos "light".

Ao Jorge Alberto pela grande paciência.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 OBJETIVOS GERAIS .....	2
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	2
1.2.1 Caracterização botânica da espécie.....	3
1.2.2 Aspecto fitoquímico de <i>C. sicyoides</i> .....	3
1.2.3 Cultura de tecidos x plantas medicinais.....	5
1.2.4 Crescimento celular e acúmulo de metabólitos secundários.....	6
1.2.5 Mucilagens .....	9
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>15</b>
<b>CALOGÊNESE EM <i>Cissus sicyoides</i>. .....</b>	<b>15</b>
RESUMO.....	15
2.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.3 OBJETIVO.....	19
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.4.1 Indução de calos em <i>C. sicyoides</i> .....	20
2.4.3 Manutenção de calos de <i>C. sicyoides</i> .....	21
2.4.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>C. sicyoides</i> .....	22
2.4.5 Diferenças na indução de calos e estrutura celular de fontes de explantes obtidos in vitro e in vivo. ....	22
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
2.5.1 Indução de calos em <i>C. sicyoides</i> .....	23
2.5.2 Determinação do melhor tipo de explante para a indução de calos em <i>C.</i> <i>sicyoides</i> .....	28
2.5.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de <i>C. sicyoides</i> .....	38
2.5.4 Diferenças na indução de calos e estrutura celular de fontes de explantes obtidos in vitro e in vivo.....	41
2.6 CONCLUSÕES.....	45
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>49</b>
<b>PROPAGAÇÃO IN VIVO E IN VITRO DE <i>Cissus sicyoides</i>.....</b>	<b>49</b>
RESUMO.....	49

3.2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	50
3.2.1	Enraizamento de estacas.....	50
3.2.2	Propagação <i>in vitro</i> .....	52
3.3	OBJETIVOS.....	54
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.4.1	Enraizamento <i>in vivo</i> de estacas de <i>C. sicyoides</i> . ....	55
3.4.2	Propagação <i>in vitro</i> de <i>C. sicyoides</i> .....	56
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.5.1	Enraizamento de estacas <i>in vivo</i> de <i>C. sicyoides</i> . ....	57
3.5.2	Propagação <i>in vitro</i> <i>C. sicyoides</i> . ....	63
3.6	CONCLUSÕES.....	72
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
	<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>76</b>
	<b>NITROGÊNIO E FÓSFORO NA PRODUÇÃO VEGETAL E NA</b>	
	<b>INDUÇÃO DE MUCILAGEM EM PLANTAS DE <i>C. sicyoides</i> .....</b>	<b>76</b>
	RESUMO.....	76
4.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	76
4.1.1	Nutrição x crescimento.....	77
4.1.2	Interação entre nitrogênio e fósforo.....	79
4.1.3	Mucilagem.....	80
4.2	OBJETIVO.....	82
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	82
4.3.1	Substrato.....	82
4.3.2	Tratamentos.....	83
4.3.3	Preparo das mudas.....	85
4.3.4	Plantio.....	86
4.3.5	Delineamento experimental:.....	86
4.3.6	Características Avaliadas.....	86
4.3.7	Análise estatística.....	87
4.3.8	Extração e quantificação de mucilagens:.....	87
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.4.1	Efeito do nitrogênio e fósforo na produção de biomassa de <i>C. sicyoides</i> .....	88
4.4.2	Teor de mucilagem na parte aérea de <i>C. sicyoides</i> . ....	94
4.5	CONCLUSÕES.....	98
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

## RESUMO

ABREU, Ilka Nacif. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, área de Fisiologia Vegetal).\*

A espécie *C. sicyoides* é encontrada na região amazônica e conhecida como cipó-pucá, anil trepador e insulina vegetal. Devido à sua grande utilização na medicina popular, tem sido muito utilizada nos programas de fitoterapia, nos tratamentos de estados epiléticos, derrames e diabetes. Não existem relatos de trabalhos na literatura sobre a propagação ou qualquer forma de interferir na síntese dos metabólitos secundários produzidos por esta espécie. No presente trabalho técnicas *in vivo* e *in vitro* de propagação, calogênese e estudos da interferência da adubação nitrogenada e fosfatada na produção de biomassa e mucilagem foram aplicados. Estacas com 10 cm de comprimento foram eficientes no enraizamento quando tratadas com 160 mg/l de IBA. Para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* o melhor desenvolvimento das plântulas ocorreu no meio de cultura suplementado com 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina. Folha é o melhor explante para a indução de calos nesta espécie, no escuro, na presença de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA. Para a manutenção dos calos a melhor concentração de ANA foi de 10,8  $\mu\text{M}$  a 3% de sacarose. A curva de crescimento dos calos apresentou cinco fases bem distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária e a melhor fonte de explante para a indução de calos, nesta espécie, foram plântulas estabelecidas *in vitro*, uma vez que as células do tecido das suas folhas são menos diferenciadas. A espécie *C. sicyoides* é responsiva a adubação nitrogenada e fosfatada, sendo portanto, justificada a sua recomendação visando maior produção de matéria seca e mucilagem.

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Antônio Eduardo Furtini Neto – UFLA e Osmar Alves Lamera – EMBRAPA.

## ABSTRACT

ABREU, Ilka Nacif. **Propagation *in vivo* and *in vitro*, calogenese, mineral nutrition and quantification of mucilage in *Cissus sicyoides*.** Lavras: UFLA, 1998. 113 P. (Dissertation – Masters degree in Agronomy, area of Physiology)\*

The species *Cissus sicyoides* is found in the Amazonian region and known as ‘cipó-pucá’, indigo climbing plant and vegetable insulin. Due to its large use in common medicine, it has been mostly utilized in the programs of phytotherapy, in the treatments of epileptic conditions, stroke and diabetes. There are no reports of works in the literature about the propagation or any other form of interference in the synthesis of secondary metabolites produced by this species. In this work, *in vivo* and *in vitro* techniques of propagation, calogenese and studies of the interference of nitrogen and phosphate fertilization in the production of bio-mass and mucilage were applied. The micro piles were efficient in the rooting when treated with 160mg/L of IBA. For the establishment and multiplication *in vitro*, the best development of the plantules occurred in the culture supplemented with 2.7 $\mu$ M of ANA and 4.64  $\mu$ M of kinetin. In the dark, the leaf was the best explant for the induction of callus in this species, in the presence of 21.6  $\mu$ M of ANA. For the maintenance of callus, the best concentration of ANA was from 10.8 $\mu$ M to 3% of saccharose. The growth curve of the callus presented five well distinct phases: lag, exponential linear deceleration and stationary, and the best source of explant for the induction of callus in this species, was the plantules established *in vitro*, once the cells of the leaf tissue were less differentiated. The species *C. sicyoides* was responsive to nitrogen and phosphate fertilization, its recommendation thus being justified looking into the larger production of dry matter and mucilage.

---

\* Guindance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Antônio Eduardo Furtini Neto – UFLA and Osmar Alves Lamera – EMBRAPA.

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de algum tipo de medicina tradicional para cuidados básicos da saúde. Além disso, em países altamente industrializados, 40-45% dos produtos farmacêuticos comerciais são obtidos a partir de plantas (Costa, 1995).

De maneira geral, o que se observa atualmente é uma tendência mundial de valorização dos produtos naturais de plantas, devido a alguns fatores como, alto custo do processo de síntese química; impossibilidade, em alguns casos, de síntese de alguns compostos, devido a complexidade química do composto natural; largo espectro de efeitos colaterais tóxicos dos compostos sintéticos; resistência de algumas doenças ao tratamento com produtos sintéticos e importância da pesquisa de medicamentos para tratamento de doenças ainda sem cura como muitos tipos de câncer e aids (Clemente Filha, 1996).

Nas diferentes regiões florísticas existentes no Brasil, encontra-se uma grande diversidade de espécies medicinais das quais, de acordo com estimativas otimistas, em torno de 1% já foi quimicamente estudado. Este percentual decresce ainda mais com relação a estudos agronômicos (Clemente Filha, 1995).

Tem sido observado, portanto, grandes dificuldades em assegurar um bom suprimento de plantas com propriedades terapêuticas, sendo que a exploração de recursos medicinais no Brasil está relacionada em grande parte à

coleta extensiva e extrativista de materiais silvestres, pois poucas espécies chegam ao nível de cultivo, mesmo em pequena escala (Vieira, 1992).

A espécie *Cissus sicyoides*, também conhecida como insulina vegetal, cipó-pucá e anil trepador, é uma trepadeira da América Tropical pertencente à família Vitaceae e encontrada na Região Amazônica. Esta espécie é usada popularmente no tratamento de diabetes, controle de estados epilépticos, sudorífico, hipotensor e no tratamento de doenças do coração (Albuquerque, 1989; Costa, 1990 e Silva, 1995;). Dos seus frutos podem ainda ser extraídos pigmentos utilizados como corantes alimentícios (Toledo, 1983).

Os tipos de metabólitos secundários encontrados nesta família são os flavonóides, antocianinas, alcalóides, mono, sesqui e triterpenos. No gênero são encontrados esteróides, saponinas, flavonóides, taninos e alcalóides. Devido ao grande interesse farmacológico e médico, aliado aos escassos trabalhos agrônômicos, tornam-se necessários estudos sobre a propagação dessa espécie e formas de possibilitar que essas substâncias sejam produzidas em maior quantidade, uma vez que pouco se sabe sobre os seus princípios ativos, bem como os fatores que contribuem para a produção dessas substâncias.

## 1.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos do trabalho podem ser relacionados da seguinte forma:

- a) definir a metodologia de propagação *in vitro* e *in vivo* de *Cissus sicyoides*;
- b) induzir calogênese e estabelecer a curva de crescimento celular;
- c) determinar o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo na produção de biomassa e síntese de mucilagem, *in vivo*.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 Caracterização botânica da espécie

A família Vitaceae possui 12 gêneros com aproximadamente 700 espécies que se distribuem nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. O gênero *Cissus* é o maior, com cerca de 300 espécies, mas possui poucos representantes no Brasil, sendo encontrado predominantemente nos cerrados do Mato Grosso, Goiás e na Região Amazônica (Barroso, 1984 e Silva, 1995).

As espécies de *Cissus* consideradas medicinais são: *C. quadrangulares*, *C. rheifolia*, *C. pteroclava* e, evidentemente, *C. sicyoides* (Costa, 1990). Albuquerque (1989) e Vieira (1992) descreveram a espécie *Cissus sicyoides* L. como um arbusto escandente, com gavinhas opostas às folhas e raízes pêndulas, possuindo folhas ovadas-cordiformes e flores pálidas em cimeiras corimbiformes, muito comumente encontrada na Amazônia.

Silva (1995) faz uma descrição macroscópica da espécie e relata a presença de folhas simples, de contorno ovado, ápice acuminado, base reentrante-auriculada, margem ondulada e provida de pequenos múcrons, limbo indiviso com nervuras palmatinérveas. O pecíolo apresenta-se côncavo-convexo de inserção lateral e pode atingir 15 cm de comprimento. O caule é biconvexo ou prismático quadrangular, apresentando estrias e canaleta longitudinais; as regiões de nó e entrenós são bem distintas.

### 1.2.2 Aspecto fitoquímico de *C. sicyoides*

Os princípios ativos produzidos pelas plantas medicinais são, com poucas exceções, compostos sintetizados a partir do metabolismo secundário. Essa via metabólica caracteriza-se por produzir metabólitos que participam ativamente nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, tais

como os hormônios e pigmentos clorofilados, e metabólitos secundários que não possuem uma função fisiológica conhecida no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas que exercem importantes funções ecológicas, pois representam estratégias alternativas para sobrevivência de plantas exercendo efeitos alelopáticos, repelindo ou atraindo polinizadores (Taiz e Zeiger, 1991).

Partindo-se da via do ácido mevalônico, da via do ácido malônico e da via do ácido chiquímico, que são as principais rotas metabólicas, pode-se dividir os metabólitos secundários em três grandes grupos: compostos terpênicos, compostos fenólicos e compostos contendo nitrogênio (Taiz e Zeiger, 1991). Segundo Swain (1977), algumas proteínas e polissacarídeos ácidos (mucilagens), que são sintetizados a partir do metabolismo primário, podem ser incluídos entre esses compostos, os quais podem ser utilizados farmacologicamente.

O teor dessas substâncias, acumuladas em diferentes partes dos vegetais, varia substancialmente, considerando-se as diferentes fases de desenvolvimento das plantas, e de acordo com os fatores ambientais a que estão submetidas (Clemente Filha, 1996).

Na análise fitoquímica dos extratos aquoso e metanólico de *C. sicyoides* foram encontrados: aminoácidos, proteínas, alcalóides, flavonóides, presença de sais de magnésio, manganês, silício, cálcio, fósforo e potássio (Moura, 1986 e Albuquerque 1989), esteróides, flavonóides, saponinas e compostos fenólicos (Silva, 1995). Barbosa (1996) relata a presença de alcalóides, mas estes foram de difícil extração e, até o momento, suas estruturas não foram elucidadas, e várias outras substâncias não alcaloídicas, entre elas a vitamina E ou  $\alpha$ -tocoferol, glicosídeos de cianidina e delfinidina.

Dos frutos, dessa espécie, foram isoladas quatro tipos de antocianinas, as quais apresentam baixa toxicidade e são utilizadas como corantes em alimentos (Toledo,1983).

Foram realizados ensaios de ação anticonvulsivante e foi observado que os extratos obtidos das folhas, caules e todo o vegetal, apresentaram ação significativa no teste de proteção à convulsão (Elisabetsky et al., 1988).

Moura (1986) e Costa (1990) relataram que esta planta vem sendo utilizada na medicina popular como anticonvulsivante e para doenças do coração, sendo os esteróides as substâncias responsáveis pela ação anticonvulsivante. Entretanto, Barbosa (1996) cita que, em um teste farmacológico, a substância vitamina E ou  $\alpha$  tocoferol isolada ou associada com cianinas, apresentou propriedades antiepiléticas em ratos.

Segundo Achenbach (1988) e Pathak (1991), o efeito antidiabético pode ser atribuído a compostos terpênicos, flavonóides, esteróides, alcalóides, taninos ou por polissacarídeos ácidos. Tendo em vista que a espécie *C. sicyoides* contém alguns destes compostos secundários, estes podem ser os responsáveis pela sua ação antidiabética.

### **1.2.3 Cultura de tecidos x plantas medicinais**

A micropropagação tem sido considerada uma ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (Costa,1995).

Em função da dificuldade de propagação de diversas espécies com potencial medicinal através dos métodos convencionais, devido provavelmente à baixa taxa de multiplicação e baixa germinação de sementes, entre outros, a técnica de cultura de tecidos tornou-se de grande interesse, uma vez que diversas espécies encontram-se em via de extinção. Segundo Costa (1995),

diversas espécies medicinais já possuem um protocolo de micropropagação estabelecido.

Dentro deste contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constituem uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material, independente de mudanças climáticas ou condições de solo. Além disso, constitui-se num sistema adequado para investigação das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção de metabólitos secundários *in vitro* (Tabata, 1971; Misawa et al., 1985; Crocomo e Meb, 1991 apud Kajiki, 1996).

Nos últimos anos, o uso da calogênese e cultura de tecidos tem apresentado grande potencial para o estudo e extração de metabólitos secundários em plantas medicinais em larga escala, sendo possível minimizar o seu custo de produção.

#### **1.2.4 Crescimento celular e acúmulo de metabólitos secundários**

O metabolismo secundário manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento das plantas superiores, sugerindo que a expressão deste metabolismo está intimamente correlacionado com o crescimento e a diferenciação morfológica das células. Nos últimos anos, a cultura de células tem sido usada como um sistema modelo para o estudo do mecanismo regulatório do metabolismo secundário em plantas superiores, pois é um sistema que permite respostas rápidas em condições facilmente controladas.

O crescimento pode ser dividido em duas fases: aumento do número de células e aumento do volume celular sendo que, na maioria das vezes, esses eventos ocorrem simultaneamente (Sakuta e 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 associado com a divisão celular (Sakuta, Takagi e Komamine, 1986). Na maioria das espécies, o acúmulo de metabólitos ocorre na fase estacionária, como observado por Lameira (1997) em *Cordia verbenacea*.

Em determinadas culturas, o acúmulo de metabólitos ocorre paralelamente ao crescimento, sendo, portanto, a manutenção das células em estágios de proliferação um caminho para alcançar alta produção.

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 e Komamine, 1987).

#### 1.2.4.1 Meio de cultura

Fatores que estimulam o metabolismo primário, ou o crescimento, podem estimular a biossíntese de alguns metabólitos secundários portanto, fatores nutricionais são de grande importância na regulação do metabolismo secundário (Robinson, 1974).

Tal e Goldberg (1982) demonstraram que a relação carbono-nitrogênio no meio de cultura foi um importante fator que influenciou na produção do alcalóide *Diosgenin* em *Dioscorea deltoidea*. Além disso, nesta mesma espécie,

para a formação deste composto, foram requeridas ambas as formas de nitrogênio no meio de cultura: amônia e nitrato.

Em cultura de tecidos, a sacarose é utilizada como fonte de carbono no crescimento de calos e células em suspensão. Dougall (1980) demonstrou que a concentração de sacarose no meio de cultura não só promoveu o crescimento, mas também a produção de metabólitos secundários. O acúmulo de alcalóides indol (serpentine e ajmalicine), aumentou em função do aumento da concentração de sacarose em cultura de suspensão de células de *C. roseus* (Zenk, 1977). Entretanto, em outras situações, o aumento nos níveis de sacarose inibiu a formação de ubiquinona em cultura de suspensão de células de *Nicotinum tabacum* (Ikeda, 1977).

A concentração de fosfato no meio de cultura também pode ser um importante fator no crescimento de células em suspensão e na produção de metabólitos secundários, uma vez que o fósforo constitui os nucleotídeos que são importantes para o fornecimento de energia metabólica na forma de ATP.

#### 1.2.4.2 Reguladores de crescimento

Diferentes tipos de reguladores de crescimento como, por exemplo , auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico, são conhecidos por seus diferentes efeitos no crescimento e no metabolismo secundário (Sakuta e Komamine, 1987).

Furuya (1971) e Tabata (1971) descrevem o efeito da auxina sintética 2,4D na inibição da síntese de nicotina em cultura de *Nicotiana tabacum*; Zenk (1975) relatou a inibição da síntese de antraquinonas em *Morinda citrifolia*; e Phillips e Henshaw (1977) na inibição de compostos fenólicos em cultura de *Acer pseudoplatanus*. Em contraste, esta mesma auxina estimulou a síntese de carotenóides em cultura de *Daucus carota* (Mok, 1976), berberine em cultura de

suspensão de *Thalictrum minus* (Nakagawa, 1986). De modo geral, as auxinas ANA e AIA não afetam a síntese de metabólitos secundários, enquanto que o 2,4D a inibe, mas trata-se de importante elemento na indução e manutenção do crescimento de culturas de células em suspensão (Schneider e Wightman, 1974).

As citocininas têm diferentes efeitos dependendo do tipo de metabólito e da espécie considerada. Por exemplo a cinetina estimula o acúmulo de L-dopa em cultura de calos de *Stizolobium hassjoo*, a produção de berberine em cultura de suspensão de *Thalictrum minus* e acúmulo de antocianinas em cultura de suspensão de *Happlopappus gracilis* (Sakuta e Komamine, 1987). O uso de giberelina inibiu a produção de shikonina em cultura de calos de *Lithospermum*, mas não afetou o crescimento (Yoshikawa, Fukui e Tabata, 1986). Os efeitos dos reguladores de crescimento na produção de metabólitos secundários são complexos e mais precisamente contraditórios (Sakuta e Komamine, 1987).

### 1.2.5 Mucilagens

Mucilagens são polissacarídeos complexos constituídos por unidades de açúcar e ácido urônico, insolúveis em álcool, mas que, em presença de água, dissolvem ou expandem, tornando-se viscosos (Costa e Evans, 1978, apud Silva, 1995).

Essas substâncias são produtos do metabolismo primário e geralmente se formam a partir da membrana celular ou se depositam sobre esta formando camadas sucessivas.

Nas plantas, as mucilagens podem ser divididas nos seguintes grupos (Costa, 1978):

- mucilagens de alto peso molecular, constituídas por holósidos;
- mucilagens formadas pela condensação de ácidos urônicos;

- mucilagens caracterizadas pela existência de ésteres sulfúricos de poli-holosídeos (próprias das algas).

Dentre as funções desempenhadas pelas mucilagens nas plantas, destacam-se: reserva, retenção de água em bulbos, raízes, folhas e sementes (durante a germinação) e proteção contra microorganismos. Além das funções citadas, as mucilagens apresentam propriedades antiinflamatórias, laxativas, antidiarréicas, antidiabéticas, entre outras. Na indústria é utilizada na confecção de geléias e doces diversos e na indústria farmacêutica, para correção do gosto de outros fármacos, estabilidade de emulsão e pomadas..

Alguns autores citam que a adubação afeta indiretamente o acúmulo de mucilagens, as quais são produtos do metabolismo primário das plantas, pelo fato de afetar o incremento de biomassa (Silva, 1995).

A interação entre nitrogênio e fósforo é bem conhecida na síntese e ativação de diversos compostos essenciais para a manutenção do metabolismo das plantas. Sendo, portanto, a parede celular um sistema altamente complexo e dinâmico, cuja composição e estrutura variam durante o crescimento e a diferenciação da célula e em resposta a fatores do ambiente, é de se esperar uma correlação positiva entre os nutrientes nitrogênio e fósforo na produção de polissacarídeos ácidos da parede.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H. et al. Flavonoids Phytochemistry and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*. v. 27, n. 6, p. 1835 - 1841, 1988.

ALBUQUERQUE, J. M. D. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS,. (Programa de agricultura naos Trópicos, 6), 96p.,1989.

- BARBOSA, W. L. R.; RUCKER, G. J. **Ethnopharmacology**, no prelo, (1996).
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária. 3v., 1984.
- CLEMENTE FILHA, A.C. **Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de Bauhinia forficata Link e Plantago major L**. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 1996 (Dissertação).
- COSTA, A.F. **Substâncias Poliurônicas**. In: **Farmacognosia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v.2, p. 84-125.
- COSTA, C. M. M. **Cipó-pucá (Cissus sycioides)**. Rio de Janeiro, Apostila do curso de Especialização em Medicamentos da UFRJ, 1990. COSTA, M.P.
- COSTA, 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**. Universidade Federal de Lavras, 1995 (Dissertação).
- DOUGALL, D.K. Nutrition and metabolism . In: **Plant tissue culture as a source of biochemicals**. Ed.E.J. Staba, p. 21-58. CRC Press, Boca Raton, Flórida, 1980.
- ELIZABETSKY, E.; et al. Ação anticonvulsivante de *Cissus sycioides*, cipó-pucá. **Ciência Cult.**, São Paulo v. 40, n. 7 supl., p. 985 (resumo), 1988.
- FURUYA, T.; et al. **Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in Tabacco callus tissue**. *Phytochemistry*, v. 10, p. 1529-1532, 1971.
- IKEDA, T.; MATSUMOTO, T. E NOGUCHI, M. Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of ubiquinone by Tabacco plant cells in suspension culture. **Agric. Biol. Chem.** v.40, p. 1765-1770, 1977.
- KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen**.Dissertação. ESALQ. Piracicaba. 1996. 96p.

- 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.)** Tese. UFLA.Lavras-MG, 1997, 87p.
- MOK, M. C.; et al. Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. **Journal American Society Horticulture Science**, v. 101, p. 442-449, 1976.
- MOURA, B. A. S.; et al **Estudo químico e farmacológico de espécie vegetal *Cissus sycioides* Linn.** (Apostila do curso de especialização em química de produtos naturais da Universidade do Pará), Belém, 1986.
- NAKAGAWA, K.; et al. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus*. **Plant cell reports**, v. 5, p. 69-71, 1986.
- PATHAK, D.; et al. **Flavonoid as medicinal agents - Recent advances.** **Fitoterapia**. v 62, n. 5, pp. 371-389, 1991.
- PHILLIPS, R.; HENSHAW, G.G. The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 28, n. 105, p. 785-794, aug. 1977.
- ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science, Massachusetts**, v. 184, n. 4135, p. 430-435, Apr. 1974.
- SAKUTA, M. e KOMAMINE, A. Cell Growth and accumulation of secondary metabolites. in: **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, vol.4. pp.97-111, 1987.
- 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.
- SCHNEIDER, E.A. e WIGHTMAN, F. Metabolism of auxin in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**,v. 25, p. 487-513, 1974.
- SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A. FOWLER, MW. 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.
- SILVA, G. A. **Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluido de *Cissus sycioides* L.** Universidade Estadual de São Paulo (USP), 1995, Dissertação.
- SILVA, M.C.P. **Biomassa e mucilagem da Tanchagem (*Plantago major* L.) em função das adubações orgânica, mineral e mista e da supressão das inflorescências.** Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 1995 (dissertação).
- SWAIN, T. Secondary compounds a protective agents. in: **Annual Review of Plant Physiology**. v.2, p.479-501, 1977.
- TABATA, M.; et. Regulation of nicotine production in tobacco tissue culture by plant growth regulators. **Phytochemistry**, v. 10, p. 723 - 729, 1971.
- TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Plant Physiology**. The Benjamin/ Cummings publishing Company INC. 559p., 1991.
- TAL, B. E GOLDBERG, I. Growth and diosgenin production by *Dioscore deltoidea* cells in batch and continuous cultures. **Planta Med.** V.44, p.107-110, 1982.
- TOLEDO, M. C. F.; et al. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sycioides*). **J. Food Sci., Chicago**, v. 48, p. 1368 - 1369, 1983.
- VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de plantas medicinais**, 2. ed.São Paulo: Agronômica Ceres, p. 104 - 105, 1992.
- VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de plantas medicinais**, 2. ed.São Paulo: Agronômica Ceres, p. 104 - 105, 1992.
- YOSHIKAWA, N.; FUKUI, H.; TABATA, M. Effect of gibberellin A<sub>3</sub> on shikonin production in *Lithospermum* callus cultures. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n.3, p.621-622, mar. 1986.

ZENK, M.; EL-SHAGI, H.; e SCHULTE, V. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. **Planta Med. suppl.**, p.79-101. 1975.

ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; DEUS, B. Formation of indole alkaloids serpentine and ajimalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: **Plant tissue culture and its biotechnological application**. P. 27-43. Springer – Verlag, Berlin and New York, 1977.

## CAPÍTULO II

### CALOGÊNESE EM *Cissus sicyoides*.

#### RESUMO

O objetivo do trabalho foi a indução e manutenção de calos de *Cissus sicyoides*; definir o melhor tipo e a melhor fonte de explante e determinar a curva de crescimento celular. Plantas matrizes mantidas em casa de vegetação foram utilizadas como fonte de explante. A metodologia de assepsia do material vegetal utilizou: água corrente por 30 min. e desinfestação em hipoclorito de sódio comercial a 30% por 15 min. E, posteriormente, em câmara de fluxo os explantes foram lavados 6 vezes em água destilada e autoclavada e, após, excisados e inoculados em meio de cultura sólido (0,65%) de Murashige & Skoog (MS) suplementado com 0,44; 2,2; 4,4 e 9,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,54; 2,7; 5,4; 10,8 e 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA e mantidas na presença ou não de luz. Calos foram induzidos a partir de folhas, gemas e internódios jovens suplementados com a interação: 0,0; 0,22; 0,45 e 0,9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 0,0; 10,8 e 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA, no escuro. Esses calos foram repicados e colocados em meio de manutenção com a seguinte interação: 0,0; 10,8 e 21,6  $\mu\text{M}$  ANA com 2 ou 3% de sacarose, no escuro. Após a indução dos calos em meio contendo 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA, a curva de crescimento celular foi construída a partir do peso seco dos calos. Cortes histológicos foram realizados com a finalidade de comparar a estrutura anatômica dos tecidos de explantes oriundos de plântulas estabelecidas *in vitro* e plantas mantidas em casa de vegetação. As avaliações de todos os experimentos ocorreu aos 30 dias, onde avaliou-se: peso seco, coloração e friabilidade dos calos. O explante folha foi mais eficiente para a indução dos calos na presença de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA. Para a manutenção, foi necessário 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA a 3% de sacarose. Os calos crescidos na ausência de luz apresentaram maior friabilidade. A curva de crescimento celular apresentou cinco fases bem distintas: lag, log, linear, desaceleração e estacionária, sendo que a partir do vigésimo sétimo dia as células entraram na fase estacionária. A melhor fonte de explante para a indução de calos nesta espécie, foram plântulas estabelecidas *in vitro*, uma vez que as células de suas folhas apresentaram-se menos diferenciadas.

## 2.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os calos são tecidos não diferenciados, constituídos por massa de células irregularmente diferenciadas que se multiplicam desordenadamente (Torres e Caldas, 1990), em resposta a injúrias químicas ou físicas. Porém, estes podem diferenciar-se em tecidos e órgãos.

Um dos fatores mais importantes para se obter a calogênese é a escolha do explante (Bonga, 1977), uma vez que o potencial morfo genético dos calos geralmente varia com a origem do explante (Barker, 1969; Mehra e Mehra, 1974).

Teoricamente, para a indução de calos, qualquer tecido pode ser utilizado como explante em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que contenham maior capacidade de expressar totipotência (Grattapaglia e Machado, 1990). Segundo estes autores, explantes oriundos de tecidos jovens e com maior atividade metabólica são mais adequados para estimular a formação de calos.

De acordo com Esau (1965), o parênquima é um tecido com considerável plasticidade de desenvolvimento, resultando num baixo nível de diferenciação.

Com o estímulo das substâncias endógenas de crescimento ou de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, o metabolismo celular é modificado de quiescente para um metabolismo ativo (Fortes, 1992).

Quando há apenas células diferenciadas no explante isolado, a de-diferenciação pode ocorrer antes da divisão celular. Células parenquimáticas usualmente realizam esta de-diferenciação, que tem a importante função de capacitar células maduras do explante isolado de uma planta adulta para ser

redeterminado. Neste processo, células adultas são temporariamente habilitadas para reverter de um estado adulto para o juvenil. Este rejuvenescimento tem importantes consequências, como células são induzidas a se dividirem intensamente; células rejuvenescidas têm um maior potencial para o crescimento e divisão celular do que as adultas e, quando o interesse for a regeneração de órgãos e ou embriões, estas células são mais habilitadas (Pierik, 1989). Após a de-diferenciação, as células podem se dividir intensamente pela influência de fatores como reguladores de crescimento, presentes no meio de cultura.

Durante o estabelecimento do 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 desta fase irá depender do estado fisiológico das células. Durante a divisão celular, ocorre a de-diferenciação das células para características parenquimáticas, resultando na formação de crescimento padrão (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

Quando cultivados por várias semanas, alguns calos apresentam sinais de desaceleração do crescimento, necrose, coloração marrom e, finalmente, dessecação. Este fato pode ocorrer em função de alguns fatores, como a exaustão de nutrientes, inibição da difusão de nutrientes, evaporação acompanhada pelo aumento na concentração de alguns constituintes do meio e acúmulo de metabólitos, os quais podem ser tóxicos (Constabel e Vasil, 1989).

Além do tipo de explante, muitos outros fatores, como os reguladores de crescimento, são importantes para a formação do calos: genótipo, composição do meio de cultura, fatores físicos de crescimento (luz, temperatura, localização do corte, etc).

A adição de reguladores de crescimento tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Simultaneamente, a adição destas substâncias estimula certas respostas como: crescimento, alongamento celular ou multiplicação, as quais dependem do estado fisiológico dos explantes, o que está relacionado com a época do ano e estado geral da planta-matriz (Paiva Neto, 1996).

As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultura para a indução de calos e geralmente causam: alongação celular e expansão dos tecidos, divisão celular (formação de calos), formação de raízes adventícias e inibição de brotações adventícias e axilares (Pierik, 1989).

O ciclo celular é regulado por etapas conhecidas. Howard e Pelc (1953), citados por Scott (1984), o descreveram como tendo quatro fases, designadas de G1, S, G2 e M. A fase S refere-se ao período de síntese de DNA que é anterior e necessário para que ocorra a mitose (M). Após a mitose, há um período (G1) antes do início de S, que poderia ser visto como um período de preparação para a síntese de DNA que ocorre durante S. Após, há um período (G2) antes de iniciar M, durante o qual o DNA é preparado para organizar-se dentro dos cromossomos, antes da mitose.

As auxinas são essenciais na divisão celular em plantas superiores, mas as evidências para o controle direto no ciclo celular são menores do que aquelas encontradas para as citocininas. Em cultura de células de cenoura, a ausência de auxina induz, temporariamente, a um mínimo de divisão celular sincronizada. Estas células, na ausência de auxinas apresentam-se na fase G1, sugerindo que as auxinas são necessárias para iniciar a fase S do ciclo celular (Nishi, 1977).

Em alguns casos, mudanças nos níveis de auxinas demonstram uma correlação positiva com mudanças na atividade mitótica. Em cultura celular de tabaco, há um aumento na atividade da enzima AIA-sintase, precedendo um aumento nos níveis de auxina. Este evento ocorre justamente antes do aumento da divisão celular, sugerindo que a síntese de AIA livre poderia iniciar a mitose (Scott, 1984).

Gamburg e Osharova (1973) citados por Scott (1984), descrevem que ANA causou um elevado aumento em ambas as atividades, mitótica e síntese de DNA, em células de Tabaco, demonstrando que as auxinas poderiam ser necessárias para iniciar de forma progressiva o ciclo celular de G1 para S e também de G2 para M.

Com o uso de baixas concentrações de auxinas, predomina a formação de raízes adventícias, mas com altas concentrações ocorre a formação de calos. O uso de 2,4-D torna-se limitado devido a possibilidade de induzir mutações, ao mesmo tempo que pode inibir a fotossíntese, o que não ocorre com as auxinas ANA, AIB e AIA (Pierik, 1989).

### **2.3 OBJETIVO**

Objetivou-se determinar o melhor tipo de explante e regulador de crescimento para a indução e manutenção de calos e a determinação da curva de crescimento celular e comparação das estruturas anatômicas dos explantes obtidos *in vitro* e *in vivo* de *Cissus sicyoides*.

### **2.4 MATERIAL E MÉTODOS**

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da UFLA-Lavras/MG.

#### **2.4.1 Indução de calos em *C. sicyoides***

Folhas jovens foram retiradas de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação. O processo de desinfestação do material vegetal foi conduzido da seguinte maneira: lavagem dos explantes em água corrente por 30 minutos e imersão em hipoclorito de sódio comercial a 30% (pH 6,0) por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as folhas jovens foram lavadas em água destilada e autoclavada por seis vezes e, em seguida, os explantes foram excisados com 1 cm<sup>2</sup> e inoculados em meio de cultura básico sólido (0,65% de ágar) de Murashige & Skoog, 1962 (MS), suplementado com 0,0; 0,44; 2,2; 4,4 e 9,0 µM de 2,4-D e 0,0; 0,54; 2,7; 5,4; 10,8 e 21,6 µM de ANA.

O pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem. Os frascos contendo os explantes foram mantidos no escuro e na presença de luz, sendo que o fotoperíodo, para os tratamentos com luz, foi de 16 horas de luz sob 12,5 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância.

Os explantes foram acondicionados em frascos com capacidade para 250 ml, os quais continham 30 ml de meio de cultura.

O delineamento estatístico foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com sete repetições, sendo cada parcela composta por três frascos com três explantes cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1% para o teste F.

Aos 30 dias, avaliou-se o peso seco dos calos formados, coloração, friabilidade e porcentagem de calos formado.

#### **2.4.2 Determinação do melhor tipo de explante, para a indução de calos em *C. sicyoides***

Os explantes utilizados folhas jovens, gemas apicais e internódios jovens de *Cissus sicyoides*, passaram pela mesma metodologia de assepsia

citada anteriormente (item 2.4.1) e foram inoculados com 1 cm<sup>2</sup>, em meio de cultura sólido (0,65% de ágar) MS e 3% de sacarose, suplementado com a interação: 0,0; 0,22; 0,45 e 0,9 µM de 2,4-D e 0,0; 10,8 e 21,6 µM de ANA. Após a inoculação os frascos contendo os explantes foram mantidos no escuro.

Os explantes foram acondicionados em frascos com capacidade para 250 ml, os quais continham 30 ml de meio de cultura e foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura de 25°C.

O delineamento estatístico foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com quatro repetições, sendo cada parcela composta por dez frascos com três explantes cada e o fatorial foi 4 x 3 x 3. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1% para o teste F.

Aos 30 dias, foram avaliados peso seco, coloração, friabilidade e número de raízes.

### **2.4.3 Manutenção de calos de *C. sicyoides***

Calos com 30 dias foram repicados e inoculados, com 1 cm<sup>2</sup>, em meio de cultura sólido (0,65% ágar) MS suplementado com a interação 0,0; 10,8 e 21,6 µM ANA com 2 ou 3% de sacarose.

Os explantes foram acondicionados em frascos com capacidade para 250 ml, os quais continham 30 ml de meio de cultura e mantidos em sala de crescimento no escuro, a uma temperatura de 25°C.

O delineamento estatístico foi o Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial de 3 x 2, com sete repetições, sendo cada parcela composta por vinte frascos com três explantes cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1% para o teste F.

Aos 30 dias, foram avaliados: peso fresco e seco, friabilidade e presença de necrose celular.

#### **2.4.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *C. sicyoides***

Folhas de plântulas de *C. sicyoides* estabelecidas *in vitro*, em meio MS suplementado com 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA e 5.4  $\mu\text{M}$  de cinetina (melhor meio de cultura para multiplicação – capítulo III), foram utilizadas como explante. As folhas foram excisadas ( $1\text{cm}^2$ ) e inoculadas em meio de cultura sólido (0,65 %) MS e 3% de sacarose, suplementado com 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA.

Os explantes foram acondicionados em frascos com capacidade para 250 ml, os quais continham 30 ml de meio e posteriormente colocados em sala de crescimento no escuro a 25°C.

Para a determinação da curva de crescimento, os calos foram pesados em intervalos de 3 dias durante 30 dias. Primeiramente, foi realizada a determinação do peso fresco, em seguida os calos foram colocados em estufa a 45°C, durante 36 horas e, logo após, estimado o peso seco. Cada pesagem foi proveniente de quatro frascos retirados ao acaso.

#### **2.4.5 Diferenças na indução de calos e estrutura celular de fontes de explantes obtidas *in vitro* e *in vivo*.**

Os calos foram induzidos a partir de folhas jovens retiradas de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação e de folhas obtidas a partir de plântulas estabelecidas *in vitro*. As folhas obtidas *in vivo* foram desinfestadas e inoculadas *in vitro*, de acordo com procedimento descrito no experimento de indução de calos (item 2.4.1).

Os explantes foram, então, excisados exatamente no meio da nervura central, de forma que cada fragmento tinha, aproximadamente,  $1\text{cm}^2$ . Posteriormente, estes foram inoculados em meio de cultura sólido (0,65%) MS e 3% de sacarose, suplementado com 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA. Os explantes, em número de três, foram acondicionados em frascos de 250 ml contendo 30 ml de

meio, e mantidos no escuro por 30 dias a 25°C. Posteriormente, foi determinado o peso seco dos calos formados.

Folhas de plantas provenientes de casa de vegetação e folhas de plântulas estabelecidas *in vitro* foram coletadas para a realização de cortes histológicos e verificação de possíveis diferenças anatômicas entre estas, segundo metodologia descrita por (Johansen, 1940), onde o material botânico foi fixado em F.A.A. (fenol, ácido acético glacial e álcool etílico) 70%, por 72 horas, e posteriormente conservado em álcool 70° GL. Para o preparo de lâminas permanentes, foram utilizadas as técnicas usuais de inclusão em parafina, após desidratação em série alcoólica (Johansen, 1940; Sass, 1951).

## **2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.5.1 Indução de calos em *C. sicyoides***

Quando uma parte da planta é danificada, uma resposta ao ferimento é induzida para reparar a porção danificada. Esta resposta consiste inicialmente na indução da divisão das células adjacentes à lesão, as quais repararão o ferimento. Isto é seguido pelo depósito de lignina, suberina, cera etc. para dar proteção à planta. Se, entretanto, este fragmento for inoculado em meio de cultura definido, a resposta ao início da divisão celular pode ser estimulada e induzida a continuar indefinidamente através da influência exógena de reguladores de crescimento. Portanto, a cultura de calos refere-se à iniciação e a proliferação contínua de células parenquimatosas não diferenciadas proveniente de tecido de planta em um meio de cultura pré-definido.

Assim, fragmentos (explantes) de folhas jovens de *C. sicyoides* foram inoculados em meio de cultura, a fim de determinar uma indução na divisão

celular das células. Na Tabela 2.1, são apresentados os valores referentes à porcentagem de calos formado e coloração na presença ou não de luz.

Nos tratamentos com 2,4-D, com exceção do controle, houve formação de calos em todas as concentrações, na presença ou não de luz. Os calos apresentaram-se pouco friáveis (Figura 2.3) e com um início de necrose ou completamente necrosados, com exceção da menor concentração.

A indução de calos nos explantes mantidos em meio de cultura com ANA ocorreu nas maiores concentrações. Os calos mantidos no escuro apresentaram uma consistência friável (Figura 2.4), e com uma coloração amarela, ao contrário dos tratamentos mantidos na luz que apresentaram um início de necrose celular.

Calos friáveis são mais adequados para o crescimento, pois podem ser utilizados em suspensões celulares, ao contrário dos calos compactos (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

O teste F realizado para peso seco em todos os tratamentos foi significativo ao nível de 1%, com um coeficiente de variação igual a 23,84%.

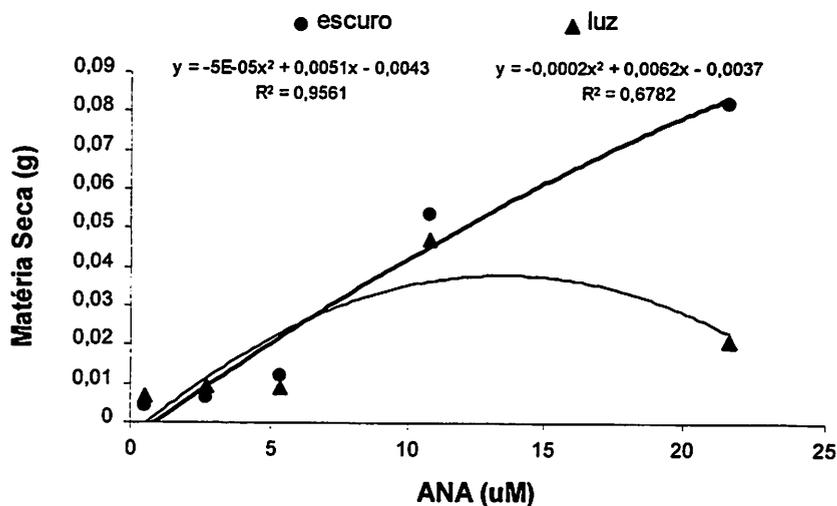
Na presença de ANA, o maior ganho de matéria seca foi obtido com a concentração de 21,6  $\mu\text{M}$  (0,08 g) na ausência de luz, enquanto que na presença de luz a concentração mais eficiente foi de 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA (0,04 g) (Figura 2.1).

Os calos induzidos nos tratamentos com 2,4-D, tiveram um maior ganho de peso na concentração de 0,4  $\mu\text{M}$  (0,04 g), a partir da qual, ocorreu um menor ganho de matéria seca, à medida que aumentava a concentração do regulador de crescimento (Figura 2.2). As concentrações mais elevadas de 2,4-D parecem ter causado algum tipo de toxidez para as células originadas nos explantes, os quais mostraram sinais de necrose (Tabela 2.1).

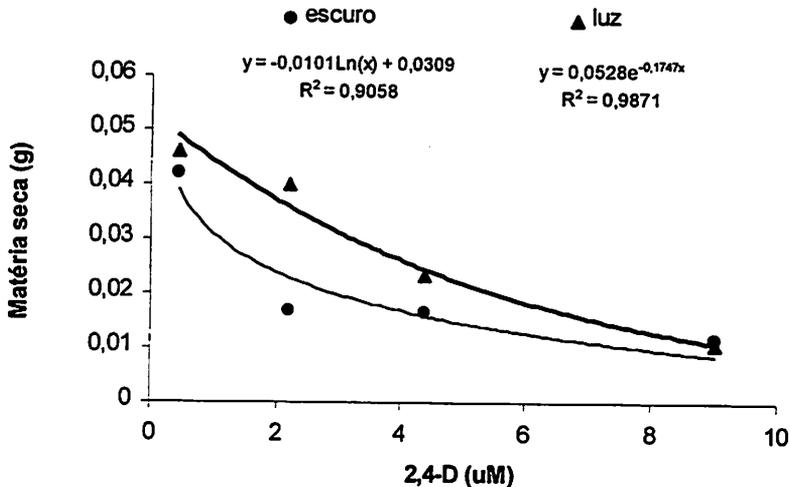
**TABELA 2.1** Porcentagem (%) e coloração de calos formados e mantidos no escuro e na presença de luz, de *C. sicyoides* .

Tratamento ( $\mu\text{M}$ )	% calos		Coloração	
	Escuro	Luz	Escuro	Luz
controle	0	0	-	-
0,4 2,4-D	100	100	AM	AM
2,2 2,4-D	100	100	AM/IN	AM/IN
4,4 2,4-D	100	100	AM/IN	MAR
9,0 2,4-D	100	100	MAR	MAR
0,54 ANA	0	0	-	-
2,7 ANA	0	0	-	-
5,4 ANA	33	0	AM	-
10,8 ANA	100	100	AM	MAR
21,6 ANA	100	0	AM	-

AM= amarelo ; MAR= marrom ; IN= início de necrose



**FIGURA 2.1** Matéria seca (g) de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, mantidos em meio de cultura com diferentes concentrações de ANA.



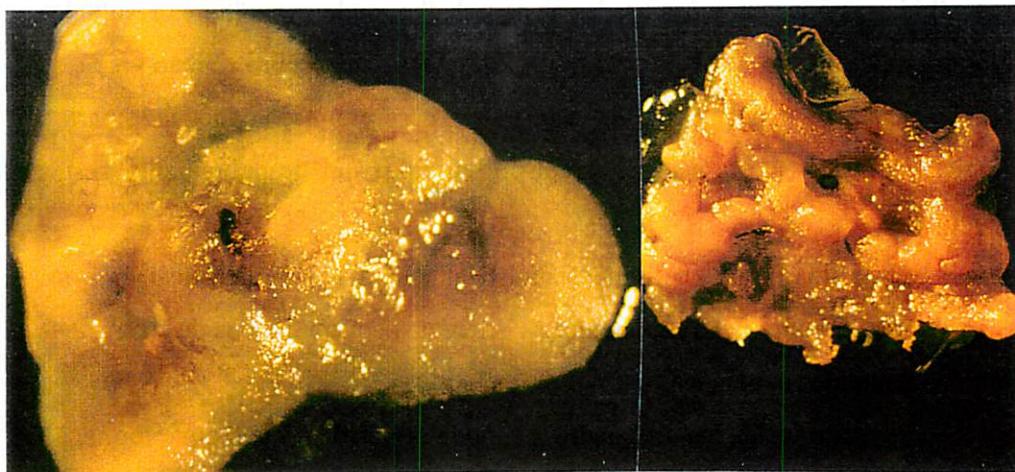
**FIGURA 2.2.** Matéria seca (g) de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, mantidos em meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D.

Os calos formados a partir do meio com 2,4-D, na presença ou não de luz, tiveram um menor ganho de matéria seca (0,046 g) quando comparados com os tratamentos contendo ANA (0,080 g) no escuro.

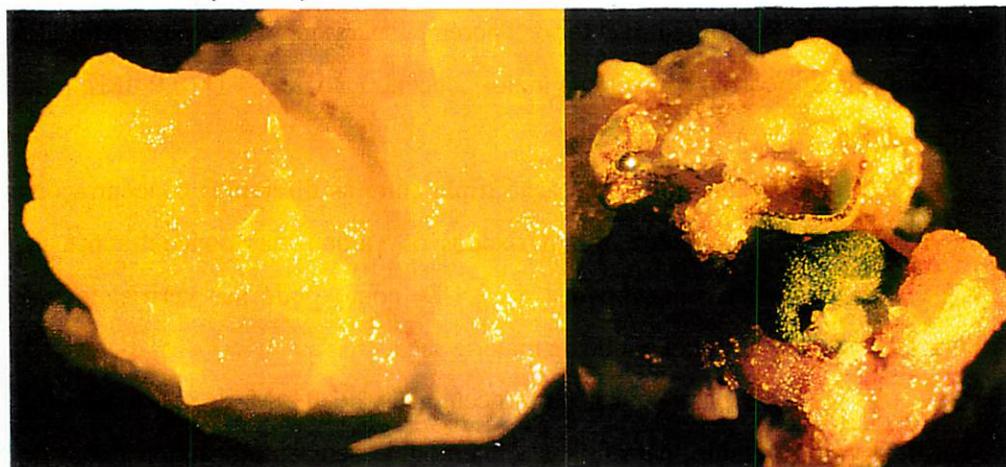
A cultura de calos é uma forma de estudar a regulação da síntese de uma série de metabólitos secundários. Em calos de *Anisodus acutangulus*, o efeito de diferentes auxinas no crescimento e a síntese dos alcalóides scopolamina e hyoscyamina foram diferentes. Baixas concentrações de 2,4-D estimularam a síntese mas retardaram o crescimento; entretanto, altas concentrações estimularam o crescimento mas retardaram a síntese. ANA estimulou o crescimento, bem como a síntese (Zheng and Liang, 1977, citado por Guang-Zhi, 1989).

Nas espécies *Bupleurum falcatum* e *Jasminum spp.*, o uso de ANA e de 2,4-D foi necessário para a indução de calos, nas concentrações de  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  e

$10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M, respectivamente, os quais não interferiram na síntese dos compostos saikosaponins e jasmine (Hiraoka, 1989 e Jonard, 1991).



**FIGURA 2.3** Calos de *Cissus sicyoides*, mantidos em meio de cultura contendo 2,4-D, aos 30 dias, no escuro (esquerda) e sob luz (direita).



**FIGURA 2.4** Calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, mantidos em meio de cultura contendo ANA, no escuro (esquerda) e sob luz (direita).

### **2.5.2 Determinação do melhor tipo de explante para a indução de calos em *C. sicyoides***

A partir dos resultados do experimento anterior (item 2.5.1), foram escolhidas as concentrações usadas neste trabalho, onde os melhores resultados foram: 0,4  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA, no escuro. Então, para se determinar uma concentração de reguladores de crescimento adequada para a indução de calos nesta espécie, optou-se por fazer um desdobramento destas concentrações.

Os dados foram analisados estatisticamente a 1% de significância e foi constatada uma interação tripla entre as diferentes concentrações de ANA, 2,4-D e os diferentes explantes.

A partir dos dados do Quadro 2.1, pode-se verificar que houve formação de calos em todos os tratamentos. A medida que a concentração de 2,4-D aumentou, ocorreu um início de necrose celular nos calos formados a partir do explante folha, independente da concentração de ANA. Este resultado foi semelhante ao experimento anterior, porém, para gemas e internódios, a necrose celular ocorreu somente na maior concentração de 2,4-D (0,9  $\mu\text{M}$ ), para todas as concentrações de ANA.

No desdobramento da interação tripla entre as diferentes concentrações de ANA, 2,4-D e explantes, foram fixados os valores das concentrações de ANA e variaram as concentrações de 2,4-D, como pode ser verificado nas Figuras 2.5, 2.6 e 2.7, para ganho de matéria seca.

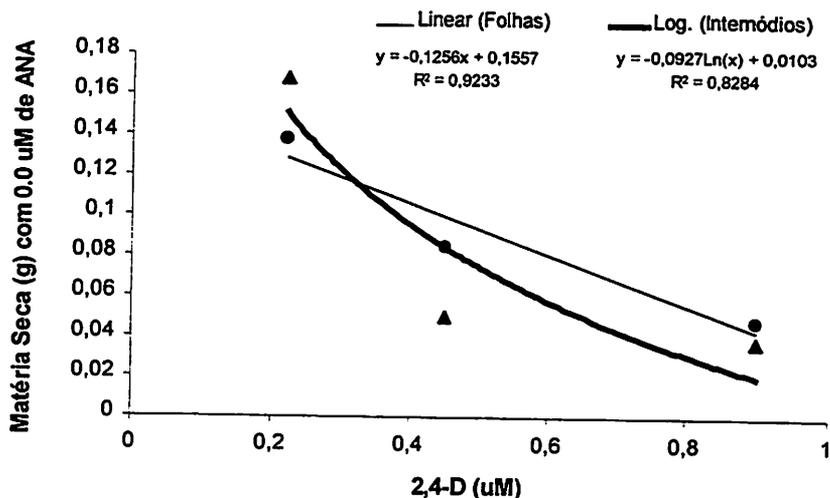
A interação para gemas na concentração de 0  $\mu\text{M}$  de ANA não foi significativa. Entretanto, para folhas e internódios ocorreu um maior ganho de matéria seca, 0,14 e 0,17 g, respectivamente, na concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  de 2,4-D (Figura 2.5).

**QUADRO 2.1** Matéria seca (g), coloração e número de raízes de calos de *Cissus sicyoides*, obtidos a partir de diferentes tipos de explantes e concentrações de 2,4-D e ANA.

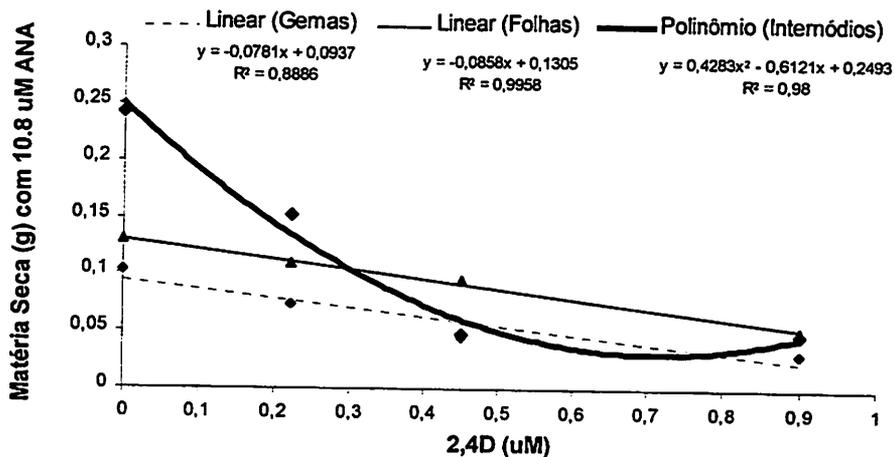
Tratamentos		Matéria seca (g)			Coloração			Num. Raíz		
2,4-D ( $\mu$ M)	ANA ( $\mu$ M)	F	G	I	F	G	I	F	G	I
0,22	0,0	0,14	0,02	0,17	A	IN	A	1,0	1,3	5,0
0,45	0,0	0,08	0,04	0,05	IN	A	A	0,25	-	0,5
0,90	0,0	0,05	0,03	0,04	IN	IN	IN	-	-	-
0,00	10,8	0,13	0,10	0,25	A	A	A	7,0	11,0	43
0,22	10,8	0,11	0,07	0,15	IN	IN	IN	0,8	4,0	15
0,45	10,8	0,09	0,04	0,05	IN	IN	IN	0,6	-	-
0,90	10,8	0,05	0,03	0,05	IN	IN	IN	-	-	-
0,00	21,6	0,16	0,08	0,22	A	A	A	1,0	7,5	25
0,22	21,6	0,12	0,05	0,09	IN	IN	A	0,2	-	1,6
0,45	21,6	0,08	0,04	0,03	IN	IN	A	-	-	0,5
0,90	21,6	0,07	0,03	0,04	IN	IN	IN	-	-	-

A= amarelo; IN= início de necrose; F=folha; G=gema; I=internódio.

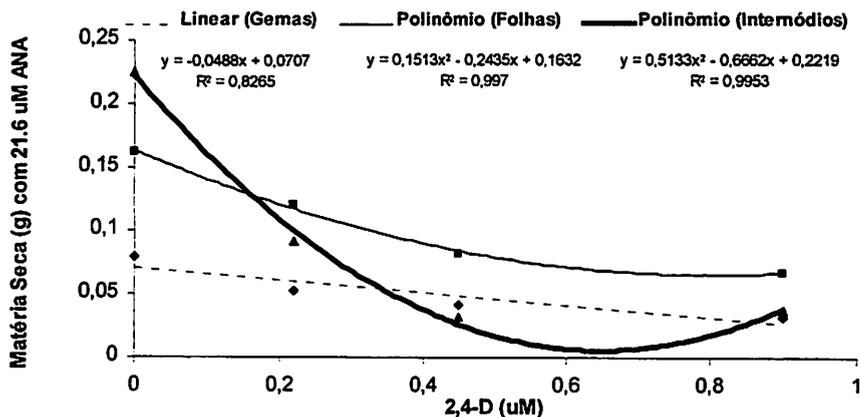
Nas concentrações de 10,8 e 21,6  $\mu$ M de ANA, os maiores ganhos de matéria seca dos calos ocorreu na ausência de 2,4-D (Figuras 2.6 e 2.7). Os maiores valores obtidos foram: 0,25 e 0,22; 0,13 e 0,16; 0,10 e 0,08 g, obtidos a partir dos explantes internódio, folha e gema, respectivamente. Os calos formados nestas concentrações apresentaram consistência friável e coloração amarelada (Figuras 2.8 e 2.9).



**FIGURA 2.5** Matéria seca de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, obtidos a partir de diferentes explantes e mantidos em meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D e 0.0  $\mu\text{M}$  de ANA



**FIGURA 2.6** Matéria seca de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, obtidos a partir de diferentes explantes e mantidos em meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D e 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA



**FIGURA 2.7.** Matéria seca de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, obtidos a partir de diferentes explantes e mantidos em meio de cultura com diferentes concentrações de 2,4-D e 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA.

De maneira geral, o ganho de matéria seca dos calos, para todos os explantes, foi diretamente proporcional ao aumento na concentração de ANA. Ou seja, o maior ganho ocorreu na concentração de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,0  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, para todos os explantes. Nesta mesma concentração, ocorreu um máximo crescimento de calos de *Ailanthus altissima* e, em trabalhos posteriores, esta concentração não afetou a síntese do composto polyacetyleno (Roberts, 1989).

A cultura de calos normalmente contém uma mistura heterogênea de células que não são uniformes em tamanho, forma, pigmentação, metabolismo ou número de cromossomos e muitas diferenças não são visíveis. Portanto, uma indução celular vai depender do explante inicial, devido à heterogeneidade das células. A adição de reguladores de crescimento é requerida para iniciar e manter a divisão celular. Então, um explante com células jovens (meristemáticas) tem um grande potencial para começar e proliferação celular rapidamente, quando comparado com tecidos onde há a presença de células

diferenciadas. Assim, há uma grande diferença em respostas na indução da formação de calos nos explantes utilizados para iniciar a cultura.

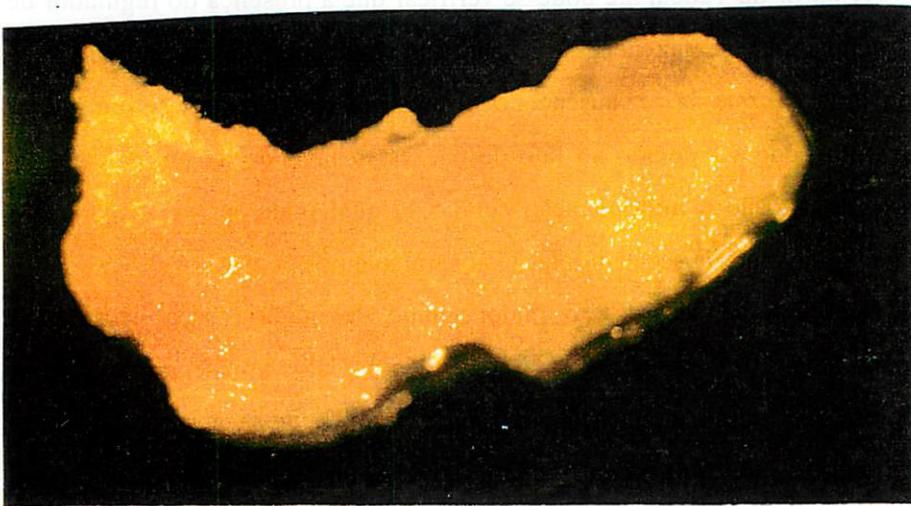
No Quadro 2.1 pode-se verificar a presença de raízes nos diferentes explantes, com exceção dos tratamentos com a concentração de 0.9  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, na presença de todas as concentrações de ANA e de todos os explantes. O maior número de raízes foi observado no explante internódio.

A presença de raízes não faz parte dos objetivos do presente trabalho, uma vez que a intenção não é a regeneração de plântulas a partir de calos, mas a máxima proliferação celular para posteriormente serem realizadas extrações fitoquímicas de metabólitos sintetizados por esta espécie. Assim, boa parte da energia gerada pelo metabolismo destes tecidos é gasta para a diferenciação do tecido em um órgão e não para a proliferação celular.

Em cultura de células de *Atropa belladonna*, foi desenvolvido um sistema modelo para a regulação da diferenciação celular com especial ênfase na atividade enzimática. Bajaj e Simola (1991) verificaram que ocorria uma elevada atividade enzimática na cultura não diferenciada, mas o mesmo não ocorria quando havia a ocorrência de raízes.



**FIGURA 2.8** Calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, formados a partir de folhas jovens e mantidos em meio de cultura com 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA.



**FIGURA 2.9** Calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, formados a partir de internódios jovens, mantidos em meio de cultura com 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA.

### 2.5.3. Manutenção de calos de *C. sicyoides*

Calos derivados do explante original podem ser mantidos em estado de crescimento ativo pela transferência de seus fragmentos para um novo meio de cultura (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977). Um início de diferenciação pode ocorrer nos calos mantidos no meio original então, uma forma de mantê-los num estado não-diferenciado, mas em plena proliferação, é transferi-los para um novo meio. Esta transferência pode ser necessária devido a exaustão do meio de cultura em relação a nutrientes, teor de umidade ou pelo acúmulo de compostos fenólicos que podem ocorrer com o passar do tempo.

Os resultados obtidos a partir da análise de variância, para ganho de matéria seca, demonstram uma interação significativa com 1% de probabilidade, entre as concentrações de ANA e de sacarose, com um coeficiente de variação igual a 15.8%.

A partir da Tabela 2.2 pode-se verificar que a presença do regulador de crescimento ANA se faz necessária para a manutenção de calos, para essa espécie, uma vez que na sua ausência ocorreu a presença de necrose (ou início) celular. Isto pode ser devido ao fato de não estar havendo a continuidade do processo de divisão e multiplicação celular, o qual pode ser verificado pelo baixo ganho de matéria seca em relação aos tratamentos com ANA.

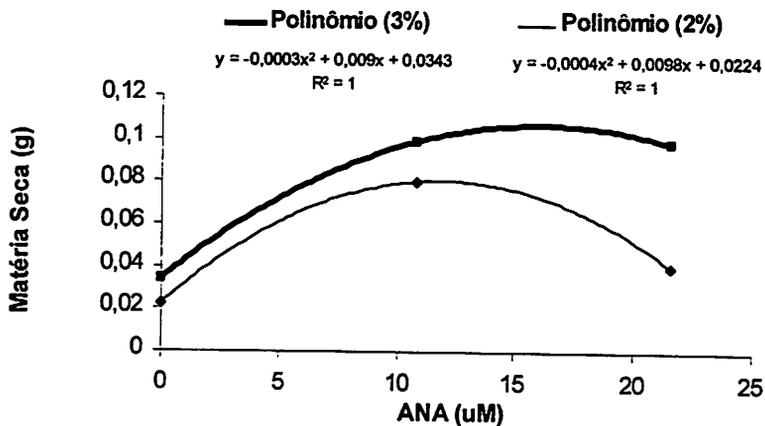
Com 2% de sacarose, o maior ganho de matéria seca ocorreu na concentração de 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA (0,079 g) e os calos apresentaram-se com uma coloração amarela e consistência friável. Com 3% de sacarose, o ganho de matéria seca foi muito próximo (0.098 e 0.097 g) nas concentrações de 10,8 e 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA, respectivamente (Figura 2.10), os quais também obtiveram uma coloração amarela e consistência friável.

Resultados semelhantes foram obtidos por Yamamoto (1991), trabalhando com *Scutellaria baricalensis*, com a finalidade de verificar o efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento do calos e na síntese de flavonóides. Este autor constatou que a sacarose a 3% era mais efetiva no crescimento do calos, mas somente na concentração de 5% é que ocorria um aumento na produção de flavonóides.

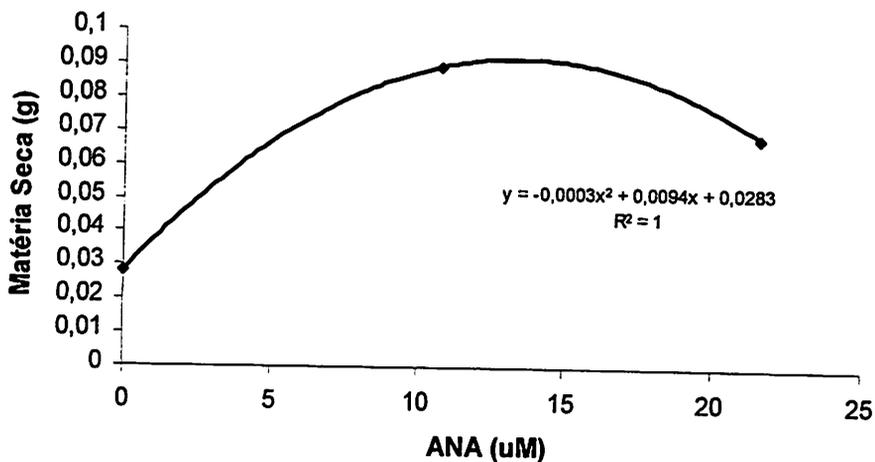
**TABELA 2.2** Ganho de matéria seca (g) e coloração de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, produzidos a partir de diferentes concentrações de ANA e sacarose.

Tratamento		Matéria seca (g)	Coloração
ANA ( $\mu$ M)	Sacarose (%)		
0	2	0,022	Marrom
10,8	2	0,079	Amarela
21,6	2	0,039	Amar. C/IN
0	3	0,034	Amar. C/IN
10,8	3	0,098	Amarela
21,6	3	0,097	Amarela

IN = início de necrose



**FIGURA 2.10** Ganho de matéria seca de calos de *Cissus sicyoides*, mantidos em meio de cultura, aos 30 dias, com a interação de diferentes concentrações de ANA e sacarose.



**FIGURA 2.11** Ganho de matéria seca, durante a manutenção de calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, sob diferentes concentrações de ANA.

A partir da Figura 2.11, verifica-se um maior ganho de matéria seca dos calos na concentração de 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA. Este resultado é interessante, uma vez que, para a indução de calos, a melhor concentração foi de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA mas, para a manutenção essa concentração teve que ser diminuída para 10.8  $\mu\text{M}$ .

Para a indução de calos, geralmente há a necessidade de altas concentrações de auxinas para ocasionar a divisão celular ao redor da região lesionada e promover a formação de uma grande massa celular. No entanto, durante a manutenção dos mesmos, não há esta necessidade, uma vez que o contínuo crescimento e divisão celular do tecido dos calos são acompanhados pelo aumento no conteúdo de proteínas e ácidos nucléicos. Isto resulta na síntese de DNA e diversos compostos necessários para a manutenção do metabolismo celular, contribuindo, dessa forma, para um aumento no ganho de peso seco dos calos. Portanto, não é necessária a adição de elevadas concentrações de auxinas, apenas o necessário para a manutenção do metabolismo das células do calos (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977). Além disso, na fase de manutenção, as células estão mais homogêneas.

Pireik (1987) também relata que durante o subcultivo da cultura de calos, as condições de crescimento (meio de cultura e fatores de crescimento físico) continuam sendo as mesmas da indução. Entretanto, as concentrações de auxinas e de citocininas geralmente são menores, pois caso contrário, o crescimento do calos paralisa após o subcultivo, indicando que o meio não é adequado.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bajaj e Simola (1991), quando estes verificaram que em cultura de calos de *Atropa belladonna*, a indução de calos exigia elevadas concentrações de ANA (10.8  $\mu\text{M}$ ), mas

durante a manutenção era necessária uma redução para 2,7  $\mu\text{M}$ , para que não ocorresse uma interferência na síntese do alcalóide hyoscyamina.

O subcultivo da cultura de calos pode ser realizado por um determinado período de tempo, o qual é inerente a cada espécie. A manutenção de calos por longos períodos de tempo pode ocasionar modificações no padrão metabólico, podendo ocorrer a ausência de algumas enzimas chave para a síntese de compostos esperados ou a presença destas em pequena quantidade, uma vez que a expressão da informação genética é determinada pela interação entre o genoma e condições endógenas e exógenas. Então, vários fatores poderiam influenciar este processo, dentre os quais podem ser citados os reguladores de crescimento, pois tem sido demonstrado que as auxinas afetam os níveis de antocianinas, por exemplo, e que dependendo do tipo e concentração, estes podem causar a perda do potencial morfogenético das células da cultura de calos.

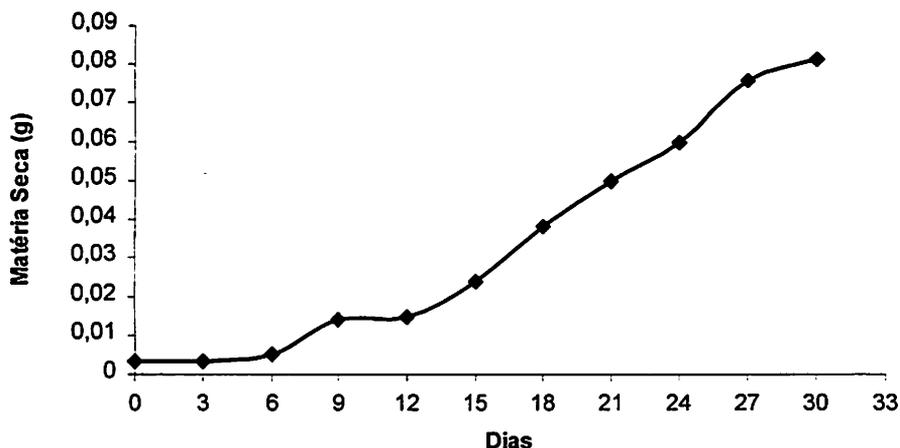
#### **2.5.4 Estabelecimento da curva de crescimento de calos de *C. sicyoides***

A partir da Figura 2.12, pode-se verificar que a curva de crescimento celular de calos de *Cissus sicyoides*, baseada no peso seco, segue uma curva padrão com cinco fases bem distintas: lag, log, linear, desaceleração e estacionária.

A fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão, ocorreu até o sexto dia. O período de máxima divisão celular ou fase logarítmica de crescimento ocorreu entre sexto e décimo quinto dia, similar à curva de crescimento de *Cordia verbenacea* (Lameira, 1997).

Na fase lag ocorreu a máxima atividade respiratória em cultura de suspensão celular de *Acer pseudoplatanus* e é onde ocorre a máxima atividade

da enzima fosfofrutoquinase, enzima chave da glicólise, (Shimizu et al,1977 e Givan, 1968). Por outro lado, a atividade de todas as enzimas envolvidas na via das pentose fosfato tem máxima duração na fase logarítmica (Fowler, 1971). Assim, a fase lag pode ser considerada como a fase produtora de energia e a fase logarítmica como fase biossintética (Shimizu et al, 1977).



**FIGURA 2.12** Curva de crescimento, a partir da matéria seca de calos, de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias.

O período de crescimento linear ocorreu entre o décimo quinto dia e o vigésimo quarto dia. Segundo Lameira (1997), nesta fase ocorre uma diminuição da divisão celular e as células crescem.

A fase de desaceleração do crescimento ocorreu entre o vigésimo quarto e o vigésimo sétimo dia. Segundo Smith (1992), as culturas nesse período devem ser transferidas para um novo meio devido à redução de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas.

A fase estacionária ou o período no qual ocorre um menor crescimento celular, ocorreu a partir do vigésimo sétimo dia. O acúmulo de muitos produtos

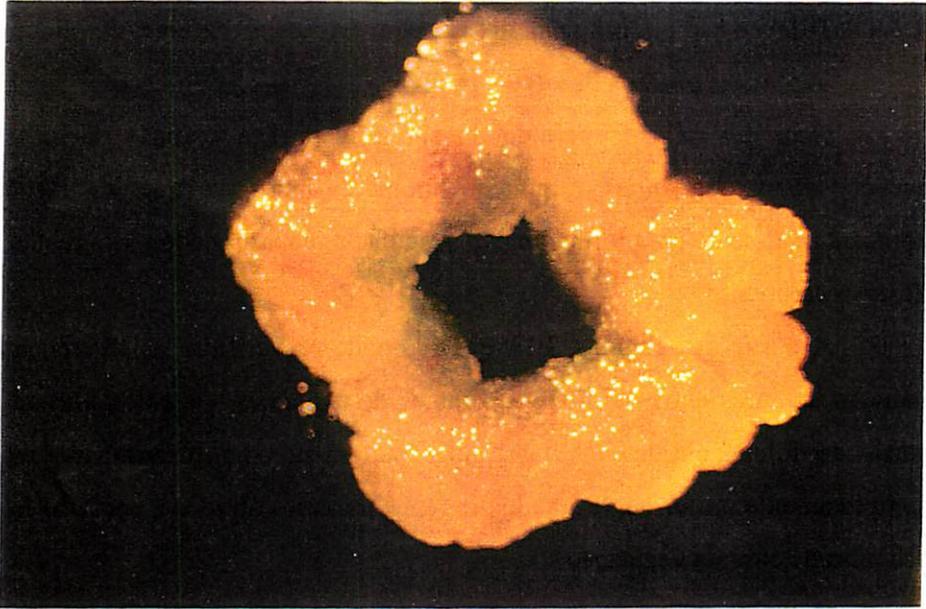
secundários é máximo durante esta fase, por exemplo dos alcalóides: ajmalicine e serpentine em *Catharanthus roseus* (Neumann, 1983 citado por Sakuta e Komamine, 1987).

O acúmulo de metabólitos secundários em relação ao crescimento ocorre em duas categorias: acúmulo durante a fase estacionária com uma relação inversa entre crescimento e acúmulo, como o acúmulo de antocianinas em cultura de *Daucus carota*; e acúmulo durante a fase logarítmica, como o acúmulo de betacianinas em *Phytolacca americana*, onde o acúmulo está associado com a divisão celular (Sakuta e Komamine, 1987).

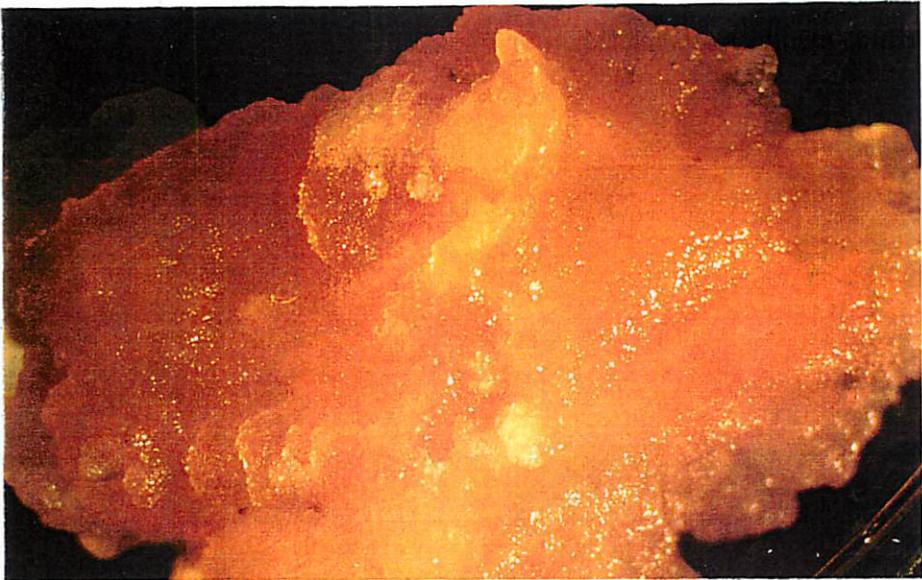
Este acúmulo de metabólitos secundários, que ocorre nas diferentes fases de crescimento celular, apresenta uma aparente correlação entre diferenciação estrutural e produção de metabólitos secundários, podendo em muitos casos ser decorrente de um aumento na habilidade de vacuolização das células para acumular estes metabólitos (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

A passagem de uma fase para outra pode ser influenciada por alguns fatores: a limitação da presença de carboidratos poderia causar uma desaceleração gradual no crescimento e a deficiência de fósforo poderia produzir uma rápida transição entre as fases exponencial e estacionária. A determinação do nutriente limitante é importante para se ter um controle sobre a longevidade da fase estacionária (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977).

É necessário fazer a análise dos metabólitos que ocorrem, nesta espécie, nas diferentes fases de crescimento, para se saber em qual fase ocorre o acúmulo dessas substâncias, para ser determinado em qual período deve ser realizada a repicagem de manutenção.



**FIGURA 2.13** Calos de *Cissus sicyoides*, aos 30 dias, obtidos a partir de folhas jovens provenientes de casa de vegetação.



**FIGURA 2.14** Calos de *C. sicyoides*, aos 30 dias, induzidos a partir de folhas oriundas de plântulas estabelecidas *in vitro*.

#### 2.5.4 Diferenças na indução de calos e estrutura celular de fontes de explantes obtidos *in vitro* e *in vivo*.

Num determinado período do ano (inverno), a indução de calos na espécie *Cissus sicyoides* tornou-se limitada, uma vez que as respostas apresentaram-se de uma forma lenta e irregular. Então, procedeu-se a realização deste experimento.

A partir das Figuras 2.13 e 2.14, pode-se verificar as diferenças na indução de calos entre as diferentes fontes de explantes. Os calos formados a partir de folhas obtidas *in vitro*, apresentaram-se com uma massa celular completamente uniforme, resultado diferente dos calos obtidos a partir de folhas oriundas de casa de vegetação.

O ganho médio de matéria seca dos calos foi de 56 e 245 mg (Figura 2.15), para aqueles induzidos a partir de explantes obtidos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, representando um ganho de 437% para o explante obtido a partir de plântulas estabelecidas *in vitro*.

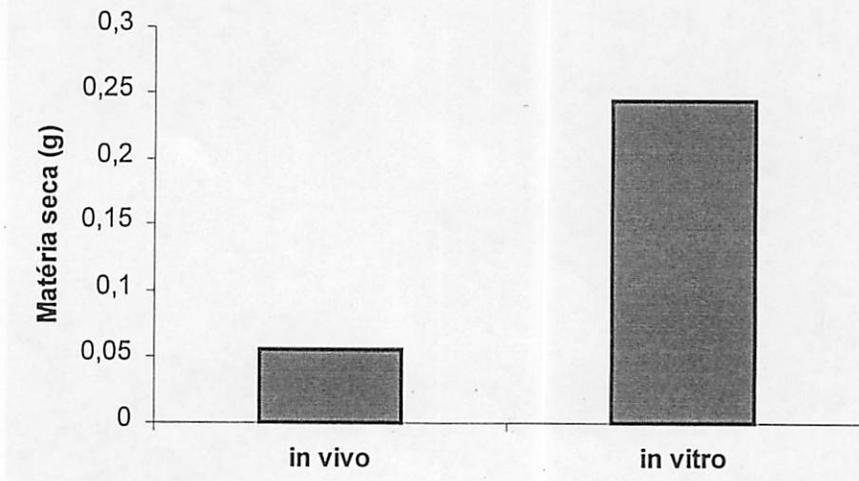
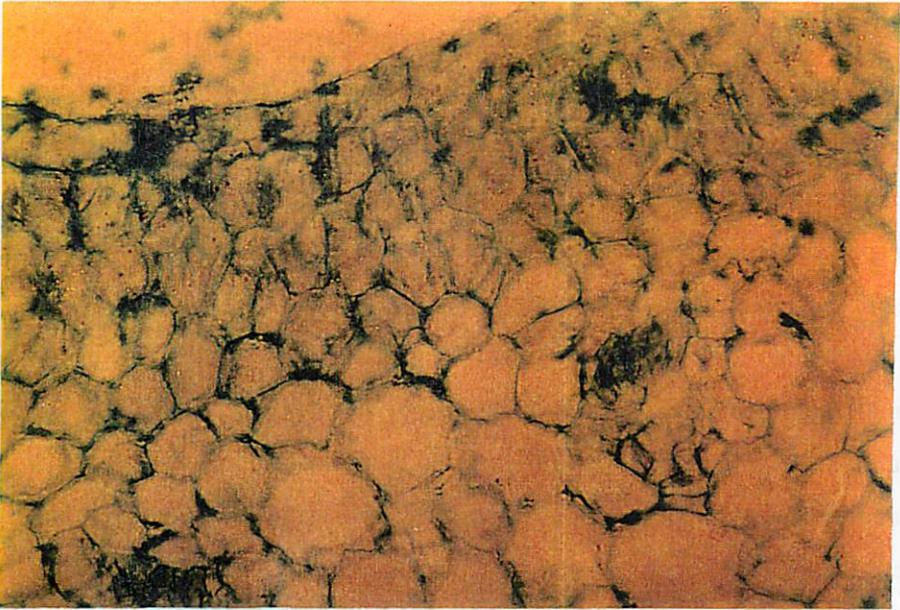


FIGURA 2.15 Matéria seca de calos de *C. sicyoides*, aos 30 dias, obtidos a partir de diferentes fontes de explante *in vivo* e *in vitro*.

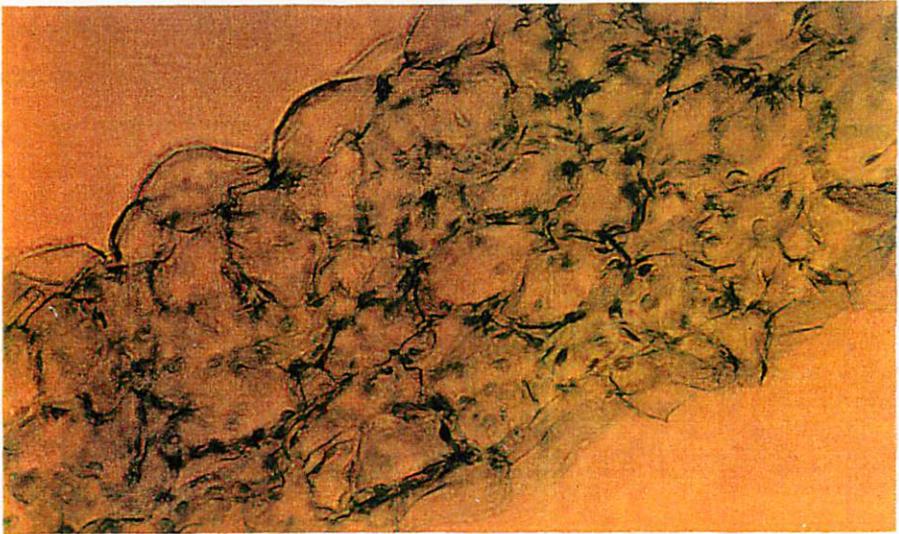
As Figuras 2.16 e 2.17 apresentam as estruturas celulares dos diferentes tecidos. No tecido proveniente de casa de vegetação (*in vivo*), é possível visualizar uma diferenciação das células do parênquima, as quais apresentam tamanhos diferenciados com presença de rafídeos e drusas. O tecido de folhas proveniente de cultura de tecidos (*in vitro*), apresenta uma formação de células não diferenciadas, as quais possuem tamanhos iguais.

Quando há apenas células diferenciadas no explante isolado, a de-diferenciação pode ocorrer antes da divisão celular. As células parenquimáticas usualmente realizam esta de-diferenciação que tem a importante função de capacitar células maduras do explante isolado de uma planta adulta para ser re-determinado a uma nova função. Neste processo, células adultas são temporariamente habilitadas para reverter de um estado adulto para o juvenil. Este rejuvenescimento poderia ter importantes consequências, induzindo as células a se dividirem intensamente (Pierik, 1989).

Entretanto, se no tecido houver apenas células não diferenciadas, estas estarão aptas a entrarem na divisão celular imediatamente. Talvez por isso, tenha ocorrido uma diferença significativa no ganho de matéria seca entre os calos.



**FIGURA 2.16** Corte anatômico do tecido de folha de *Cissus sicyoides*, proveniente de plantas mantidas em casa de vegetação, com a sua respectiva estrutura celular



**FIGURA 2.17** Corte anatômico do tecido de folha de *Cissus sicyoides*, proveniente de plântulas estabelecidas *in vitro*, com a sua respectiva estrutura celular.

## 2.6 CONCLUSÕES

A obtenção de calos da espécie *C. sicyoides* é dependente da presença de reguladores de crescimento.

A melhor concentração do regulador de crescimento para indução de calos em explante secundário foi de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA, na ausência de luz.

O explante folha mostrou ser o mais adequado para a indução de calos nesta espécie, proporcionando calos amarelos e friáveis.

O explante internódio proporcionou a obtenção de calos com o maior ganho de matéria seca quando comparado com os outros explantes, porém com elevado número de raízes, o que não o qualifica para ser utilizado no estudo e produção de metabólitos secundários nesta espécie;

O ganho de matéria seca dos calos é diretamente proporcional ao aumento nas concentrações de ANA, sendo que os maiores ganhos foram obtidos na concentração de 21,6  $\mu\text{M}$  de ANA na ausência de 2,4-D.

A concentração de 10,8  $\mu\text{M}$  de ANA é a mais eficiente para a manutenção de calos de *C. sicyoides*, na presença de 3% de sacarose;

A curva de crescimento celular apresentou cinco fases distintas: lag, log, linear, desaceleração e estacionária, sendo que a partir do vigésimo sétimo dia a curva entrou na fase estacionária.

O tecido proveniente de folhas de plântulas estabelecidas *in vitro* foi mais eficiente na indução de calos por ser menos diferenciado do que o tecido proveniente de folhas de casa de vegetação.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Califórnia, Blackwell scientific Publications, 1977. p. 267-306.
- BAJAJ, Y.P.S. e SIMOLA, L.K. *Atropa belladonna* L. *In vitro* culture, regeneration of plants, cryopreservation and the production of tropane alkaloids. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry III – Medicinal and Aromatic Plants II**. Springer – Verlag. p. 1-21, 1991.
- BARKER, W.G. Behavior *in vitro* of plant cell from various sources within the same organism. **Can. J. Bot.**, 47: 1334-6, 1969.
- BONGA, J.M. Applications of tissue culture in forestry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**, Berlin, Springer – Verlag, p. 93-108, 1977.
- CONSTABEL, F. & VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**, vol.4. Flórida, Academic Press, pp.597-614. 1987.
- ESAU, K. **Plant Anatomy**. Wiley, New York, 1965.
- FORTES, G.R.L. Calogênese e Organogênese “*in vitro*” de Macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. **Dissertação**, Viçosa: UFV, 1992, p. 21-23.
- FOWLER, M.W. Carbohydrate oxidation during the growth of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. **J. Exp. Bot.** V.22, p. 715-724, 1971.
- GIVAN, V.C. Short-term changes in hexose phosphates and ATP in intact cells of *Acer pseudoplatanus* L. subjected to anoxia. **Physiol. Plant.**v.43, p. 948-952, 1968.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e Aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990, p. 99 – 169.
- GUANG-ZHI, Z. *Anisodus acutangulus*: production of scopolamina and hyoscyamine in cell culture. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry I – Medicinal and Aromatic Plants I**. Springer – Verlag. p. 23-46, 1989.
- HIRAOKA, N. *Bupleurum falcatum* L.: Embriogenesis and the production of saikosaponins. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry I – Medicinal and Aromatic Plants I**. Springer – Verlag. p. 69-81., 1989.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940, 523p.
- JONARD, R. *Jasminum spp* (Jasmine): micropropagation and the production of essential oils. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry I – Medicinal and Aromatic Plants I**, p. 315-330, 1991.
- 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.)** Tese. UFLA.Lavras-MG, 1997, 87p.
- MEHRA, A. e MEHRA, P.N. Organogenesis and plantlet formation *in vitro* in almond. **Bot. Gaz.**, 135: 61-73, 1974.
- NISHI, A; Et al, Partial synchronization of carrot cell culture by auxin deprivation . **Physiology Plant**, 39: 9-12, 1977.
- PAIVA NETO, V.B. **Comportamento “*in vitro*” de tecido foliar e segmento nodal de Moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud).**Dissertação, Lavras: UFLA, 1996. P. 1-8.
- PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of high plants**, 1989, 2ed, Martins Nijhoff publishers, 344p.

- ROBERTS, M.F. *Ailanthus altissima* (The tree of heaven): *In vitro* culture and the formation of alkaloids and quassinoids. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry I – Medicinal and Aromatic Plants III**. Springer – Verlag. p. 39-72., 1989.
- SAKUTA, M. e KOMAMINE, A. **Cell Growth and accumulation of secondary metabolites**. In: CONSTABEL, F. & VASIL, I.K. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol.4. Flórida, Academic Press, pp.597-614. 1987.
- SASS, J. **Botanical microtechnique**. IOWA: College Press, 1951, 228p.
- SCOTT, T. K. **Hormonal Regulation of Development II – the function of hormones from the level of the cell to the whole plant**, vol 10, New York, 1984.
- SHIMIZU, T.; CLIFTON, A.; KOMAMINE, A.; AND FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. **Physiol. Plant.** V.40, p. 125-129, 1977.
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 1992.171p.
- TORRES, A.C. e CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990.
- YAMAMOTO, H. *Scutellaria baricalensis* Georgi: *In vitro* culture and the production of flavonoids. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry I – Medicinal and Aromatic Plants I**, 1991, P. 398-415.

## CAPÍTULO III

### PROPAGAÇÃO IN VIVO E IN VITRO DE *Cissus sicyoides*

#### RESUMO

O estudo da propagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo. Contudo, não há, na literatura, referências sobre qualquer forma de propagação de *C. sicyoides*. O objetivo do trabalho foi a propagação *in vivo* e a propagação *in vitro* (estabelecimento e multiplicação) desta espécie. Plantas mantidas em casa de vegetação serviram como fonte de explantes, de onde foram retiradas estacas com 10 e 20 cm de comprimento, as quais foram colocadas em solução contendo 80 e 160 mg/l de AIB, na presença ou não de sacarose + ácido bórico, por duas horas e, em seguida, colocadas em sacos de plástico contendo areia como substrato. Para o estabelecimento *in vitro*, os segmentos nodais foram submetidos às seguintes condições de assepsia: 30 minutos em água corrente, 30 segundos em álcool 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio comercial (30%) e, posteriormente, os explantes foram lavados por seis vezes em água estéril, em câmara de fluxo laminar e, em seguida, excisados e inoculados com 10 mm de comprimento em meio de cultura sólido (0,7% de ágar) de Murashige & Skoog (MS) suplementado com: 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina; 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina + 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA; 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA. Para a multiplicação *in vitro*, procedeu-se à cultura nodal a partir de explantes com 10 mm, já estabelecidos *in vitro*, os quais foram inoculados em meio de cultura sólido (0,7% de ágar) MS, suplementado com a interação: 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP x 2,7 e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA e com a interação 2,7 e 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA x 2,32 e 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina. Aos 45 dias, foi determinado o peso seco do sistema radicular formado nas estacas e aos 60 dias avaliou-se: número de gemas, altura e número de raízes das plântulas mantidas *in vitro*. As estacas com 10 cm apresentaram um bom enraizamento quando tratadas com 160 mg/l de AIB e os resultados obtidos *in vitro* demonstraram que os explantes foram melhor estabelecidos e multiplicados em meio de cultura suplementado com 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina e 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA. Estes reguladores de crescimento proporcionaram uma maior indução de gemas, maior altura e ausência de formação de calos na base das plântulas.

## 3.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.2.1 Enraizamento de estacas

Em plantas arbóreas, as raízes adventícias, geralmente, originam-se na região cambial, floemática e xilemática e os primórdios radiculares desenvolvem-se logo abaixo do primeiro nódulo ou na base da estaca (Lovell e White, 1986). Nas plantas herbáceas, as raízes adventícias, na maioria das vezes, originam-se entre os feixes vasculares, sendo que o tecido envolvido varia de acordo com a espécie. Por exemplo em tomate e abóbora, as raízes adventícias surgem no floema parenquimático e em *Coleus sp* originam-se no periciclo (Becker, 1997).

A indução do enraizamento é dependente de vários fatores internos e externos: nível endógeno de auxinas, temperatura, umidade, cofatores para a síntese hormonal, balanço de carboidratos, aeração, estado nutricional, juvenildade, etc. (Kersten, 1990).

As auxinas são os hormônios mais diretamente relacionados com a iniciação do enraizamento. Estas atuam no metabolismo do enraizamento e em outros processos do crescimento e desenvolvimento de plantas através de uma comunicação intercelular, a qual é dependente de uma série de mensageiros químicos que irão enviar um sinal de transdução para que uma determinada atividade seja realizada (Pasqualetto, 1995).

Esse grupo hormonal, quando sintetizado ou aplicado exogenamente, é transportado polarmente, até a base das estacas, onde acumula-se. Este tipo de transporte requer energia e a teoria ácida é a mais aceita para explicar este gasto de energia metabólica na manutenção de um gradiente de pH na plasmalena, ocasionando na alongação celular (através da ativação de enzimas responsáveis

pelo afrouxamento da parede celular e o seu consequente preenchimento) (Salisbury, 1992). As auxinas também podem atuar em outros processos importantes no crescimento da célula: absorção ou produção de solutos osmóticos, manutenção da estrutura da parede celular e condutividade hidráulica da membrana da célula (Taiz e Zeiger, 1991).

Segundo Scott (1984), as auxinas são importantes na síntese de DNA. Logo, elas atuam na iniciação do enraizamento através da alongação e divisão celular.

A auxina mais comumente utilizada para a indução do enraizamento de estacas é o ácido indol butírico (AIB) (Poggiani e Suiter Filho, 1974; Kersten e Fachinello, 1981 e Hostalácio, Soares e Coelho, 1977), uma vez que o ácido indol acético (AIA) é menos estável do que as outras auxinas, por ser facilmente degradado pela luz e temperatura.

*Jarvis* (1983) cita que as auxinas são importantes para a iniciação do enraizamento de estacas de feijão e que a aplicação exógena de boro é essencial para a continuidade da divisão e desenvolvimento dos primórdios radiculares. Os mesmos autores relatam que as auxinas, quando aplicadas isoladamente, são suficientes para induzir à re-diferenciação de células das raízes e iniciar a divisão celular.

A região de iniciação do enraizamento é dependente de um suprimento de carboidratos pelas folhas, mas o maior efeito na aplicação basal de AIB é no aumento do nível endógeno de AIA oriundo das folhas via sistema de transporte polar, uma vez que *Jarvis* (1983) concluíram que durante cada estágio de enraizamento, o AIB seria rapidamente transportado via transpiração das folhas, convertendo e liberando AIA dentro de um sistema de transporte apropriado. Resultados semelhantes foram obtidos por Epstein e Lavee (1983), quando analisaram o metabolismo e transporte do ácido indol acético em estacas de

videira e oliveira e verificaram que o AIB marcado radioativamente era convertido em AIA.

Raízes de plantas de milho deficientes em boro apresentaram altos teores de AIA comparados às raízes de plantas controle. O teor de AIA aumenta com a deficiência de boro em raízes de trigo (Kersten, 1990).

Jarvis (1983), relata que a utilização do boro no enraizamento seria adequada após o processo ter iniciado, porque este elemento proporciona uma diminuição do teor de auxinas, além de ter a função de aumentar a atividade da AIA-oxidase, permitindo, desta forma, o desenvolvimento dos primórdios radiculares.

Folhas de plantas deficientes em boro apresentam, comparativamente, maiores concentrações de açúcar e de amido. Contudo, a concentração nos ramos é baixa, indicando que a presença de boro em quantidades adequadas é necessária na translocação do açúcar das folhas para os ramos. Quando se utiliza sacarose e boro, juntos ou separados, em solução nutritiva, observa-se uma dependência na translocação do açúcar em presença do boro (Kersten, 1990).

### **3.2.2 Propagação *in vitro***

A cultura de tecidos vegetais tem possibilitado a regeneração *in vitro* de várias espécies vegetais, através da determinação e utilização de várias metodologias. Dentre as vantagens da cultura de tecidos, ressalta-se a de ser uma técnica de pesquisa valiosa no estudo das plantas, minimizando e controlando variáveis relacionadas com fatores ambientais, permitindo o cultivo de plantas livres de doenças e o estudo do metabolismo primário e secundário (Dixon, 1985).

A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução (baixa taxa de germinação, por exemplo), exploração irracional resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente (poluição) dificultando a coleta de plantas saudáveis (Kajiki, 1996).

A morfogênese de plantas depende da integração e interação de vários órgãos, tecidos e células. Juntos, eles formam um sistema complexo que pode ser analisado pelo estudo da origem e movimentação de substâncias primariamente envolvidas na morfogênese (por exemplo, hormônios) e também na correlação entre a capacidade de diferenciação das várias partes da planta para síntese e transporte primário de nutrientes e metabólitos. Este sistema controla a formação de órgãos e embriões, podendo ser simplificado pelo isolamento de células, tecidos e órgãos e o seu subsequente cultivo *in vitro*.

A demonstração da totipotência de células e tecidos isolados de plantas é uma razão para o aumento do uso da cultura de tecidos no estudo morfo genético (Street, 1977), uma vez que plantas regeneradas a partir de um órgão ou tecido serão geneticamente idênticas à planta original, o que é interessante do ponto de vista farmacêutico, pois haverá a produção das mesmas substâncias sintetizadas pela planta matriz.

O estabelecimento *in vitro* depende de alguns fatores, como as condições em que as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação, posição do explante na planta, época do ano, nível endógeno de hormônio, tamanho do explante, método de inoculação, fatores físicos de crescimento e adição de outras substâncias no meio de cultura (por exemplo, reguladores de crescimento).

A partir do momento em que o explante é inoculado no meio de cultura, ocorrem alguns processos até o estabelecimento da espécie: de-diferenciação e

diferenciação celular (possibilitando a re-determinação e o rejuvenescimento celular), divisão celular algumas vezes seguida pela formação de calos, iniciação e desenvolvimento do órgão (Pierik, 1987).

Segundo Kyte e Kleyn (1996), caules de plantas têm um grande potencial para regeneração, podendo crescer de diferentes formas e hábitos. Geralmente o crescimento se inicia a partir dos tecidos meristemáticos constituídos por células indiferenciadas que ainda não têm uma função definida. Este tipo de célula localiza-se nos ápices de caules e raízes, axilas das folhas, no caule (câmbio), nas margens de folhas e no tecido de calos. A partir da influência de diversos fatores físicos e genéticos, estas células se diferenciam em folhas, caule e raízes, e outros órgãos e tecidos. O tecido meristemático é a base do crescimento e desenvolvimento de plantas.

Os reguladores de crescimento mais utilizados no estabelecimento e multiplicação *in vitro* são as auxinas ANA e AIA, e as citocininas BAP, cinetina e TDZ. A proporção entre auxinas e citocininas regulam a morfogênese *in vitro*. Skoog e Miller (1965) demonstraram que em cultura de tabaco ocorre produção de calos, raízes ou brotos, dependendo da proporção entre auxinas e citocininas. Altos níveis de auxinas em relação à citocinina estimularam a formação de raízes, enquanto altos níveis de citocinina em relação à auxina estimularam a formação de brotos. Concentrações intermediárias entre os dois tipos de reguladores de crescimento promoviam a formação de calos.

Não há na literatura referências sobre a propagação *in vitro* e *in vivo* da espécie *Cissus sicyoides*

### 3.3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi o enraizamento de estacas com 10 e 20 cm *in vivo*; e o estabelecimento e multiplicação *in vitro* da espécie *Cissus sicyoides*.

## 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.4.1 Enraizamento *in vivo* de estacas de *C. sicyoides*.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da UFLA.

Plantas matrizes mantidas em casa de vegetação foram utilizadas como fonte de material vegetativo.

As estacas foram coletadas da região mediana de plantas matrizes com um ano de idade, as quais continham folhas e mediam 20 cm (com duas gemas) e 10 cm (com apenas uma gema). Os dois tipos de estacas foram colocados, durante 2 horas, em solução de AIB (0; 80 e 160 mg/l) acrescida ou não com 20g de sacarose + 150 mg/l de ácido bórico, com exceção das estacas controle que foram colocadas diretamente no substrato. O pH das soluções foi ajustado para 5.8.

Após a imersão nas soluções, as estacas foram colocadas cada uma em um saco de polietileno, com capacidade para 500 ml, contendo areia como substrato, mantidas sob sombrite, com redução de luz em 50% e a irrigação realizada manualmente, uma vez ao dia.

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com 12 tratamentos e cada parcela composta por 4 sacos de polietileno e cinco repetições, totalizando vinte estacas por tratamento.

O número, comprimento e peso seco de raízes foram avaliados aos 45 dias após a instalação do experimento.

O desdobramento da análise de variância utilizada foi baseada na significância do teste F e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de médias de Scott & Knott, com 5% de probabilidade.

### 3.4.2 Propagação *in vitro* de *C. sicyoides*.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da UFLA.

#### 3.4.2.1 Estabelecimento de *C. sicyoides in vitro*

Plantas com um ano de idade, mantidas em casa de vegetação, foram utilizadas como fonte de explantes. Retirou-se segmentos nodais, os quais foram submetidos às seguintes condições de assepsia: 30 minutos em água corrente, 30 segundos em álcool 70%, 20 minutos em água sanitária 30% adicionada de duas gotas de tween 20. Os explantes foram lavados por seis vezes em água estéril em câmara de fluxo laminar e, após, excisados e inoculados com 10 mm de comprimento em meio de cultura sólido (0,7% de ágar) de Murashige e Skoog (MS) suplementado com: 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina; 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina + 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA; 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA e o controle.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  antes que fossem autoclavados.

Os explantes foram colocados em tubo de ensaio (25 x 150 mm) e incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  num fotoperíodo de 16 horas luz, sob  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de irradiância em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 plântulas por parcela e 10 repetições. Aos 60 dias, avaliou-se estatisticamente: número de gemas, altura (cm) das plântulas, número de raízes e presença de calos, através do teste de médias de Tukey com 5% de probabilidade.

### 3.4.2.2 *Multiplicação de C. sicyoides in vitro:*

Procedeu-se à cultura nodal a partir de explantes com 10 mm de comprimento obtidos a partir de plântulas estabelecidas *in vitro*. Estes foram inoculados em meio de cultura sólido (0.7% de ágar) de Murashige e Skoog (MS), suplementado com: BAP (2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) x ANA (2,7 e 5,4  $\mu\text{M}$ ) e ANA (2,7 e 5,4  $\mu\text{M}$ ) x cinetina (2,32 e 4,64  $\mu\text{M}$ ).

O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , antes da autoclavagem e os explantes foram mantidos nas mesmas condições de ambiente utilizadas para o estabelecimento *in vitro*.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), em que cada parcela continha 4 tubos de ensaio e cada tratamento seis repetições.

Aos 60 dias avaliou-se estatisticamente: número de gemas, altura, número de raízes e presença de calos, através do teste de médias de Tukey com 5% de significância.

## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.5.1 Enraizamento de estacas *in vivo* de *C. sicyoides*.

Na Figura 3.1 são apresentados os resultados do ganho de matéria seca das raízes, obtidos a partir de estacas com 10 e 20 cm, onde verifica-se que ocorreu enraizamento em todos os tratamentos.

A partir do teste de médias, verificou-se que os melhores resultados para as estacas com 20 cm, foram proporcionados pelo uso do regulador de crescimento AIB, independente da concentração e da presença de sacarose e ácido bórico. Mas, para as estacas com 10 cm de comprimento, o maior ganho

de matéria seca de raiz ocorreu com o uso de AIB na concentração de 160 mg/l, na ausência de sacarose e ácido bórico.

Analisando o ganho de matéria seca das raízes formadas a partir das estacas controle, verifica-se que esta espécie é de fácil enraizamento, pois ele ocorreu na ausência de qualquer fator indutor deste processo, para os dois tipos de estacas.

O suprimento somente de sacarose e ácido bórico, durante a indução do enraizamento para os dois tipos de estacas, proporcionou um menor ganho de matéria seca, quando comparado com as estacas onde foi adicionado AIB, possivelmente porque elas continham reservas suficiente para proporcionar o enraizamento e o desenvolvimento da parte aérea. Segundo Janick (1966), a presença de gemas e folhas tem grande influência no enraizamento de estacas, entretanto, em muitas espécies, o efeito das gemas deve-se principalmente à produção de auxina, enquanto que o estímulo provocado pelas folhas está relacionado com o fornecimento de carboidratos. Em algumas espécies, o material de reserva está estocado no próprio caule, não requerendo a presença de folhas, indicando que existem co-fatores suficiente na estaca para a iniciação do enraizamento.

Segundo *Jarvis* (1983), a adição de boro proporciona um maior desenvolvimento de raízes em estacas de feijão, quando adicionado após a aplicação de auxina, uma vez que este elemento é responsável pelo desenvolvimento dos primórdios radiculares e a auxina pela diferenciação das células para iniciar o enraizamento. Portanto, a presença de sacarose e ácido bórico na indução do enraizamento, para esta espécie, se torna desnecessária, uma vez que os resultados de matéria seca das raízes obtidas a partir destes tratamentos não diferiram dos tratamentos controle para os dois tipos de estacas.

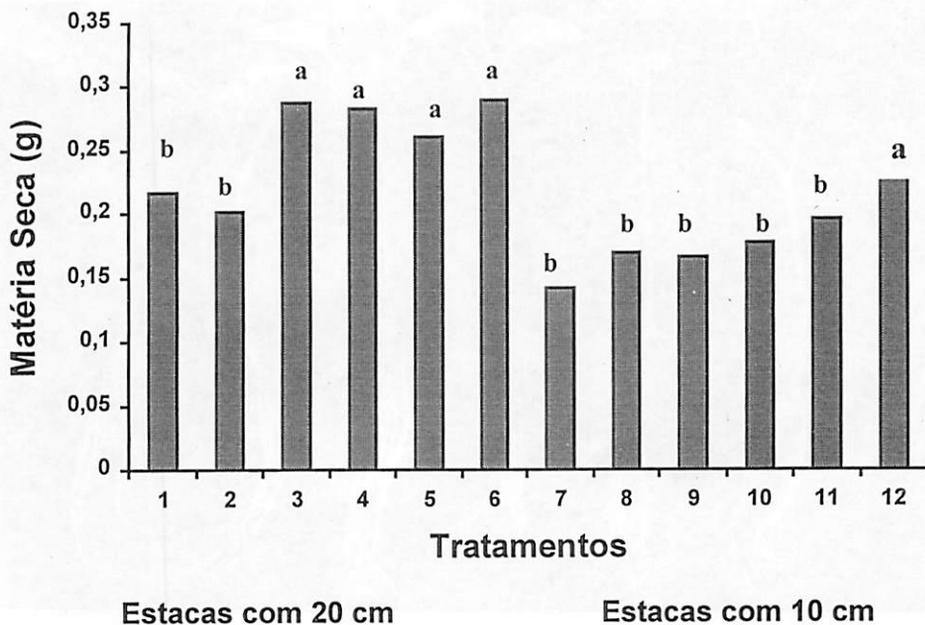
A adição de AIB, proporcionou um maior ganho de matéria seca, independente da concentração, para as estacas com 20 cm de comprimento. Nas estacas com 10 cm, o maior ganho de matéria seca ocorreu na maior concentração de AIB (160 mg/L), mas quando esta mesma concentração foi acrescida de sacarose e ácido bórico, a produção de matéria seca das raízes foi semelhante a das estacas mantidas no tratamento controle. Este fato é explicado por Kersten (1990), que relatou a presença de boro, diminuindo o teor de AIA livre em raízes de trigo e milho. O boro tem a função de aumentar a atividade da enzima AIA-oxidase, sendo esta enzima responsável pela degradação da principal auxina indutora do enraizamento (AIA) (Jarvis, 1983). Epstein e Lavee (1983) verificaram que, em estacas de videira e oliveira, o AIB era convertido em AIA durante o processo de enraizamento. Portanto, a presença de boro nos tratamentos com AIB nas estacas com 10 cm, neste trabalho, pode ter resultado num menor ganho de matéria seca das raízes, por esta auxina ter sido degradada pela presença da AIA – oxidase, ativada pela presença de boro na solução indutora de enraizamento. Nas estacas com 20 cm, a presença de boro não interferiu na produção de matéria seca uma vez que, estatisticamente, não houve diferenças entre os tratamentos que continham boro e os que tinham apenas AIB, independente da concentração, possivelmente porque as estacas com 20 cm poderiam ter maior concentração endógena de auxina quando comparadas com as estacas com 10 cm.

A capacidade de enraizamento dos diferentes tipos de estacas pode ser visualizada na Figura 3.1, sendo que o ganho de matéria seca de raízes para ambos os controles foram 0,21 e 0,14 g, para estacas com 20 e 10 cm, respectivamente.

Estatisticamente, não houve diferenças entre os tratamentos utilizando os dois tipos estacas, na concentração de 160 mg/l de AIB. Em termos práticos,

este resultado é muito importante, uma vez que, além de promover o enraizamento, estes tratamentos também proporcionaram a formação de brotações. Desta forma, em determinadas épocas do ano, pode ocorrer escassez de material vegetal desta espécie e o uso de estacas com 10 cm pode viabilizar e maximizar a produção de mudas, num mesmo período de tempo que seria utilizado para o enraizamento de estacas com 20 cm de comprimento.

Na Figura 3.2 podem ser visualizadas as comparações entre o desenvolvimento radicular das estacas mantidas nos diferentes tratamentos.



	AIB (mg/L)	Sacar.(g) + Ac. Bórico (mg/L)
1) (10cm)	-	-
2) (10cm)	-	20 + 160
3) (10cm)	80	20 + 160
4) (10cm)	80	-
5) (10cm)	160	20 + 160
6) (10cm)	160	-
7) (20 cm)	-	-
8) (20 cm)	-	20 + 160
9) (20 cm)	80	20 + 160
10) (20cm)	80	-
11) (20cm)	160	20 + 160
12) (20cm)	160	-

**FIGURA 3.1** Matéria seca de raízes de diferentes tamanhos de estacas de *Cissus sicyoides*, aos 45 dias, submetidas a diferentes concentrações de AIB, na presença ou não de sacarose e ácido bórico.



**FIGURA 3.2** Sistema radicular de estacas com 20 cm (acima) e 10 cm (abaixo) de comprimento, de *Cissus sicyoides*, aos 45 dias, submetidas a diferentes concentrações de AIB na presença ou não de sacarose e ácido bórico.

### 3.5.2 Propagação *in vitro* *C. sicyoides*.

#### 3.5.2.1 Estabelecimento de *C. sicyoides*, *in vitro*.

As plântulas estabelecidas *in vitro*, a partir da cultura nodal, não tiveram problemas de oxidação ou contaminação. Estas apresentaram um hábito de crescimento com dominância apical e não houve a presença de múltiplas brotações em forma de roseta.

Na Figura 3.3 observa-se que as plântulas controle tiveram um sistema radicular bem desenvolvido, fato que sugere elevada concentração endógena de auxina em relação as citocininas, nesta espécie.

A partir das Figuras 3.4 e 3.5, verifica-se que há a necessidade do uso de reguladores de crescimento para esta espécie, uma vez que as médias obtidas no tratamento controle são inferiores às dos outros tratamentos, para número de gemas e altura.

O tratamento que proporcionou um maior número de gemas (4,0), altura (6,5 cm) e número de raízes (4,7) foi o que continha 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina acrescido de 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA (Figuras 3.4 e 3.5). A diferença no desenvolvimento das plântulas, nos diferentes tratamentos, pode ser visualizada na Figura 3.6.

A cultura foi estabelecida *in vitro* a partir da utilização de nós (contendo uma gema) como explante. Moore (1979) afirma que as enzimas responsáveis pela conversão do triptofano em AIA ocorrem geralmente na planta toda, mas especialmente em regiões de intensa atividade metabólica, como meristemas (apical ou lateral), folhas jovens e ápices radiculares. Este mesmo autor verificou que existe uma correlação inversa entre atividade enzimática (AIA-oxidase) e conteúdo de auxinas (em plântulas de ervilha), uma vez que a atividade da AIA-oxidase é relativamente baixa em regiões com alto

conteúdo de AIA, como as regiões meristemáticas. Tendo em vista que o transporte deste hormônio (que foi produzido em quantidade relativamente alta no meristema do explante) ocorre polarmente, predominantemente, do ápice para a base, este em pequenas concentrações (em torno de  $10^{-10}\text{M}$ ) é responsável pelo início do enraizamento, a partir da elongação celular dos primórdios radiculares.

Com exceção dos explantes mantidos em meio de cultura sem a adição de regulador de crescimento (controle), todos os demais apresentaram calos em todo o explante, durante aproximadamente 30 dias, e a partir daí é que houve o desenvolvimento dos mesmos, com posterior emissão de raiz e formação de brotos. Isso representa uma grande desvantagem para o desenvolvimento das brotações, uma vez que o metabolismo do explante passa aproximadamente 50% do período necessário para o estabelecimento, gastando toda energia produzida na formação de calos, e só depois é que ocorre a formação e crescimento das brotações. Essa proliferação celular pode ter ocorrido em função de um desbalanço hormonal entre o conteúdo endógeno no explante e a concentração de regulador de crescimento do meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Becker (1997), que utilizou a citocinina TDZ em *Phyllanthus niruri* e observou também a formação de calos em toda a base do explante. Esta mesma autora afirmou que a citocinina acrescida ao meio MS, que é muito rico em macro e micronutrientes, foram os responsáveis pela proliferação celular.

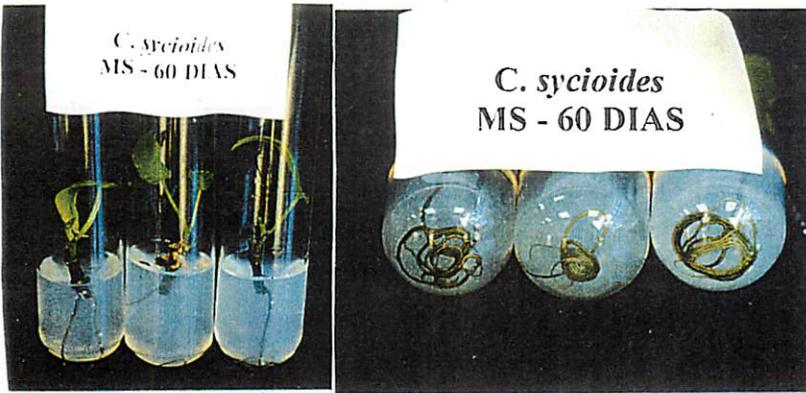


FIGURA 3.3 Plântulas de *Cissus sicyoides* estabelecidas, aos 60 dias, em meio MS sem a adição de regulador de crescimento .

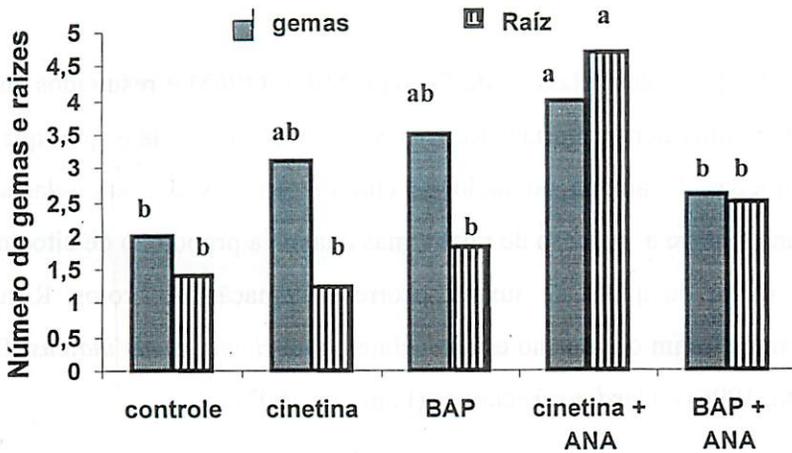
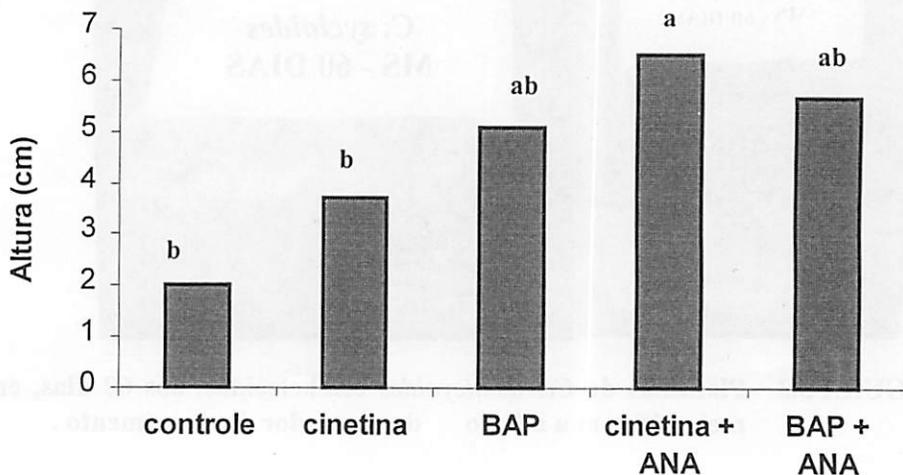


FIGURA 3.4 Número médio de gemas e raízes de plântulas de *Cissus sicyoides*, aos 60 dias, submetidas a diferentes concentrações de BAP, cinetina e ANA.



**FIGURA 3.5** Altura média de plântulas de *Cissus sicyoides*, aos 60 dias, submetidas a diferentes concentrações de BAP, cinetina e ANA.

O experimento clássico de Skoog e Miller (1965) e resultados análogos também citados por Krikorian, Kelly e Smith (1988), revelam que, quando as concentrações de auxina no meio de cultura são elevadas em relação à de citocinina, ocorre a indução de raízes, mas quando a proporção de citocinina no meio é maior do que a de auxina, ocorre a formação de brotos. Resultados semelhantes foram obtidos no estabelecimento de *Hemidesmus indicus* (Patnaik e Debata, 1996) e *Cordia verbenacea* (Lameira, 1997).



**FIGURA 3.6.** Plântulas de *Cissus sicyoides* estabelecidas, aos 60 dias, e mantidas em meio de cultura contendo cinetina, BAP, cinetina + ANA e BAP + ANA.

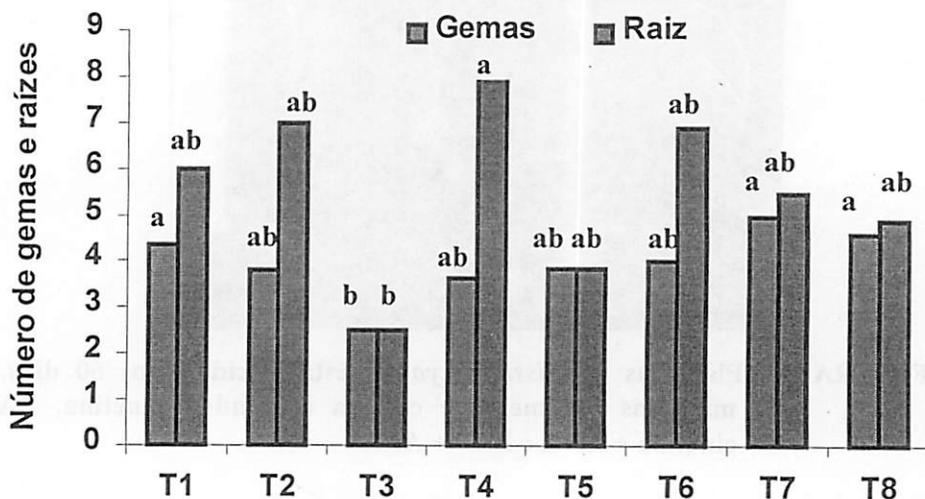
### 3.5.2.2 *Multiplicação in vitro de Cissus sicyoides.*

O desenvolvimento das plântulas, repicadas e transferidas para meio de multiplicação, seguiu o mesmo hábito de crescimento, com dominância apical, das plântulas estabelecidas no experimento anterior.

Nas Figuras 3.7 e 3.8 são apresentados os valores médios obtidos a partir das características avaliadas e os respectivos coeficientes de variação.

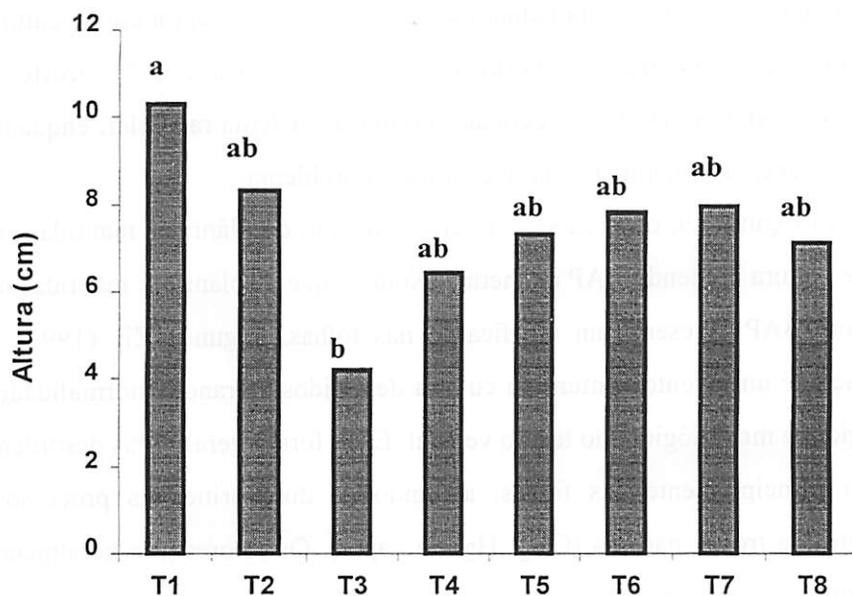
Observando-se a característica número de gemas (Figura 3.7), os tratamentos com as maiores concentrações de cinetina obtiveram as maiores médias, com exceção do tratamento 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP + 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA. Este mesmo tratamento apresentou a maior média de altura (cm) (apesar de estatisticamente não haver diferenças significativas), proporcionando maiores internódios nas plântulas mantidas nestes tratamentos, quando comparados aos

que continham cinetina, os quais apresentaram um maior número de gemas, porém com menor altura (Figura 3.8).



	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
BAP μM	2,22	2,22	4,44	4,44	-	-	-	-
ANA μM	2,7	5,4	2,7	5,4	2,7	5,4	2,7	5,4
CIN. μM	-	-	-	-	2,32	2,32	4,64	4,64

**FIGURA 3.7** Efeito de diferentes concentrações de BAP, ANA e Cinetina:, no número médio de gemas e raízes de plântulas de *C. sicyoides*, aos 60 dias, obtidas a partir de cultura nodal (cv = 9.93%).



	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
BAP μM	2,22	2,22	4,44	4,44	-	-	-	-
ANA μM	2,7	5,4	2,7	5,4	2,7	5,4	2,7	5,4
CIN. μM	-	-	-	-	2,32	2,32	4,64	4,64

**FIGURA 3.8.** Efeito de diferentes concentrações de BAP, ANA e Cinetina na altura média de plântulas de *C. sicyoides*, aos 60 dias, obtidas a partir de cultura nodal (cv=40.24%).

Quando a comparação entre os tratamentos refere-se ao número de raízes, verifica-se que o tratamento que apresentou maior média foi na concentração de 4,44 uM de BAP e 5,4 uM de ANA (Figura 3.7). Entretanto, este diferiu estatisticamente apenas do tratamento com 4,44 uM de BAP e 2,7 uM de ANA, demonstrando que a adição de uma maior quantidade de ANA no meio eliminou o efeito inibidor do BAP. Na Figura 3.10, observa-se o

desenvolvimento do sistema radicular de plântulas mantidas em meio de cultura contendo BAP e cinetina, onde verifica-se que na presença de BAP ocorreu a formação de uma grande massa celular ao redor do sistema radicular, enquanto que na presença de cinetina não houve o mesmo problema.

Na Figura 3.9, observa-se o desenvolvimento de plântulas mantidas em meio de cultura contendo BAP e cinetina. Nota-se que as plântulas mantidas no meio com BAP apresentaram vitrificação nas folhas. Segundo Ziv (1991), a vitrificação é um evento comum na cultura de tecidos, gerando anormalidades fisiológicas e morfológicas no tecido vegetal. E, de forma geral, estas desordens ocorrem principalmente nas folhas, afetando os dois principais processos: fotossíntese e trocas gasosas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e vapor). Os fatores que geralmente provocam estas anormalidades são: elevada umidade, excesso de fatores nutricionais (mineral e carboidratos), elevados níveis de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz. As plantas quando estão vitrificadas apresentam um aspecto de hiperhidricidade dos tecidos e não estão aptas a serem aclimatadas. Tal ocorrência só foi verificada nos tratamentos com BAP, provavelmente por esta citocinina ser mais ativa do que a cinetina (Gray e Benton, 1991).

No presente estudo, verificou-se uma influência na multiplicação desta espécie, não somente da concentração, mas também do tipo de citocinina. Estes resultados contrastam com os obtidos por Gray e Benton (1991), quando foram testados BAP, TDZ e cinetina, sendo esta última a menos efetiva, pois proporcionou um menor desenvolvimento das plântulas.

Semelhante aos resultados obtidos para o estabelecimento desta espécie, o melhor desenvolvimento das plântulas mantidas no meio de multiplicação ocorreu no meio contendo 2,7  $\mu\text{M}$  de ANA + 4,64  $\mu\text{M}$  de cinetina.



FIGURA 3.9. Aspecto de plântulas de *Cissus sicyoides*, aos 60 dias, na presença dos tratamentos com BAP (esquerda) e cinetina (direita).



**FIGURA 3.10** Sistema radicular de plântulas de *Cissus sicyoides*, aos 60 dias, mantidas em meio de cultura com BAP (esquerda) e cinetina (direita).

### 3.6. CONCLUSÕES

Para a propagação *in vivo* desta espécie, não houve diferenças entre o uso de estacas com 10 e 20 cm, desde que seja utilizada a concentração de 160 mg/l de AIB.

No estabelecimento e multiplicação da espécie *Cissus sicyoides in vitro*, o uso de reguladores de crescimento se faz necessário.

O regulador de crescimento cinetina mostrou ser mais efetivo na indução de brotações do que o BAP.

A melhor combinação de reguladores de crescimento foi a de 2.7  $\mu\text{M}$  de ANA + 4.64  $\mu\text{M}$  de cinetina, para a formação de plântulas de *C. sicyoides*.

### 3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKER, L. **Propagação Vegetativa *In vivo* E *In vitro*, Indução De Calos, Nutrição, Extração E Quantificação De Alcalóides Nas Espécies *Phyllanthus Niruri* L. E *Phyllanthus Corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-Pedras).** Dissertação.UFLA.Lavras, 1997. P.
- DIXON, R.A. **Plant Cell Culture – A practical approach**, IRL Press, 1985, Oxford, 236p.
- EPSTEIN, E. e LAVEE, S. Conversion of AIB to AIA by cuttings of grapevine and olive. **Plant Physiology**, 72 supl. 116.1983.
- HOSTALÁCIO, S.; SOARES, A.R.; COELHO, J.P. Enraizamento de estacas de azaléia (*Rhododendron spp.*), três Marias (*Bougainvillea spectabilis*) e mimo-de-vênus (*Hibiscus rosa-sinensis*) sob influência de “ANA” e “AIB”. **Ci. Prát.**, 1 (1): p. 30-35, 1977, Lavras.
- GRAY, D.J. e BENTON, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, tissue and organ culture**, 27:1, october, 1991, p. 7-14.
- JANICK, J. Mecanismos da propagação. In: \_\_\_\_\_. **A ciência da Horticultura**. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1966.485pb.
- JARVIS, B.C. Auxin and Boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings.**The New Phytologist**. 1983, vol. 95, p. 509-518.
- KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen.** Dissertação. ESALQ. Piracicaba. 1996. 96p.

- KERSTEN, E. e FACHINELLO, J.C. Efeito de ácido indolbutírico (AIB) na percentagem de estacas herbáceas enraizadas de figueira (*Ficus carica* L.), cultivar Roxo de Valinhos em condição de nebulização. *Agros*, 16 (34): p. 5-10, 1981.
- KERSTEN, E. **Efeito do boro, zinco e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de dois cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*, Lindl.)**. Tese ESALQ, Piracicaba, 1990, 109p.
- KRIKORIAN, A.D.; KELLY, K. e SMITH, L. **Hormones in tissue culture**. In: Devies, P. J. *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publishers. 1988. 681p.
- KYTE, L. e KLEYN, J. **Plants from test tubes – Introduction to Micropropagation**, 3ed, Timber Press. Oregon-USA. 1996. 239p.
- 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.)**. Tese. UFLA. Lavras, 1997.
- LOVELL, P.H.; WHITE, J. **Anatomical changes during adventitious root formation**. In: JACKSON, M.B. *New root formation in plants and cuttings*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. P. 111-140.
- MOORE, T. C. **Biochemistry and Physiology of Plant Hormones**. Springer-Verlag. New York, 1979, 274p.
- PASQUALETTO, A. **Influência de Reguladores de Crescimento e da Sacarose no Enraizamento de Estacas de soja (*Glicine max* (L.) Merrill)**. Tese. UFV-Viçosa. 1995. 93p.
- PATNAIK, J. e DEBATA, B. K. **Micropropagation Of Hemidesmus Indicus (L) R Br Through Axillary Bud. Culture. Plant Cell Reports**. 15(6):427-430, 1996 Feb.
- PIERIK, R.L.M. ***In vitro* Culture of Higher Plants**. Martinus Nijhoff publishers. Boston. p220-202. 1987.

- POGGIANI, F e SUITER FILHO, W. **Importância da nebulização intermitente e o efeito do tratamento hormonal na formação de raízes em estacas de eucalipto.** IPEF, (8): 119-29, 1974.
- SALISBURY E ROSS, f. e ROSS, C. W. **Plant Physiology.** Califórnia: Wadsworth, 1992.682p.
- SCOTT, T. K. **Hormonal Regulation of Development II – the function of hormones from the level of the cell to the whole plant,** vol 10, New York, 1984.
- SKOOG, F.; e MILLER, C. O. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*.** In: Molecular and celular aspects of development, bell, E., pp. 481-494. Harper & Row, New York, 1965.
- STREET, H.E. **Plant Tissue and Cell Culture.** Califórnia, Blackwell Scientific Publication, 1977.
- TAIZ, L e ZAIGER, E. **Plant Physiology.** Los Angeles, The benjamim/Cummings, 1991. 559p.
- ZIV, M. **Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants.** In: Degergh, P.C. & Zimmerman, R.H. **Micropropagation – Technology and Application.** Kluwer Academic Publishers. London, 1991,

## CAPÍTULO IV

### NITROGÊNIO E FÓSFORO NA PRODUÇÃO VEGETAL E NA INDUÇÃO DE MUCILAGEM EM PLANTAS DE *C. sicyoides*

#### RESUMO

Plantas com 45 dias e enraizadas pelo método de estaquia foram plantadas em vasos com capacidade para 5 kg de solo, contendo como substrato um Cambissolo Álico, com textura média, do município de Nazareno—MG. Foi realizada uma adubação básica de macro e micronutrientes, variando apenas as concentrações de nitrogênio e fósforo. O experimento consistiu de 5 doses de N (0; 40; 80; 160 e 200 mg.N/kg de solo) e duas doses de P (50 e 150 mg.P/kg de solo), com 8 repetições. O delineamento foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 5 x 2. O experimento foi conduzido em casa de vegetação por 90 dias, sendo avaliados: peso seco de folha, caule e raiz e análises químicas e fitoquímicas da parte aérea. Houve uma interação entre as concentrações de nitrogênio e fósforo para a produção de matéria seca foliar, tendo a concentração de nitrogênio proporcionado um máximo ganho de biomassa na dose de 200 mg.N/kg de solo com 150 mg.P/kg solo. A produção de mucilagem respondeu positivamente ao aumento nas concentrações de nitrogênio e fósforo, atingindo o maior conteúdo nas mesmas concentrações que proporcionaram o maior ganho de biomassa.

#### 4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os princípios ativos das plantas medicinais podem ser produto do metabolismo primário ou secundário das plantas. Portanto, tanto a qualidade quanto o teor dos princípios ativos são afetados pelas condições ambientais

como fertilidade do solo, pH, umidade, temperatura, qualidade da luz, dentre outros fatores (Becker, 1997).

Assim, estudos não somente na área farmacológica e química, mas também de outras áreas como a fisiologia e fitotecnia se fazem necessários, pois é a partir desses conhecimentos que se pode maximizar a produção de metabólitos de interesse farmacológico.

#### **4.1.1 Nutrição x crescimento**

Vários fatores são requeridos para o crescimento das plantas como luz, CO<sub>2</sub>, água e nutrientes minerais. Aumentando o suprimento de um destes fatores, ocorre o aumento da produção até um certo limite, a partir do qual ocorre uma diminuição. Mitscherlich (1958) citado por Marschner (1995), formulou matematicamente, para nutrientes minerais, uma curva de resposta da produção, na qual esta é assintótica, ou seja, quando o suprimento de um nutriente mineral (ou qualquer fator de crescimento) é aumentado, outro nutriente mineral ou fator de crescimento será limitante (Marschner, 1995). Esta curva de produção vegetal tem regiões bem definidas: há uma região onde a produção aumenta com o suprimento do nutriente, mas como o suprimento aumenta, a produção aumentará até chegar a um limite máximo que é o platô da curva, região onde é relativamente insensível ao fornecimento do nutriente e, a partir deste ponto, ocorre um decréscimo da produção devido ao contínuo aumento no fornecimento do nutriente. Portanto, esta curva é dividida em três regiões distintas: deficiente, adequada e tóxica (Moorby e Besford, 1983). Na região do platô, também denominada de adequada, existe uma concentração ótima do nutriente onde é possível a obtenção da produção máxima.

Os nutrientes minerais podem influenciar no crescimento das plantas indiretamente, via seus efeitos no suprimento de assimilados e de substâncias de crescimento. Para um maior entendimento do efeito dos nutrientes no crescimento, deve-se levar em consideração o seu efeito na divisão e expansão celular.

A influência dos nutrientes na fotossíntese pode ocorrer em várias vias, como o envolvimento direto do fósforo na cadeia de transporte de elétrons nos tilacóides. Já o nitrogênio pode ser utilizado na formação dos cloroplastos, síntese protéica e síntese de clorofila. Síntese de amido nos cloroplastos e transporte de açúcares através do envelope cloroplastídico para o citoplasma são controlados diretamente pelo fósforo inorgânico (Moorby & Besford, 1983).

O nitrogênio orgânico está presente em muitos compostos essenciais, tais como proteínas, ácidos nucléicos e aminoácidos. Outros importantes componentes formados por nitrogênio são as purinas, que fazem parte da estrutura das enzimas ATP e NAD, e pelas pirimidinas, formando as bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos. Os reguladores de crescimento (auxinas e citocininas), bem como os alcalóides e outros compostos farmacologicamente ativos, também são formados por nitrogênio (Glass, 1989).

Um dos aspectos que ajudam bastante no efeito do nitrogênio, na forma de nitrato, a aumentar o rendimento de matéria seca, é sua influência na atividade hormonal, particularmente na formação de citocininas de raiz que é estimulada pela presença de  $\text{NO}_3^-$  (Darrall e Wareing, 1981). A adição de nitrato no solo resulta no aumento da atividade e na produção da enzima nitrato redutase nas raízes e parte aérea (Somers et al., 1983). No entanto, para que ocorra tanto a absorção do nutriente como a produção da proteína, a planta precisa produzir mais ATP, uma vez que o passo inicial da síntese protéica é a ativação dos aminoácidos na presença de ATP (Costa, 1995).

O fósforo está presente nas plantas, principalmente na forma de ortofosfato, sendo que a sua principal função é na tradução de energia. Durante o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e cloroplasto, a energia livre é associada com a oxidação dos componentes da cadeia, sendo convertida na forma de ATP (Glass, 1989).

Desta maneira, o potássio, que une os RNAs aos ribossomos, nitrogênio e fósforo são necessários para que ocorra a síntese protéica e a ativação de uma série de enzimas e, conseqüentemente, a produção de biomassa vegetal (Marschner, 1995).

#### **4.1.2 Interação entre nitrogênio e fósforo**

As interações entre nutrientes podem ocorrer no solo, na planta ou em ambos, ocorrendo quando o suprimento de um nutriente afeta a absorção, distribuição ou função de outro nutriente, induzindo deficiência ou toxidez, podendo modificar o crescimento da planta. Estas interações podem ser medidas ao se considerar a concentração e o conteúdo dos nutrientes na planta (Robson e Pitman, 1983) e dependem do seu estado fisiológico.

A relação entre N e P em plantas é bem conhecida, havendo correlação positiva para uma grande variedade de espécies em diferentes condições ecológicas (Prevot e Ollagnier, 1991).

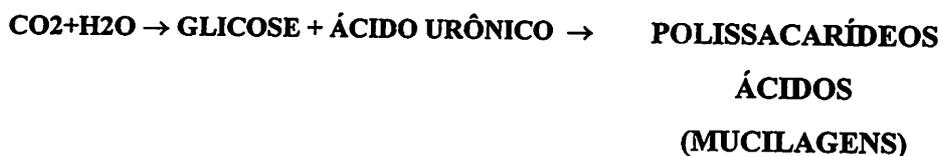
A produção de plantas não leguminosas aumenta pela aplicação de fertilizantes nitrogenados, geralmente resultando em aumentos na demanda por nutrientes inorgânicos, como o P. O efeito do N sobre a absorção de P em tais casos pode ser melhor explicado pela estimulação fisiológica, ocorrida na planta como conseqüência do maior suprimento de N (Lima Filho, 1995). Um modo de ação preciso não está claramente definido, mas a associação de  $\text{NH}_4^+$  com

fósforo é necessária para que aconteça o fenômeno. Ocorre um efeito sinérgico na colocação conjunta de N e P, resultando numa maior massa radicular em cultura de beterraba (Miller e Vij, 1962).

#### 4.1.3 Mucilagem

As mucilagens que possuem atividade medicinal são polissacarídeos complexos constituídos por unidades de açúcares e ácido urônico, insolúveis em álcool, mas que em presença de água dissolvem-se ou incham-se, tornando-se viscosos (Costa, 1978).

Essas substâncias são produtos do metabolismo primário (Esquema 1) e geralmente se formam a partir da membrana celular ou se depositam sobre esta, formando camadas sucessivas (Silva, 1995).



#### ESQUEMA 1: Esquema da formação das mucilagens

As mucilagens podem ser divididas, de acordo com suas características químicas, em três grupos (Jacobs, 1958):

a) **polissacarídeos neutros:** contendo um ou mais tipos de unidades de açúcares interligados glicosidicamente, formando substâncias de alto peso molecular, são as mucilagens de estrutura mais simples, geralmente constituídas por cadeias pouco ramificadas. De acordo com a natureza de seus constituintes, são classificadas em mananas (salepo), glucomananas (aloes), galactomananas (soja, alfarroba) e arabinomananas (lírio).

**b) polissacarídeos contendo unidades de ácido urônico:** usualmente, D-galacturônico ou um metil éter derivado de ácido urônico, bem como unidades de outros açúcares, sendo, portanto, de natureza heterogênea em constituição, além de possuírem uma estrutura bastante complexa ocasionada pelas inúmeras ramificações (Jones, 1953).

**C) mucilagens:** que ocorrem em algas e consistem, principalmente, de sais de ésteres sulfato, constituindo-se em derivados de alto peso molecular (Whistler, 1959).

Do que se conhece até hoje, sabe-se que as gomas de plantas são sais neutros de polissacarídeos ácidos complexos. Atribui-se às gomas e mucilagens a capacidade de atuar como substâncias de reserva e como as principais substâncias de armazenamento de água, sobretudo nas plantas que vivem em regiões quentes e áridas, onde, na época de seca, a cederiam lentamente evitando, assim, uma desidratação externa. Para confirmar tal hipótese, cita-se o caso da *Acacia vereck*, que vive habitualmente em terrenos frescos e úmidos e não produz goma em quantidade significativa. Já as Acácias das regiões arenosas e desérticas, que suportam insolações violentas, produzem uma quantidade elevada de goma, de até 1 kg ou mais por árvore (Sierakowski, 1982).

A pronunciada capacidade de reter água dos exsudados gomosos, tem conduzido à sugestão de que eles funcionam como uma membrana para isolar a infecção ou a área danificada da planta (Costa, 1978). E, como membrana, poderia prevenir tanto o aumento da infecção como a perda de água no sítio danificado.

As mucilagens são encontradas em raízes, flores, sementes (tegumentos e endosperma), folhas, caules e bulbos. As gomas encontram-se em diferentes tecidos de plantas superiores, principalmente nos caules, no lenho jovem de

diversas prumáceas, na casca e no líber, como se observa nas *Acácias*, bem como na região medular de numerosas espécies do gênero *Astragalus* e, algumas vezes, no mesocarpo. Quando há rompimento dos tecidos por ferimento, ocorre um escoamento de exsudato, formando aglomerados translúcidos ou esbranquiçados (Smith & Montgomery, 1959).

Além das funções citadas, as mucilagens apresentam propriedades antiinflamatórias, laxativas, antidiarréicas, antidiabéticas (Tomoda et al., 1987), entre outras. Na indústria é utilizada na confecção de geléias e doces diversos e, na indústria farmacêutica, para correção do gosto de outros fármacos, estabilidade de emulsão e pomadas.

Não há, na literatura, trabalhos sobre a adubação de *Cissus sicyoides* e nem a sua correlação com a síntese de mucilagem.

## **4.2 OBJETIVO**

O objetivo do trabalho foi verificar a influência da adubação com nitrogênio e fósforo na produção vegetal e síntese de mucilagem, em *Cissus sicyoides*.

## **4.3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.3.1 Substrato**

O substrato utilizado foi um solo proveniente do município de Nazareno-MG, cuja classificação é Cambissolo Álico com textura média, fase campo cerrado, relevo ondulado, substrato gnaisse-granítico, escolhido devido à sua baixa disponibilidade de nutrientes. Foi coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, seco ao ar e peneirado em malha de 5 mm de abertura.

A análise química do solo (quadro 4.1 e 4.2), realizada antes e depois da indução dos tratamentos, seguiu a metodologia de Vettori (1969) com modificações da EMBRAPA (1979) e Camargo et al (1986).

Posteriormente, o substrato foi colocado em vasos com capacidade para 5 kg de solo, que não continham furos na sua base.

### 4.3.2 Tratamentos

Após análise química completa do solo, foi realizada a calagem, com o intuito de elevar o pH do solo para 6.0, onde adicionou-se as fontes  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{MgCO}_3$  na proporção de 4:1, na forma de sais p.a., sendo as quantidades definidas pela curva de incubação.

A fertilização básica de cada tratamento consistiu de: 150 mg.K; 45 mg.S; 1.5 mg.Cu; 2.0mg.Fe; 5.0 mg.Zn; 3.6 mg.Mn; 0.8 mg.B; 0.15 mg.Mo por kg de solo; A dose 50 mg.P/kg de solo foi aplicada em metade dos tratamentos e a dose 150 mg.P/kg na outra metade. A adubação nitrogenada foi realizada em cinco aplicações, sendo a primeira (40mg.N/kg) realizada junto com a adubação básica em todos os tratamentos, com exceção dos controles, e as demais realizadas quinzenalmente, quando foram adicionados 40mg.N/kg, por aplicação, proporcionando, ao final, as doses desejadas.

Os nutrientes foram aplicados em cada vaso na forma de soluções preparadas a partir de sais p.a., em cada vaso, utilizando-se as seguintes fontes:  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; Fe-EDTA e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

**QUADRO 4.1 Análise química e textural do substrato antes da aplicação dos tratamentos.**

<b>Características analisadas</b>	<b>Unidades</b>	<b>Valores</b>
pH em água	-	4,9
P	mg/dm <sup>3</sup>	1,0
K	mg/dm <sup>3</sup>	38,0
Ca	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,6
Mg	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,2
Al	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	0,6
H+Al	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>	4,0
.m	%	41,0
Matéria orgânica	g/kg	16,0
Areia	g/kg	320,0
Limo	g/kg	570,0
Argila	g/kg	110,0
B	mg/dm <sup>3</sup>	0,3
Zn	mg/dm <sup>3</sup>	0,1
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	0,2
Fe	mg/dm <sup>3</sup>	40,0
Mn	mg/dm <sup>3</sup>	2,5
S	mg/dm <sup>3</sup>	5,5

#### **4.3.2.1. Incubação**

Após a correção do solo e aplicação dos tratamentos, realizada para cada vaso, adicionou-se água deionizada para atingir 60% do volume total de poros

dos vasos. Os mesmos permaneceram cobertos para evitar contaminações do ambiente durante esse período.

#### 4.3.2.2 Pós-incubação

Após os quinze dias de incubação, foram retiradas amostras de solo de cada vaso, formando-se uma amostra composta para cada tratamento, através da qual realizou-se uma análise de fertilidade (Quadro 4.2).

**QUADRO 4.2 Análise química do substrato após a indução dos tratamentos.**

Características	TRATAMENTOS									
	50 mg/dm <sup>3</sup> P					150 mg/dm <sup>3</sup> P				
	0	40	80	160	200	0	40	80	160	200
PH-água	5,6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,6	5,4	5,5	5,5	5,4
*P (mg/dm <sup>3</sup> )	6,0	7	8	8	8	33	36	36	34	35
K (mg/dm <sup>3</sup> )	125	133	133	136	136	129	129	128	126	129
Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1,5	1,9	1,8	1,7	1,5	1,7	1,6	2,0	1,7	1,8
Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1,1	0,7	1,0	1,4	1,2	1,4	1,2	1,9	1,3	1,2
Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H+Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,6	2,3
m (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*extrator: Mehlich I

#### 4.3.3 Preparo das mudas

As mudas foram preparadas a partir de estacas contendo duas gemas com aproximadamente 20 cm, obtidas a partir de plantas matrizes, oriundas do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

Estas foram colocadas para enraizar em sacos plásticos de polietileno contendo areia lavada como substrato e permaneceram nestas condições por 20 dias.

#### **4.3.4 Plantio**

Utilizou-se plantas com 20 dias, as quais possuíam sistema radicular completamente desenvolvido. Em cada vaso foram plantadas duas mudas contendo três pares de folhas.

Durante a condução do experimento, a água evapotranspirada foi repostada com água deionizada para atingir 60% do volume total de poros.

#### **4.3.5 Delineamento experimental:**

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), arranjado num fatorial de 5 x 2, sendo 5 doses de N (0; 40; 80; 160 e 200 mg.N/kg de solo) e 2 doses de P (50 e 150 mg/kg de solo), com 8 repetições. Destas, quatro repetições foram utilizadas para as determinações de peso seco e análise química e quatro para a determinação dos teores de mucilagem.

#### **4.3.6 Características Avaliadas**

A duração do experimento foi de 90 dias, quando foram realizadas as seguintes avaliações:

- a) peso da matéria seca de folha, caule e raiz;
- b) teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn, Fe, Mn e Cu na matéria seca do caule; folha e raiz;
- c) conteúdos de N, P, K, S, Ca e Mg na folha, caule e raiz.

Para a determinação do peso seco da parte aérea e raiz, procedeu-se da seguinte maneira: as plantas de cada tratamento foram cortadas rente ao solo e separadas em caule e folha. Posteriormente, estas partes foram colocados em sacos de papel para secar em estufa a 60°C. As raízes foram retiradas por peneiramento e catação manual, lavadas e secas a 60°C, para determinação do peso seco.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Ciências dos Solos–DCS/UFLA.

#### **4.3.7 Análise estatística**

Os dados e características avaliados foram submetidos ao Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados de Daniel F. Ferreira – UFLA/DEX.

#### **4.3.8 Extração e quantificação de mucilagens:**

Esta fase do trabalho foi realizada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, segundo metodologia de Sierakowski (1982).

##### **4.3.8.1 Preparo do pó acetônico:**

Porções de 100 g da parte aérea de plantas de *Cissus sicyoides*, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo, foram primeiramente mergulhadas em etanol por 72 horas, secas ao ar, submersas em acetona por 48 horas, com posterior exposição ao ar para secagem. A seguir, o material foi triturado em moinho tipo Willey, utilizando-se peneira de 60 mesh.

O pó acetônico obtido foi submetido ao processo de extração em aparelho tipo Soxhlet, utilizando-se uma mistura de benzeno:etanol (2:1 v/v), por 48 horas. O extrato resultante foi descartado.

#### **4.3.8.2 Extração da mucilagem:**

O pó residual do tratamento com benzeno:etanol foi submetido ao processo de extração com água (100 ml de água/5g de amostra) a 85°C, com agitação, durante 24 horas e o sobrenadante viscoso isolado por centrifugação. O resíduo foi novamente submetido a duas extrações, como anteriormente descrito, e os sobrenadantes foram reunidos. Em seguida, adicionou-se etanol (3 volumes) para a obtenção de um precipitado (após 24 horas), o qual foi separado por centrifugação (10.000 g/ 40 min), e o sobrenadante etanólico foi descartado. O precipitado contendo o polissacarídeo foi lavado com acetona (3 vezes) e seco a vácuo. Na seqüência, realizou-se a pesagem do polissacarídeo seco.

## **4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.4.1 Efeito do nitrogênio e fósforo na produção de biomassa de *C. sicyoides*.**

A adubação nitrogenada, em conjunto com a fosfatada, influenciou a produção de biomassa em plantas de *Cissus sicyoides*, como pode ser visualizado na Figura 4.1. Verifica-se uma coloração amarelada e um menor desenvolvimento nas plantas mantidas nos tratamentos com baixas concentrações de nitrogênio, quando comparadas com as dos demais

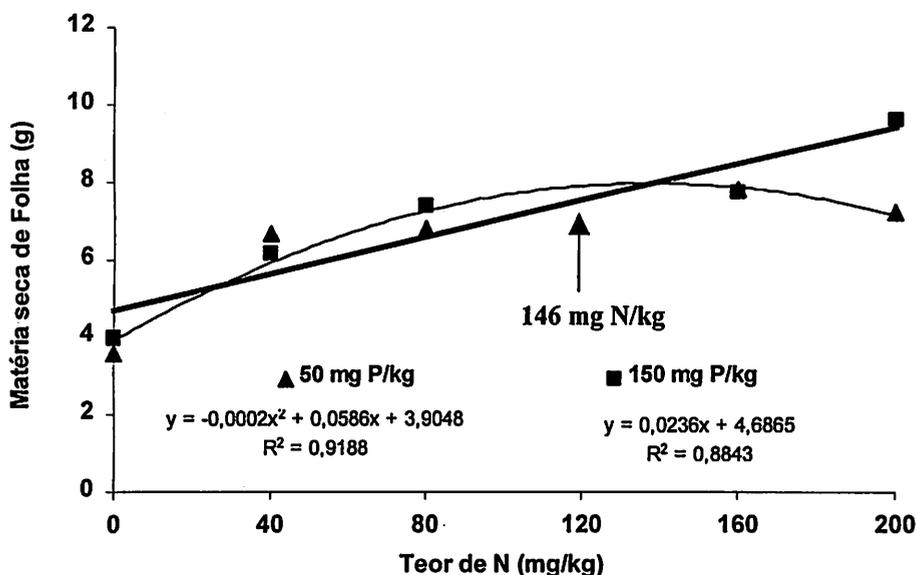
tratamentos, devido ao fato do nitrogênio fazer parte da estrutura da clorofila. Na ausência deste, não ocorre a formação do pigmento fotossintetizante em quantidade suficiente (Salisbury, 1992).



**FIGURA 4.1.** Plantas de *Cissus sicyoides*, aos 90 dias, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo. A esquerda, 50 mg.P/kg com 0 e 200 mg/kg de N, e à direita 150 mg.P/kg com 0 e 200 mg/kg de N.

A matéria seca de folhas foi escolhida para explicar a produção de biomassa, neste trabalho, por ser o órgão com maior atividade fotossintética na planta e porque permite representar o ganho de matéria seca na planta, como um todo.

O ganho de matéria seca foliar é apresentado na Figura 4.2., onde observa-se que houve uma interação (5% de significância) entre as doses de fósforo e nitrogênio na produção de matéria seca, ocorrendo resposta quadrática para as doses de nitrogênio na dose de 50 mg.P/kg e linear para a dose 150 mg.P/kg.



**FIGURA 4.2** Matéria seca foliar de plantas de *Cissus sicyoides*, em função da aplicação de nitrogênio e fósforo.

A partir das equações de regressão apresentadas na Figura 4.2, obtém-se os teores de nitrogênio no solo, que permitiram a máxima produção de matéria seca foliar: 146,5 mg de N/kg de solo para a dose de 50 mg de P/kg. Para 150 mg de P/kg não foi possível obter a dose de nitrogênio equivalente à máxima produção de matéria seca, uma vez que a resposta foi linear.

A maior produção de matéria seca ocorreu na dose de 150 mg de P/kg e 200 mg de N/kg. O nitrogênio é utilizado na síntese de proteínas e aminoácidos e, para a conclusão do processo, é necessário a presença de fósforo na forma de poder redutor e de nucleotídeos. Assim, esse aumento no ganho de matéria seca era previsível, uma vez que as proteínas sintetizadas irão fazer parte do metabolismo primário vegetal e metabolizar as reações de síntese de

fotoassimilados, lipídeos de parede e proteínas estruturais. Portanto, com o aumento na concentração de N, ocorreu a necessidade de elevar a concentração de fósforo para dar início aos processos de síntese. Na concentração de 50 mg de P/kg, o máximo ganho de matéria seca ocorreu na concentração de 146 mg de N/kg de solo, uma vez que a concentração de fósforo foi insuficiente para dar continuidade aos processos fisiológicos.

Becker (1997) e Lima Filho (1995) obtiveram um aumento no ganho de matéria seca total de plantas de *Phyllanthus niruri* e *Stevia rebaudiana*, respectivamente, com o aumento crescente nas doses de nitrogênio, onde a dose de nitrogênio que proporcionou o maior ganho de matéria seca da parte aérea foi de 79,89 mg N/kg e 74,2 mg de N/kg de solo, respectivamente.

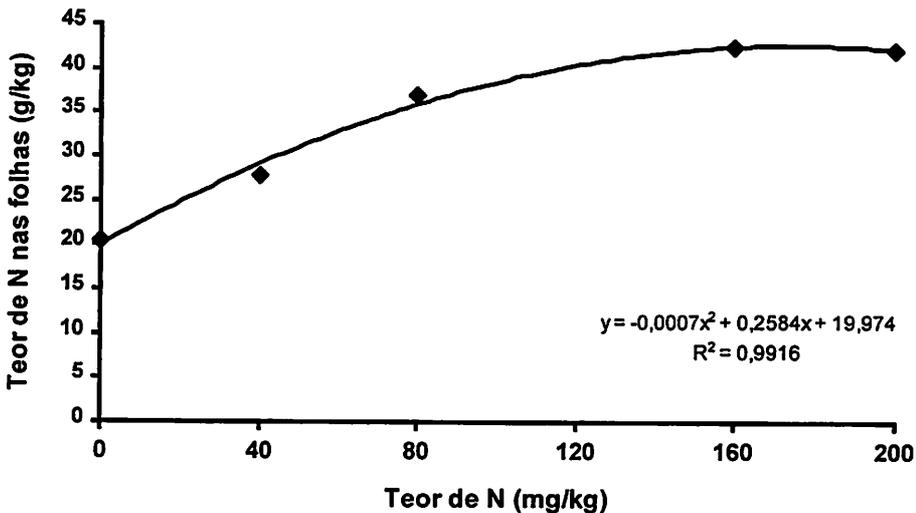
No Quadro 4.3 são apresentados os teores de macronutrientes presentes na matéria seca foliar, onde é possível verificar que a absorção de enxofre diminuiu à medida que a concentração de nitrogênio aumentou, para as duas doses de fósforo. Segundo Furtini Neto (1988), o mesmo ocorreu em espécies de eucalipto submetidas a diferentes concentrações de enxofre e isto pode ter ocorrido em função do efeito de diluição da planta, causado pela maior produção de matéria seca.

O teor de nitrogênio na matéria seca foliar é apresentado na Figura 4.3, onde observa-se não ter havido uma interação com as doses de fósforo, mas a medida que aumentou o fornecimento do nutriente, ocorreu um aumento da sua concentração nas plantas.

**QUADRO 4.3. Macronutrientes na matéria seca de folha de plantas de *Cissus sicyoides* submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.**

Doses		N	P	K**	S	Ca**	Mg
N	P						
.mg/kg		g.Kg <sup>-1</sup> MSF					
0	50	18,5	1,9	20,8	2,18	37,0	6,2
40	50	27,1	2,2	21,4	1,74	35,7	6,0
80	50	37,5	2,6	22,5	1,57	37,7	6,0
160	50	42,2	2,4	23,6	1,38	38,7	5,5
200	50	39,7	2,5	23,5	1,38	39,7	5,7
0	150	22,5	2,0	23,0	2,40	40,5	5,7
40	150	28,5	2,5	22,3	2,29	38,7	6,2
80	150	36,2	2,7	23,2	1,92	39,0	6,0
160	150	42,4	2,9	24,0	1,61	40,2	5,2
200	150	44,3	2,9	22,5	1,59	41,0	5,0

\*\* Interação significativa ao nível de 5% de significância entre nitrogênio e fósforo.



**FIGURA 4.3** Teores de nitrogênio na matéria seca foliar de plantas de *Cissus sicyoides*, aos 90 dias, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

**QUADRO 4.4.** Conteúdo de macronutriente na matéria seca de folhas de plantas de *Cissus sicyoides*, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

Doses (mg/kg)		N	P	K	S	Ca	Mg
N	P	mg/vaso					
0	50	66,7	6,8	75,1	7,84	133,2	22,4
40	50	181,7	14,5	142,6	11,54	237,7	39,9
80	50	253,9	17,7	152,7	10,67	255,7	40,6
160	50	330,6	19,1	184,3	10,80	302,5	42,7
200	50	286,0	17,8	169,7	9,96	286,2	41,3
0	150	90,1	8,0	91,3	9,49	161,1	22,8
40	150	173,3	15,2	136,9	14,03	237,1	38,2
80	150	267,0	20,1	171,0	14,12	287,6	44,2
160	150	322,6	22,5	184,9	12,34	309,3	40,2
200	150	425,5	27,9	216,0	15,37	395,6	48,2

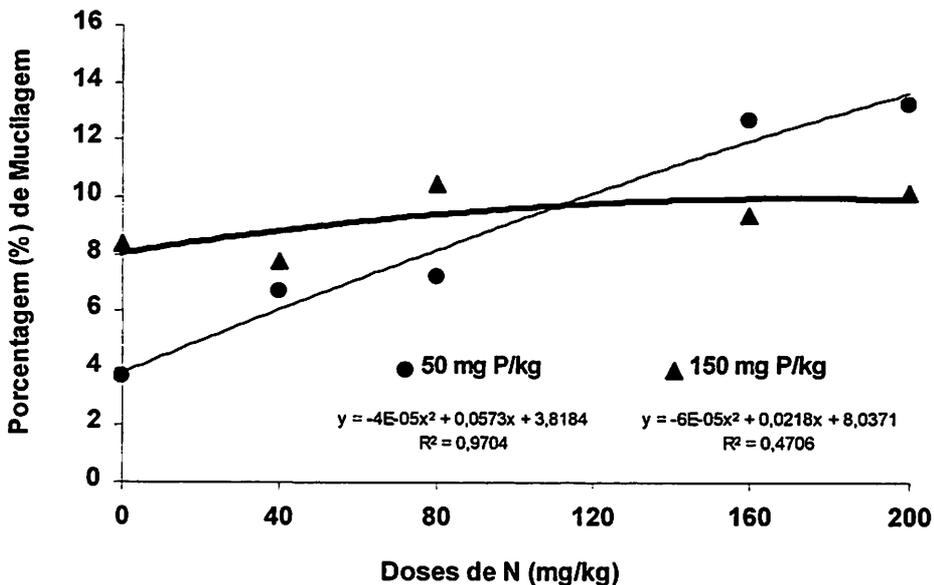
O conteúdo de nutrientes é utilizado para demonstrar o efeito de concentração ou diluição dos elementos nos tecidos das plantas em função da absorção dos nutrientes adicionados no solo e, conseqüentemente, da produção de matéria seca (Becker, 1997). O conteúdo dos macronutrientes presentes na matéria seca foliar é apresentado no Quadro 4.4, onde é possível verificar que o maior acúmulo de nitrogênio na dose 50 mg de P/kg ocorreu na concentração de 160 mg de N/kg e para a dose de 150 mg de P/kg o maior acúmulo ocorreu na concentração de 200 mg de N/kg.

#### 4.4.2 Teor de mucilagem na parte aérea de *C. sicyoides*.

Na Figura 4.4, é apresentada a produção de mucilagem em relação à matéria seca da parte aérea de plantas de *Cissus sicyoides*. Verificou-se o crescimento da porcentagem de mucilagem com o aumento nas doses de nitrogênio, sendo que a maior produção para a dose de 50 mg de P/kg de solo foi de 13,22% na dose de 200 mg/kg de nitrogênio e para a dose de 150 mg de P/kg de solo, a maior produção foi de 10,47% na dose de 80 mg/kg de nitrogênio.

Analisando a curva de fósforo na dose de 150 mg/kg, verifica-se um aumento crescente na porcentagem de mucilagem formada. Contudo, esta diminui nas doses acima de 160 mg/kg. Tal efeito não ocorreu para a dose de 50 mg/kg de fósforo.

Trabalhos de extração de mucilagem, realizados em outras oportunidades no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, apresentaram a produção de 1,09% de mucilagem em relação ao material seco (Ladeira\*, 1998) obtido de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, resultado muito inferior aos menores resultados do presente trabalho.



**FIGURA 4.4. Porcentagem (%) de mucilagem na parte aérea de plantas de *Cissus sicyoides*, aos 90 dias, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.**

Os resultados diferem dos dados encontrados na literatura, sendo que a porcentagem de mucilagem extraída das raízes de *Glossostemom bruguiri* diminuiu de 14,28; 12,9 para 11,27 %, à medida que aumentavam as doses de nitrogênio (0; 72 e 108 mg/kg) (El-Gengaihi et al., 1995).

As mucilagens produzidas nas raízes e sementes têm uma função de reserva ou proteção, pois acumulam-se sobre a parede celular de forma semelhante ao acúmulo de amido. Almetov e Trukhan (1988) afirmam que aumentos nas doses de NPK aumentam a produção de batata doce, mas diminuem o conteúdo de amido nas mesmas. Saghin (1989) relata que aumentos na concentração de nitrogênio e fósforo também diminuiram a matéria seca e o conteúdo de amido em batata. Isso se deve ao fato do fósforo, na forma de ortofosfato (Pi), ser o regulador no particionamento da triose fosfato formada no

ciclo de Calvin, entre a síntese de amido e a de sacarose. Altas concentrações de fósforo no citosol, direcionam a triose fosfato do cloroplasto para o citosol e ocorre a síntese de sacarose, e baixas concentrações de Pi no citosol permitem que a triose fosfato seja direcionada para a síntese de amido no próprio cloroplasto (Taiz e Zaiger, 1991). Então, o menor conteúdo de amido, nestes casos, pode ser decorrente de um maior ganho de matéria seca da parte aérea.

As mucilagens produzidas nos órgãos aéreos são os polissacarídeos presentes na estrutura da parede celular, portanto, qualquer fator que influencie na síntese e alongação da parede irá também influenciar numa maior produção de polissacarídeos.

A parede celular é um sistema altamente complexo e dinâmico, cuja composição e estrutura variam durante o crescimento e a diferenciação da célula em resposta a fatores do ambiente. As paredes primária e secundária diferem química e fisicamente, ambas constituídas por polissacarídeos, glicoproteínas, água e compostos fenólicos em diferentes proporções (Braga, 1994).

Os carboidratos, presentes na forma de polissacarídeos, são os componentes mais importantes da parede celular, representando 90% da mesma nos tecidos em crescimento, estando entre os mais complexos encontrados no reino vegetal, sendo constituídos basicamente por dez monossacarídeos: ramnose, frutose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose, ácido galacturônico, ácido glucurônico e apiose, que se unem através de diferentes tipos de ligações glicosídicas (Albersheim, 1975).

A partir dos dados de mucilagem extraída (da matéria seca) de plantas matrizes, no presente trabalho, foi possível determinar a composição química da mesma, onde foram encontrados: 6,48% de açúcar total, 1,67% de açúcar redutor, 6,67% de ácido urônico e 0,353% de proteínas solúveis (Ladeira\*, 1998). De acordo com Costa (1978) as mucilagens são polissacarídeos ácidos,

compostas por vários monossacarídeos ligados ao ácido urônico. Portanto, os polissacarídeos extraídos, no presente trabalho podem ser classificados como mucilagens.

**QUADRO 4.5** Conteúdo de mucilagem na parte aérea de plantas de *C. sicyoides*, aos 90 dias, submetidas a diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

	Doses de N (mg/kg)									
	0	40	80	160	200	0	40	80	160	200
	50 mg P/kg					150 mg P/kg				
<b>MSPA (g)</b>	12.1	17.85	13.6	16.80	14.2	16.07	17.62	18.97	16.77	21.35
<b>Mucilagem (%)</b>	3.71	6.69	7.20	12.6	13.2	8.35	7.7	10.47	9.34	10.11
<b>Conteúdo de mucilagem PA (g mucil./vaso)</b>	0.45	1.19	0.98	2.12	1.87	1.34	1.36	1.98	1.57	2.15

Analisando o Quadro 4.5, verifica-se que as maiores porcentagens de mucilagem ocorreram para os tratamentos em que houve os menores valores de matéria seca de parte aérea, ou seja nos tratamentos com 50 mg de P/kg nas maiores concentrações de nitrogênio. Estes resultados são devidos ao efeito de concentração nos tecidos da planta. Mas, quando é considerado o conteúdo de mucilagem (mg de mucilagem por vaso), verifica-se que o maior acúmulo deste polissacarídeo ocorreu nas maiores concentrações de nitrogênio, independente da concentração de fósforo. Quando se observa o conteúdo de mucilagem nas menores concentrações de nitrogênio, verifica-se que ocorreu um maior acúmulo na dose de 150 mg/kg de fósforo.

#### 4.5 CONCLUSÕES

A espécie *Cissus sicyoides* é responsiva à adubação nitrogenada e fosfatada, sendo justificada a sua recomendação visando uma maior produção de matéria seca e mucilagem.

Na dose de 50 mg P/kg de solo, a maior produção de biomassa ocorreu na dose de 146 mg N/kg, mas quando o fornecimento de fósforo foi de 150 mg/kg, não foi atingida a máxima produção de biomassa em função das doses de nitrogênio.

O nitrogênio influenciou na produção de mucilagem, sendo que o maior acúmulo deste polissacarídeo ácido ocorreu a 200 mg de N/kg de solo, na presença de 150 mg de P/kg de solo.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMETOV, N. S. e TRUKHAN, L.G. Effect of mineral fertilizer on yield and quality of potatoes in Mariayaka. *Agrokimiya*. v.3, p.45-46, 1988.
- BECKER, L. **Propagação Vegetativa In Vivo E In Vitro, Indução De Calos, Nutrição, Extração E Quantificação De Alcalóides Nas Espécies *Phyllanthus Niruri* L. E *Phyllanthus Corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-Pedras).** Dissertação.UFLA.Lavras, 1997. P.
- BRAGA, M.R. **Oligossacarinas indutores de fitoalexinas obtidas de paredes celulares de rubiáceas nativas.** TESE. USP-SP, 1994.
- BRETT, C. e WALDRON, K. **Topics in Plant Physiology – Physiology and biochemistry of plant cell walls,** 1983.



- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A. E VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas.** Campinas: IAC, 1986. 94p.
- CLARKE, Z.E.; ANDERSON, R.L.; STONE, B.A. **From and function of arabinogalactan and arabinogalactan-proteins.** *Phytochemistry*, v.18, P.521-540, 1979.
- COSTA, A.F. **Substâncias Poliurônicas.** In: *Farmacognosia.* Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1978. v.2, p. 84-125.
- COSTA, 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.** Dissertação, UFLA – Lavras, 1995, 61p.
- DARRALL, M.M.; WAREING, P.F. The effect of nitrogen nutrition on cytokinin activity and free amino acids in *Betula pendula* R. and *Acer pseudoplatanus* L. *Journal Experimental Botanic*, oxford, v.32, n.127, p. 369-379, jan. 1981.
- EL-GENGAIHI, S.; TURKEY, K.A.; SHALABY, A.S. & IBRAHIM, N.A. Effect of fertilization treatments on yield parameters and mucilage and fat contents in roots of Moghat (*Glossostemon bruguiri* Desf.). **Plant Foods for Human Nutrition.** v.47, p.239-244, 1995.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. **Manual de métodos de análise do solo.** Rio de Janeiro, 1979, n.p.
- FURTINI NETO, A.E. **Efeito do enxofre no crescimento e assimilação de nitrogênio por diferentes espécies de eucalipto.** Lavras: UFLA, 1988. 95p. (Dissertação – Mestrado em solos e nutrição de plantas).
- GLASS, A.D.M. **Plant Nutrition – An Introduction to Current Concepts.** Jones and bertlett ed. Boston, 1989, 234p.
- GLICKSMAN, M. e SCHACHAT, R.E. **Gum Arabic.** In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. *Industrial Gums.* New York, Academic, 1959, p.213-298.

- GOMES CASTRO, A.M.; et all. **Fatores Relacionados com a absorção de fósforo pelas plantas. Revisão de Literatura.** Piracicaba, 1975, 52p.
- JACOBS, M.B. Gums, Cereals, Starch, others polyssaccharides, flour, and bread. In: Jacobs, M.B. **The Chemical Analysis of food and food products**, 3 ed. New York, D.Van Nostrand, 1958 p. 476-508.
- JONES, A.S. The isolation of bacterial nucleic acids using cetyltrimethylammonium bromide (cetavlon). **Biochemistry Biophys. ACTA**, 10: 607-612, 1953.
- LIMA FILHO, O.F. **Distúrbios nutricionais, marcha de absorção de nutrientes, análise do crescimento e teor de esteviosídeos em Estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni).** Tese, ESALQ-USP, Piracicaba, 1995, 212p.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants.** 2ed. Academic Press limited. 1995, 889p.
- MILLER, M.H.; VIJ, V.N. Some chemical and morphological effects of ammonium sulfate in a fertilizer phosphorus band for sugar beet. **Canadian Journal of soil science**, Ottawa, v.42, p.87-95, 1962.
- MOORBY, J. e BESFORD, R.T. **Mineral Nutrition and Growth.** In: **Encyclopedia of Plant Physiology – Inorganic Plant Nutrition.** Springer – Verlag, New York, 1983, p. 481-521.
- PREVOT, P.; OLLAGNIER, M. Law of minimum and balanced mineral nutrition. **Plant Analysis and Fertilizer Problems**, V.3, p. 257-277, 1991.
- ROBSON, A.D.; PITMANN, M.G. **Interactions between nutrients in Higher Plants.** In: LAUHLIM, A.; BIELESKIM, R.L., **Inorganic plant Nutrition**, Berlin: Berlin: Springer – Verlag, 1983. 15 A., cap. 1.5, p.147-180.
- SAGHIN, G. Effect of organic and mineral fertilizers on potato yield in the mountain zone of Suceava country. **Cercetari Agronomice in Moldova.** 22 (2): 71-74. Cf. **Field Crop Abst.** 43(10): 7373, 1989.

- SALISBURY E ROSS, f. e ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Califórnia: Wadsworth, 1992.682p.
- SIERAKOWSKI, M.R. **Alguns aspectos químicos, físico-químicos e estruturais da mucilagem extraída de folhas de *Pereskia aculeata***. Tese, UFPA- Curitiba, 1982.
- Silva, M.C.P. **Biomassa e mucilagem de Tanchagem (*Plantago major* L.) em função das adubações orgânica, mineral e mista e da supressão das inflorescências**. Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 1995 (dissertação).
- SMITH, F. e MONTGOMERY, R. **The chemistry of plant gums and mucilages (and some related polysaccharides)**. Reinhold Publ. Corp., NY. 1959. 627p.
- SOMERS, D.A.; KUO, T.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L.; OAKS, A. **Synthesis and degradation of Barley nitrate reductase**. **Plant Physiology**, v. 72, n.4, p.949-952, Aug. 1983.
- TAIZ, L e ZAIGER, E. **Plant Physiology**. Los Angeles, The benjamim/CuMnings, 1991. 559p.
- TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; OSHIMA, Y.; TAKAHASHI, M.; MURAKAMI, M.; HIKINO, H. **Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products**. **Planta Medica**. V. 20, 1987, p. 8-12.
- VETTORI, L. **Métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico, 7).
- WHISTLER, R.L. **Factors Influencing Gum Cost and Applications**. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Industrial Gums**, New York, Academic, 1959, p. 1-13.