

CULTIVO *IN VITRO*, NUTRIÇÃO
MINERAL E QUANTIFICAÇÃO DE
ROTENÓIDES EM TIMBÓS (*Derris* sp)

HERACLITO EUGENIO OLIVEIRA DA CONCEIÇÃO

2000

50359

35417

HERACLITO EUGENIO OLIVEIRA DA CONCEIÇÃO

**CULTIVO *IN VITRO*, NUTRIÇÃO MINERAL E QUANTIFICAÇÃO DE
ROTENÓIDES EM TIMBÓS (*Derris* sp)**

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

Orientador

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2000

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

Conceição, Heraclito Eugenio Oliveira da
Cultivo in vitro, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós
(*Derris* sp) / Heraclito Eugenio Oliveira da Conceição. -- Lavras : UFLA, 2000.
191 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Tese (Doutorado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Timbó. 2. *Derris urucu*. 3. *Derris nicou*. 4. Planta inseticida. 5. Germinação
in vitro. 6. Calo. 7. Propagação vegetativa. 8. Micropropagação. 9. Nutrição
mineral. 10. Rotenona. 11. Rotenóides. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-632.951
-631.53

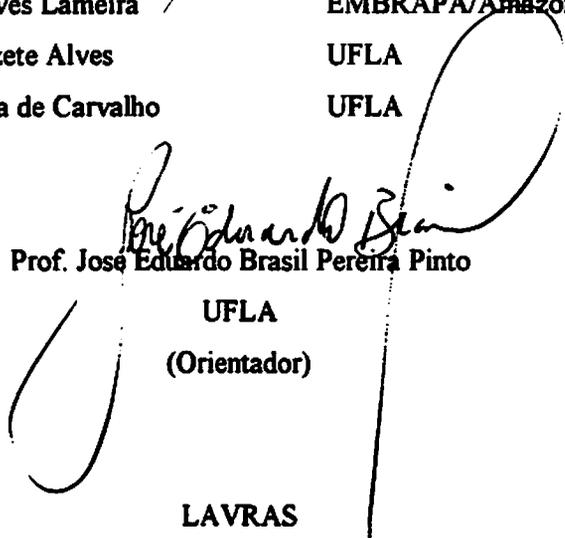
HERACLITO EUGENIO OLIVEIRA DA CONCEIÇÃO

**CULTIVO *IN VITRO*, NUTRIÇÃO MINERAL E QUANTIFICAÇÃO DE
ROTENÓIDES EM TIMBÓS (*Derris sp*)**

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

APROVADA em 12 de setembro de 2000

Prof. ^a Dra. Maria das Graças Cardoso /	UFLA
Pesq. Dr. Osmar Alves Lameira /	EMBRAPA/Amazônia Oriental
Prof. Dr. José Donizete Alves	UFLA
Prof. ^a Dra. Dulcinéia de Carvalho	UFLA


Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

2000

Aos meus pais,

Maurício Lima da Conceição (*in memoriam*) e Maria de Nazaré Oliveira da Conceição,

e irmãos, Edson, Maurício e Carlos Maurício,

e a todos os meus parentes, colegas e amigos que direta ou indiretamente sempre incentivaram e ajudaram na minha formação moral, profissional e intelectual.

OFEREÇO

Aos meus filhos, Anderson Bruno e Addison Breno e à minha querida esposa Maria Madalena, pela dedicação, compreensão, companheirismo, apoio moral e espiritual e incentivo para que pudéssemos realizar mais esta tarefa de nossas vidas.

DEDICO

OS BANIDOS DA SOCIEDADE UNIVERSAL (HOMENAGEM ESPECIAL)

Queira eu um dia pensar que nascemos para ser felizes, e não rejeitados.

Queira eu um dia sorrir por estar vendo uma criança, até poucos dias atrás desnutrida e hoje bem alimentada.

Enfim, todos somos complexos e complexo é o mundo ao nosso redor.

Ó, Deus! Como é triste sonhar com uma vida e um amor que não existe.

Como é triste viver em um mundo tão utópico e sinistro, e pior, saber que esse mundo é um paraíso de belezas inigualáveis.

Eu, assim como os banidos, sou ser que nasci na guerra e nela vou morrer.

Eu, meu pai, minha mãe, minha família, todos, somos carrascos por sermos especiais e ao mesmo tempo crucificados por sermos tão vorazes com os sonhos e a tão distante felicidade.

Todos choram, todos vivem chorando. A lágrima escorre pelo peito frágil da criança faminta e chega até o pé descalço da pobre senhora que pede dinheiro na esquina.

O sangue é aclamado pela violência que existe em todos os lugares, até no berço de uma família.

Ó Deus! Como é triste chorar e saber que o choro é a única coisa que alivia, é a única coisa que dá uma paz momentânea.

E o pior é quando o corpo não obedece o coração. Tudo parece tão escuro nesse momento! As flores do campo, o céu, o mar, a serra, até a alma, tudo lacrimeja como se estivesse pedindo uma luz, um clarão, enfim, um sinal vindo de algum lugar.

Ó, como os banidos, apesar de tudo, são abençoados, são esperançosos como a vida, como o amor, com o próximo. Todos parecem guerreiros embalsamados de sangue, guerreiros que choram a cada batalha e que cintilam ao saber que a guerra continua e é infinita.

Os banidos são, e como são pessoas fortes e inatingíveis, nascem na lama e erguem-se em busca do pedestal. Eles nascem no caos e no caos buscam a terna tranqüilidade.

Os banidos são, e como são pessoas especiais e honestas, carregam no peito a cruz do sacrifício e trazem na alma o brilho doce e puro do riso.

A vida lhes dá angústia e eles devolvem a vontade.

A vida lhes dá ruínas e eles devolvem a escada.

Os banidos nunca desistem. Podem até chorar, mas desistir jamais, pois eles são soldados, e soldados como eles morrem e renascem a cada batalha.

Soldados como eles nutrem vida em seus organismos.

Soldados como eles possuem a arma mais poderosa que alguém pode ter: o desejo de estar vivendo, respirando, sonhando.

Como os banidos desejam a liberdade, como os banidos desejam a reconstrução das ruínas que a vida lhes deu!

Porém, às vezes me pergunto: Por que nutrir tanta esperança se a vida é tão desprovida de esperança?

Por que guerrilhar em busca dos sonhos se os sonhos são tantos e possuem escudos intocáveis?

Por um átimo eu achei que as coisas seriam verdadeiras, mas não passam de mais uma fantasia oculta e fria.

Os banidos da sociedade universal são seres escravizados pela emoção, seres levados pelos batimentos lentos do peito, seres que amam a vida e o seu caos.

Os banidos são pássaros que nada mais querem a não ser a liberdade, a paz, a saúde e o amor à existência...

AUTOR: ANDERSON BRUNO

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pela liberação e apoio concedido;

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade de participação no curso de pós-graduação;

Ao professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela orientação, atenção e amizade;

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões.

Aos professores dos Departamentos de Biologia, Ciência do Solo, Ciências dos Alimentos, Educação, Ciências Exatas, Agricultura e Química, pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas cursadas durante o curso.

À professora Ila Maria Silva de Souza, do Departamento de Educação, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Pesquisador Sérgio de Mello Alves, da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, pela disponibilização de recursos materiais e de apoio à pesquisa durante a realização das análises cromatográficas.

Às funcionárias do Laboratório de Agroindústria da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, Lísias Aline Faria Viana e Nádia Eligia Nunes Pinto Paracampo, pela valiosa colaboração nas análises cromatográficas.

Aos colegas do curso de pós-graduação da UFLA pelo convívio no decorrer do curso.

Aos meus familiares pela dedicação e estímulo no acompanhamento das minhas atividades moral e profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que mais esta tarefa fosse realizada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

HERACLITO EUGENIO OLIVEIRA DA CONCEIÇÃO, filho de Mauricio Lima da Conceição e Maria de Nazaré Oliveira da Conceição, nasceu em Belém, Pará, é Engenheiro Agrônomo graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP em dezembro de 1976. Em fevereiro de 1977, iniciou sua carreira de pesquisador no Convênio FCAP/EMBRAPA/SUDHEVEA, onde trabalhou na área de Fitotecnia da Seringueira. Em junho de 1977, foi contratado pela EMBRAPA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SERINGUEIRA para trabalhar em Manaus, Amazonas, onde permaneceu até abril de 1987. De maio de 1987 a abril de 1989, trabalhou na área de cultura de tecidos vegetais na EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, em Brasília, Distrito Federal. Desde maio de 1989 trabalha na EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, lotado na área técnica de recursos genéticos e biotecnologia.

Realizou vários cursos e treinamentos pela EMBRAPA e outras Instituições de ensino e pesquisa, destacando-se o curso de Técnicas de Pesquisa e Experimentação Agropecuária, concluído em 1978, patrocinado pela EMBRAPA/DRH, em Brasília, DF, e o de Mestrado em Fisiologia Vegetal, concluído em 1983 na Universidade Federal de Viçosa – UFV, em Viçosa, MG.

É autor de vários artigos científicos sobre agricultura da Amazônia. Atuou como professor colaborador do curso de Bacharelado em Biologia na Universidade Federal do Pará – UFPa, durante 1993 a 1995.

Em março de 1997 iniciou o curso de doutorado em Agronomia, com área de concentração Fitotecnia e linha de pesquisa em cultura de tecidos vegetais, na Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, concluindo-o em setembro de 2000.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial Teórico.....	3
2.1 Os timbós do gênero <i>Derris</i>	4
2.2 Aspectos econômicos.....	6
2.3 Aspectos agrônômicos.....	9
2.4 Caracterização geral da rotenona e rotenóides.....	10
2.4.1 Rotenona e rotenóides.....	10
2.4.2 Emprego e importância dos rotenóides.....	12
2.5 Germinação e desenvolvimento de plantas.....	14
2.6 Nutrição mineral e metabólitos secundários.....	15
2.7 Cultura de tecidos.....	19
2.7.1 Cultura de calos.....	20
2.7.2 Micropropagação.....	21
2.8 Metabólitos primários e secundários.....	22
2.9 Biossíntese dos metabólitos secundários.....	23
2.10 Os isoflavonóides e o grupo dos rotenóides.....	24
2.11 Isoflavonóides obtidos em cultura de tecidos.....	28
3 Referências Bibliográficas.....	29
CAPÍTULO 2: Produção de plântulas de timbó em condições de cultivo <i>in vitro</i>.....	36
1 Resumo.....	36
2. Abstract.....	37
3 Introdução.....	38
4 Referencial Teórico.....	39
4.1 Aspectos gerais da germinação de sementes.....	39
4.2 Crescimento de plântulas <i>in vitro</i>	41
5 Material e Métodos.....	42
5.1 Influência das concentrações dos sais de 'MS' na germinação de sementes e crescimento de plântulas de timbó sob condições de cultivo <i>in vitro</i>	42
5.1.1 Efeitos das concentrações dos sais de 'MS' sobre a germinação de sementes de timbó em condições de cultivo <i>in vitro</i>	42
5.1.1.1 Desinfestação das sementes.....	42
5.1.1.2 Tratamentos e condições de cultivo.....	42

5.1.1.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	43
5.1.2 Efeitos das concentrações dos sais de 'MS' no crescimento de plântula de timbó, em condições de cultivo <i>in vitro</i>	43
5.1.2.1 Tratamentos, condições de cultivo e variáveis de respostas .	43
5.1.2.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	44
6 Resultados e Discussão.....	44
6.1 Efeitos das concentrações dos sais de 'MS' sobre a germinação de sementes de timbó em condições de cultivo <i>in vitro</i>	44
6.2. Efeitos das concentrações dos sais de 'MS' no crescimento de plântulas de timbó em condições de cultivo <i>in vitro</i>	46
6.2.1 Comprimento do caule (CC).....	47
6.2.2 Matéria fresca da raiz, caule e folha (MFR, MFC e MFF).....	48
6.2.3 Matéria seca da raiz e do caule (MSR e MSC).....	51
6.2.4 Número de folhas (NF) e Matéria seca da folha (MSF).....	52
7 Conclusões	56
8 Referências Bibliográficas.....	57
CAPÍTULO 3: Indução de calos em timbó.....	60
1 Resumo.....	60
2 Abstract.....	61
3. Introdução.....	62
4 Referencial Teórico.....	63
4.1 Cultura de calos e regeneração de plantas.....	63
4.2 Curva de crescimento de calos.....	66
5 Material e Métodos.....	67
5.1 Indução de calos em timbós com diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento.....	67
5.1.1 Indução de calos em explante foliar de timbó.....	67
5.1.2 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento ANA e BAP.....	68
5.1.3 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento picloram (PIC) e BAP.....	68
5.1.4 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, AIB, PIC e BAP.....	69
5.2 Manutenção de calos de <i>Derris urucu</i> oriundos de explantes foliar e radicial.....	69
5.2.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.....	69
5.2.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	70
5.3 Construção da curva de crescimento de calos.....	70
5.3.1 Material vegetal, tratamentos, condições de cultivo e coleta de dados.....	70

6 Resultados e Discussão.....	71
6.1 Indução de calos em explante foliar de timbó.....	71
6.2 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento ANA e BAP.....	75
6.3 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento picloram (PIC) e BAP.....	79
6.4 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, AIB, PIC e BAP.....	82
6.5 Manutenção de calos de timbó oriundos de explantes foliar e radicial.	87
6.6 Curva de crescimento de calos.	89
7 Conclusões.....	92
8 Referências Bibliográficas.....	94
CAPÍTULO 4: Micropropagação de timbó.....	97
1 Resumo.....	97
2 Abstract.....	98
3 Introdução.....	99
4 Referencial Teórico.....	100
4.1 Aspectos gerais da micropropagação.....	100
4.2 Respostas de explantes nodais e internodais e de reguladores de crescimento.....	101
4.3 Respostas de explantes de ápices caulinares e de reguladores de crescimento.....	102
4.4 Respostas de diversos explantes e reguladores de crescimento... ..	104
5 Material e Métodos.....	105
5.1 Efeitos de BAP e TDZ sobre explantes nodais de <i>Derris urucu</i> e <i>Derris nicou</i> visando à indução de brotos.....	106
5.1.1 Efeitos de BAP.....	106
5.1.2 Efeitos de TDZ.....	106
5.2 Efeitos de concentrações de sacarose e de BAP, do número de gemas axilares em explante nodal e de explante contendo ápice caulinar na indução de brotos em timbó.....	107
5.3 Indução de brotos adventícios em explantes nodais com duas gemas axilares e de explante contendo ápice caulinar de timbó.....	108
5.4 Indução de brotos e enraizamento em explante nodal com duas gemas axilares, oriundo de plântulas de <i>Derris urucu</i> germinadas <i>in vitro</i>	109
6 Resultados e Discussão.....	111
6.1 Efeitos de BAP.....	111
6.1.1 Número e tamanho de brotos em explante nodal de timbó com uma ou duas gemas axilares.....	111

6.2 Efeitos de TDZ.....	117
6.2.1 Número e tamanho de brotos em explante nodal de timbó contendo uma ou duas gemas axilares.....	117
6.3 Efeitos de concentrações de sacarose e BAP e do número de gemas axilares em explante nodal e de explante contendo ápice caulinar na indução de brotos em timbó.....	123
6.4 Indução de brotos adventícios em explantes nodal e em explante contendo ápice caulinar de <i>Derris urucu</i>	124
6.5 Indução de brotos e enraizamento em explante nodal com duas gemas axilares oriundo de plântulas de <i>Derris urucu</i> germinadas <i>in vitro</i>	126
7 Conclusões.....	134
8 Referências Bibliográficas.....	135
CAPÍTULO 5: Nutrição mineral, crescimento e quantificação de rotenóides em timbó	139
1 Resumo.....	139
2 Abstract.....	140
3 Introdução.....	141
4 Referencial Teórico.....	143
4.1. Aspectos gerais da nutrição mineral de plantas.....	143
4.1.1 Avaliação do estado nutricional e aspectos gerais dos macronutrientes em plantas.....	143
4.1.2 Efeitos de N e P em cultura de tecidos de plantas.....	146
4.2 Cultura de tecidos e metabólitos secundários.....	150
5.5 Material e Métodos.....	151
5.1 Avaliação das exigências nutricionais do timbó.....	151
5.1.1 Efeitos da omissão de macronutrientes no crescimento e desenvolvimento de <i>Derris urucu</i>	152
5.1.1.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.....	152
5.1.1.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	153
5.2 Efeitos de variações das concentrações dos sais de N e de P do meio 'MS' durante a fase de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de plântulas de <i>Derris urucu</i> germinadas <i>in vitro</i>	154
5.2.1. Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.....	154
5.2.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	155
5.3 Crescimento e nutrição mineral de plântulas de <i>Derris urucu</i>	156
5.3.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.....	156
5.3.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	157
5.6 Resultados e Discussão.....	158

6.1 Efeitos da omissão de macronutrientes no crescimento e desenvolvimento de <i>Derris urucu</i> <i>in vivo</i>	158
6.2 – Efeitos de variações das concentrações dos sais de N e de P do meio nutritivo ‘MS’ durante a fase de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de plântulas de <i>Derris urucu</i> germinadas <i>in vitro</i>	165
6.3 Crescimento e nutrição mineral de plântulas <i>Derris urucu</i>	175
7 Conclusões.....	181
8 Considerações Finais.....	182
9 Referências Bibliográficas.....	187

RESUMO

CONCEIÇÃO, Heraclito Eugenio Oliveira da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris sp.*)**. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*.

Os ecossistemas amazônicos são ricos em plantas com propriedades inseticidas e piscicidas, e as mais usadas na região pertencem ao gênero *Derris*. Desta forma, considerou-se importante, neste trabalho, estudar as influências e os efeitos de fatores relacionados às técnicas de cultura de tecidos vegetais, associados à nutrição mineral e à produção de metabólitos secundários, em duas espécies de timbós. Vários experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - UFLA, em Lavras, Minas Gerais. Os resultados obtidos permitiram a elaboração de protocolos para produção de calos a partir de explantes foliar e radicial e de regeneração de plântulas de timbó. Calos oriundos de explante radicial de *Derris urucu*, cultivados em meios nutritivos formulados com variações de concentrações dos sais de nitrogênio e de fósforo de 'MS', apresentaram respostas positivas para biossíntese de compostos rotenóides, os quais foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estes metabólitos secundários também foram determinados em sistema radicular de plântulas de *D. urucu* em condições de cultivo *in vitro*. Também são discutidos alguns aspectos da nutrição mineral de *D. urucu* através de técnicas de diagnose por subtração.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, Heraclito Eugenio Oliveira da. **In vitro cultivation, mineral nutrition and quantification of rotenoids in “timbós” (*Derris* sp).** Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)*.

The amazon ecosuystems are rich in plants with insecticide and piscicide properties and the most utilized in the region belong to the genus *Derris*. In this way, it was considered important in this work to study the influences and the effects of factors related with the techniques of plant tissue culture, associated with mineral nutrition and production of secondary metabolites in two “timbós” species. A number of experiments were conducted in the plant tissue culture laboratory of the department of agriculture of the Universidade Federal de Lavras – UFLA in Lavras, Minas Gerais, Brazil. The results obtained allowed the design of protocols for callus production from leaf and root explants and regeneration of “timbó’s” plantlet. *Derris urucu* callus from the root explant cultivated in nutrient media formulated with variations of concentrations of ‘MS’ nitrogen and phosphorus salts, presented positive responses for the biosynthesis of rotenoid compounds, which were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). These secondary metabolites were also determined in root system of seedlings of *D. urucu* under conditions of in vitro cultivation. Also are discussed some aspects of mineral nutrition of *D. urucu* through the subtration diagnosis techniques.

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Muitas plantas produzem compostos orgânicos importantes economicamente, como resinas, taninos, terpenos, gomas, ceras, corantes, alcalóides e outros. Estes compostos são resultantes do metabolismo secundário das plantas, contribuem para a adaptação e interação da planta com o ambiente e desempenham papéis importantes na vida da planta, como defesa a ataque de patógenos e predadores; além disso, muitos deles, pela sua ação farmacológica ou pelas propriedades químicas que apresentam, são utilizados como medicamentos ou como matérias primas para várias aplicações científicas, tecnológicas e comerciais (Vickery e Vickery, 1981; Balandrin *et al.*, 1985).

Os inseticidas de origem vegetal são pouco utilizados atualmente devido ao aparecimento dos defensivos sintéticos. Cita-se a nicotina, que praticamente não é mais utilizada. Outro produto é a rotenona (Figura 1), que entre os rotenóides, é a principal substância contida nas raízes dos timbós. Esse composto é um veneno violentíssimo para insetos e animais de sangue frio. Atua como veneno de contato, estomacal e traqueal, reunindo os três métodos técnicos usados no combate às pragas por contato, envenenamento e asfixia (Cravero, Guerra e Silveira, 1976).

A inibição da fosfodiesterase coronária atribuída aos rotenóides foi observada por Petov *et al.* (1983). Os rotenóides têm outros efeitos biológicos interessantes, tais como a inibição da formação de microtubulos da tubulina e atividade anti-cancerígena. Há interesse ecológico na influência dos rotenóides sobre certas relações planta/inseto e um interesse permanente no seu uso como veneno para peixes, em reservatórios de águas que utilizam espécies mais valiosos ou na pesca indígena (Crombie e Whiting, 1998).

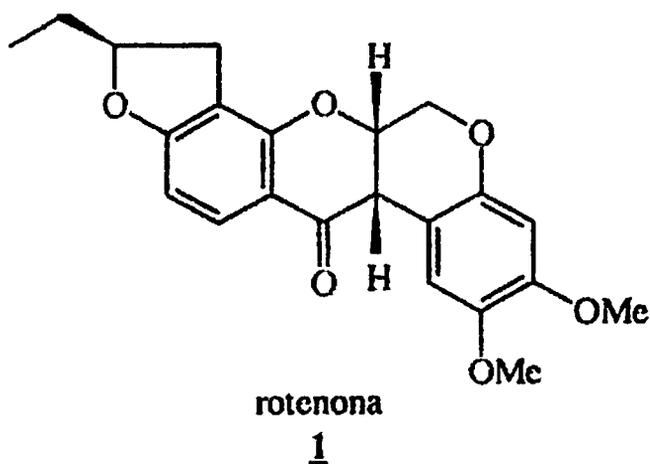


FIGURA 1 – Estrutura da Rotenona 1. UFLA, Lavras - MG, 2000.

O cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, independente de mudanças climáticas ou condições do solo. Além disso, cultura de células e tecidos vegetais constitui um sistema adequado para investigação das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários e favorecendo a biossíntese de compostos que naturalmente não ocorrem na planta (Crocomo e Melo, 1991).

A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais, aromáticas e inseticidas através das técnicas de micropropagação, culturas de calos, raízes e suspensão celular, visando a propagação em larga escala de genótipos superiores e a produção de metabólitos secundários. A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares por alguns grupos de pesquisadores tem ocorrido em vários países nas últimas décadas. Os resultados obtidos nem sempre têm sido satisfatórios, entretanto, conhecimentos novos têm

sido relatados para uma variedade de substâncias utilizáveis na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e inseticida (Balandrin *et al.*, 1985).

Estudos de Costa (1996) reportam a grande variabilidade dos timbós brasileiros em relação à produtividade de compostos rotenóides e à escassez de pesquisas agronômicas e biotecnológicas nestas espécies.

Estudos sobre propagação *in vitro* têm sido realizados para várias espécies de plantas. Se as condições fisiológicas e fitossanitárias da planta doadora de explante, o tipo de explante, o meio nutritivo e a presença ou não de substâncias reguladoras de crescimento e as condições de cultivo *in vitro* podem interferir na respostas morfogênicas e bioquímicas de cada espécie vegetal, então haverá uma combinação apropriada para o desenvolvimento de protocolo eficiente para a propagação *in vitro* de espécies de timbós do gênero *Derris*. Desta forma, considerou-se importante, neste trabalho, estudar as influências e os efeitos de fatores relacionados às técnicas de cultura de tecidos vegetais, visando determinar protocolos eficientes para a propagação *in vitro* de duas espécies de timbós e quantificar a produção de compostos rotenóides oriundos de cultivo *in vitro* em calos de explantes foliar e radicial e em plântulas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início do século. Haberlandt, em 1902, foi o primeiro a cultivar células e tecidos somáticos de várias espécies de plantas em solução nutritiva (Torres, Caldas e Ferreira, 1998). A partir deste trabalho, muitos outros foram desenvolvidos e vêm proporcionando avanços consideráveis nos diversos ramos do conhecimento científico. A cultura de tecidos de plantas é uma técnica de cultivo de células, tecidos ou órgãos de plantas, isolados da planta-matriz, sobre um meio nutritivo artificial. No caso específico dos timbós, a escassez de

pesquisas agronômicas e biotecnológicas tem contribuído para o não estabelecimento definitivo da cultura, razão pela qual a presente revisão trata de aspectos agronômicos e econômicos das espécies, cultura de tecidos associados à nutrição mineral e produção de metabólitos secundários.

2.1 Os timbós do gênero *Derris*

Timbó é o nome pelo qual são conhecidas, na Amazônia, inúmeras plantas de cultura pré-colombiana, sendo aquelas espécies que, mesmo antes do descobrimento da América por Cristóvão Colombo, já eram cultivadas ou apenas exploradas pelos nativos e são, ainda hoje, utilizadas nas pescarias dos ameríndios. Há referências sobre o uso de plantas ictiotóxicas e inseticidas desde os tempos de Anchieta, Piso, Castelnau, Wallace, Spruce e Martius (Pires, 1978).

Fusée-Aublet, em 1775, fez a descrição botânica de um timbó nativo da América do Sul e deu-lhe o nome de *Robina nicou* (LeCointe, 1936). Em 1930, o botânico E. P. Killip descreveu as duas espécies mais interessantes de *Lonchocarpus*, o barbasco legítimo do Peru, que foi identificado como *Lonchocarpus nicou*, e o timbó vermelho ou timbó urucu, do baixo Amazonas, que foi classificado como *Lonchocarpus urucu* (Roark, 1936).

Há muitas espécies de timbó, mas as de uso mais generalizado na Amazônia são o timbó vermelho, *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride, e o timbó branco, *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride (Figuras 2a, 2b, 2c e 3b). Essas duas espécies pertenciam ao gênero *Lonchocarpus* e passaram para o gênero *Derris* em revisão feita por Francis Macbride, que as colocou dentro da família das Leguminosas. Tanto *D. urucu* como *D. nicou*, quando abandonados em capoeiras, são cipós trepadores que atingem a copa das árvores de maior porte. Entretanto, quando cultivados, apresentam diferenças em relação à fecundidade, rusticidade, arquitetura da planta, morfologia externa das folhas,

coloração do suco das raízes e produtividade. No timbó vermelho, as hastes se tornam escandentes desde novas e entrelaçam-se, formando um teto compacto que cobre o solo. Já o timbó branco mantém suas hastes eretas, que só depois de muitos anos se tornam escandentes. O primeiro apresenta produção de até quatro vezes mais raízes e melhor proteção ao solo com relação ao segundo (Lima, 1987).

Quanto à fecundidade, *D. urucu* floresce e frutifica normalmente. Por outro lado, não se tem informação sobre o florescimento de *D. nicou*, mesmo quando submetido a tratamentos com fitohormônios e prolongamento do dia solar, com iluminação artificial (Lima, 1947).

Em geral, as raízes de *D. nicou* apresentam maior teor em rotenona do que as de *D. urucu*. Tanto para uma espécie como para outra encontram-se valores de até 10% ou mais de rotenona, com maior frequência de resultados altos para o timbó branco (Costa, 1996; Lima e Costa, 1998). Todavia, essa vantagem desaparece, do ponto de vista agrônomico, não só pela maior quantidade de raízes que o timbó vermelho produz, pela comprovada proteção que exerce no solo, como também pela possibilidade de ser melhorado geneticamente (Lima, 1947).

No que diz respeito à morfologia externa das folhas, os folíolos do timbó branco não apresentam pêlos dourados brilhantes na face abaxial, como acontece no timbó vermelho. Por sua vez, a raiz deste timbó, seccionada, apresenta cor vermelha nos cortes e daí a denominação de urucu, que na língua tupi quer dizer vermelho, o que não acontece em *D. nicou*, razão pela qual ele é conhecido pela denominação de timbó branco (Lima, 1987).

Uma outra espécie, a *Derris elliptica* (Benth) (Figura 3a), é de origem asiática, sendo primeiramente estudada por Kazuo Nagai em 1902. Ele concluiu que o princípio ativo dessa planta era um produto cristalino, ao qual foi dado o nome de rotenona (Corbett, 1940). Posteriormente, essa espécie, conhecida

como tubá, toeba ou timbó asiático, foi introduzida em Parintins - AM por imigrantes japoneses, possivelmente para uso como inseticida ou adubo verde (Lima e Costa, 1991). Outras substâncias tóxicas foram isoladas das raízes de *D. elliptica*, como a derride, por Van Sillevoldt (Hanriot, 1907), e a tubetoxina ou tubatoxina, extraída em 1923 por Ishikawa (Silva, 1934).

2.2. Aspectos econômicos

As exportações do timbó em pó, no Brasil, iniciaram em 1939, através do porto de Belém (PA), sendo os Estados Unidos e França como principais importadores. Estados brasileiros, como o Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro, fazem parte desse grupo (Lima, 1947; Lima, 1987). As plantas ictiotóxicas encontraram largo emprego como inseticidas e, com isto, várias delas entraram para a agricultura econômica, tanto no Velho Mundo como no Brasil, principalmente na Amazônia. No entanto, com o advento do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) e dos inseticidas sintéticos, após a Segunda Guerra Mundial, o comércio do pó das raízes de timbó entrou em colapso e as atividades de beneficiamento e de pesquisa com a cultura dos timbós foram completamente desativadas (Pires, 1978).

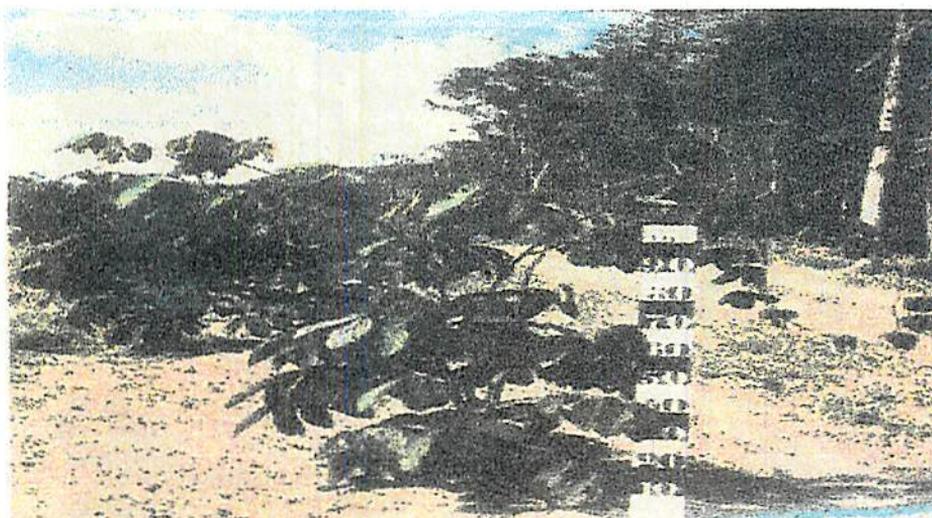
De acordo com dados do IBGE, a produção média brasileira de timbó para o período de 1954-60 foi de 237 toneladas, declinando para 65 toneladas no período de 1961-67 e 35 toneladas no período de 1978-85 (Gordon e Coppen, 1993). O Pará é o principal Estado produtor de timbó e tem sido o único produtor desde 1978. Nas décadas de 50 e 60, o Maranhão, o Amazonas e o Amapá também contribuíram para a produção total do timbó brasileiro.



A

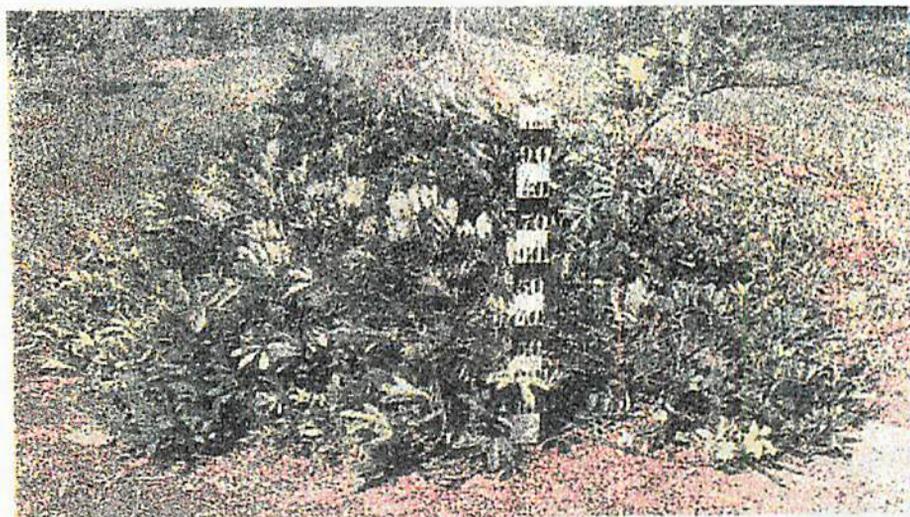


B

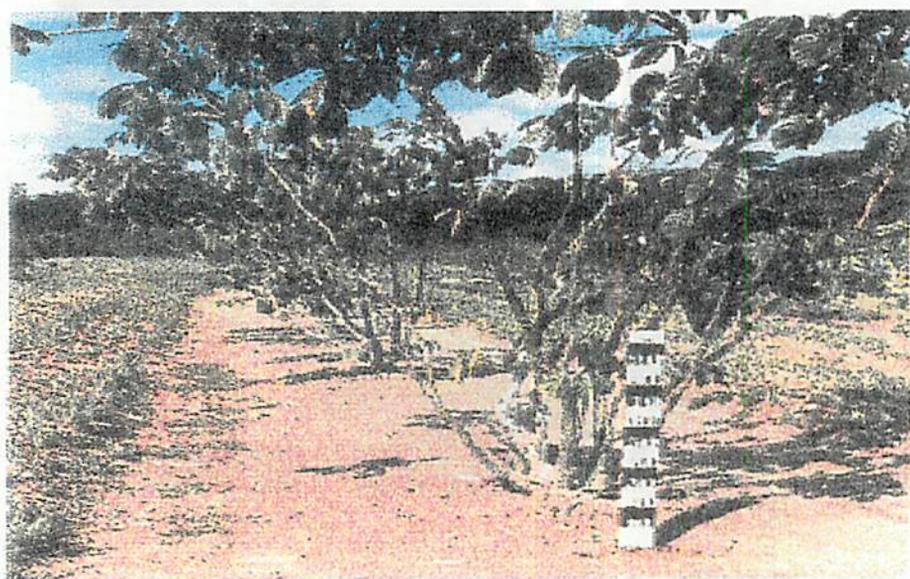


C

FIGURA 2 – Aspecto geral de *Derris urucu*. A e B) Floração e frutificação aos três anos de idade e C) Ramos escandentes com um ano e meio de idade de exemplares do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Fonte: Lima, 1987; Lima e Costa, 1998. UFLA, Lavras - MG, 2000.



A



B

FIGURA 3 – Aspecto geral de *Derris elliptica* (A) e *Derris nicou* (B) aos três anos de idade de exemplares do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. UFLA, Lavras - MG, 2000. Fonte: Lima e Costa, 1998.

2.3 Aspectos agronômicos

O solo para a cultura do timbó deve ser de textura leve, que facilita o desenvolvimento e o arrancamento das raízes de timbós. Segundo Lima (1987), *D. urucu* e *D. nicou* apresentam-se com bom desenvolvimento em áreas amazônicas com precipitação de chuvas variando desde 1.900 mm a 3.500 mm anuais, com chuvas bem distribuídas durante todo o ano ou em dois períodos bem definidos, um seco e outro chuvoso. O plantio deve ser feito no início da estação chuvosa.

A propagação é vegetativa e o vigor das plantas depende, em grande parte, do estágio de desenvolvimento e do diâmetro das estacas. O diâmetro ideal deve oscilar entre 3 a 4 cm e o comprimento deve ser de 30 cm. Estacas próximas da cepa, e portanto com maior reserva, enraízam melhor e originam plantas mais vigorosas. Para a obtenção de bom pegamento e de plantas uniformes, recomenda-se o uso de estacas da metade inferior das hastes, retiradas de plantas com mais de três anos de idade (Lima, 1987; Lima e Costa, 1998).

A maior parte das raízes se desenvolve paralelamente à superfície do solo, a uma profundidade de até 40 cm. A remoção das raízes com profundidade além de 40 cm é muito mais trabalhosa e deve ser evitada, pois elas irão assegurar a preservação das plantas. Para o arrancamento das raízes superficiais, o coletor as localiza primeiramente na base da cepa, e daí por diante vai arrancando-as com enxadeco, da base para a extremidade. A colheita poderá ser repetida de três em três anos. Aos três anos de idade, o rendimento de uma plantação de timbó urucu com espaçamento de 3 m x 2 m poderá atingir 9 toneladas por hectare de raízes frescas. Em solos pobres, o timbó branco produzirá três a quatro vezes menos (Lima, 1987).

2.4 Caracterização geral da rotenona e rotenóides

2.4.1 Rotenona e rotenóides

Os rotenóides são isoflavonóides complexados (Figura 4) e a estrutura dos seus sistemas de anéis angulares A/B/C/D tem sido estudada experimentalmente, partindo de metabólitos primários simples e passando através de uma série de fases oxidativas. A biossíntese dos rotenóides a partir do metabólito primário está indicado na Figura 4. Essa seqüência é medida pelo aumento do estado oxidativo destes componentes (Crombie e Whiting, 1998).

No grupo dos rotenóides, o membro mais conhecido é o (-) - (6aS, 12aS, 5'R) - rotenona 1 (Figura 1), bem conhecido como um veneno para peixes e principal componente inseticida e anti-alimentar de insetos (função deterrente) do 'Derris', obtido comercialmente de espécies de *Derris* e *Lonchocarpus*. A rotenona e seu derivado 6,7 - dihidro ligam-se a NADH : ubiquinona redutase (complexo I) na cadeia de transporte de elétrons e são usadas freqüentemente em experimentações bioquímicas (Crombie e Whiting, 1998).

A rotenona, quando pura, é uma substância que se apresenta sob a forma de cristais, sem cor e sem cheiro, muito refringente e transparente. Seus cristais possuem altos índices de refração e pertencem ao sistema ortorrômbico. É extremamente solúvel em clorofórmio, éter, acetona, tetracloreto de carbono, e ainda nos derivados clorados do etileno. É quase insolúvel em água, variando entre as relações de 1: 1.000.000 para 1: 6.000.000. Segundo Lima (1987), a rotenona aparece sempre acompanhada por outros princípios ativos, conhecidos como rotenóides, entre os quais destacam-se a deguelina, a tefrosina e o toxicarol. Para Flemming e Baker (1934), com exceção do toxicarol, a rotenona, a deguelina e a tefrosina são repelentes ao besouro japonês. Além dessas quatro substâncias, foi isolado, nas raízes frescas dos timbós vermelho e branco, um

princípio ativo volátil de base orgânica de núcleo pirídico (Souza, 1955). Além de diversos outros princípios inseticidas (Mors, 1978a), isolou-se também, de Metabolismo Primário

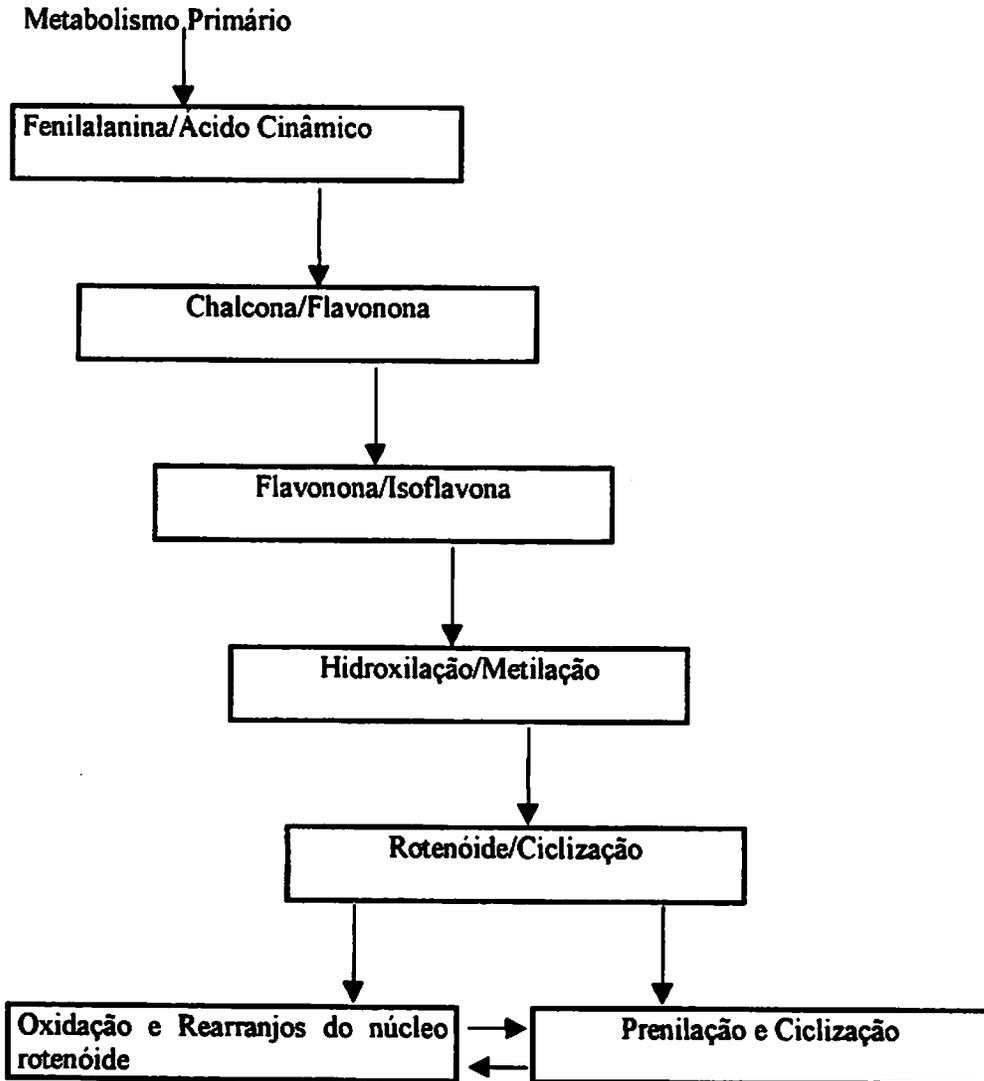


FIGURA 4 – Biossíntese de rotenóides. UFLA, Lavras - MG, 2000. Adaptado de Crombie e Whiting, 1998.

Derris urucu, uma saponina de alto poder espumífero, que foi denominada de derrisídeo. Esta substância não se enquadra em nenhuma das categorias

tradicionais de saponinas. O produto de sua hidrólise, a derrigenina, é um novo tipo de substância natural, um estilbeno, quase rotenóide, porém não apresentando qualquer toxicidade para peixes. No complexo tóxico do timbó, ela parece desempenhar a ação de agente dispersivo da rotenona (Mors, 1978b; 1982). Outro princípio, um alcalóide, a nilobilina, foi encontrado por Groffroy em 1895 (Caminha Filho, 1940). As substâncias cumestrol e α -amirina foram isoladas de uma planta do gênero *Derris*, coletada em Xapuri, no Acre, por Zoghbi *et al.* (1988).

2.4.2 Emprego e importância dos rotenóides

Pinto (1937) empregou a rotenona como carrapaticida com sucesso, sob a forma de pó das raízes em solução de sabão em água, como também recomendou o seu uso no tratamento de pediculoses e no combate a bernes e piolhos. Williams (1934) relatou que o suco leitoso da raiz de *Lonchocarpus nicou*, usado na lavagem de gados nas montanhas andinas, foi eficiente para matar carrapatos.

De acordo com Roark (1933), a rotenona é 30 vezes mais tóxica que arseniato de chumbo, como veneno estomacal para o bicho da seda; 13 vezes mais que a nicotina, como inseticida de contato, em relação a certos afídeos, e 25 vezes mais tóxica que o cianeto de potássio para o peixe vermelho, sendo inócua para aves e mamíferos que a ingeriram. Silva (1934) relatou que os timbós, empregados em forma natural ou em soluções concentradas, são superiores ao sulfato de nicotina, arseniatos de chumbo e de cálcio, como inseticidas.

Segundo Caminha Filho (1940), a rotenona é uma substância de grande valor inseticida contra pragas dos vegetais, como coccídeos, cochonilhas, pulgões, piolhos, vespas, mariposas, borboletas, etc., tanto no estado adulto

como nos diversos períodos de desenvolvimento desses insetos. É também eficiente para os ectoparasitas de animais domésticos e do homem, como pulgas, piolhos, carrapatos e bernes. O autor afirma ainda que os resíduos de sua aplicação sobre frutos e o pescado obtido com seu emprego não são tóxicos para o homem, e quando ingerido pelos animais domésticos, não lhes causam nenhum dano, servindo como desinfetante intestinal, não sendo, portanto, os timbós, tóxicos para os animais de sangue quente.

O modo de emprego do timbó na captura de peixes é feito, principalmente com plantas da família das Leguminosas, em especial dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia*, através das raízes amassadas, embebidas e torcidas sobre a água de rios, igarapés ou lagos, deixando desprender um líquido branco leitoso de cheiro forte (hipoclorina); o material semi-enxuto é novamente embebido e torcido na água, até que o agente inebriante seja totalmente esgotado. Este tipo de pesca é muito utilizado pelos ictiologistas com objetivo da captura de espécimes de peixes para estudos e para coleções dos museus. Os índios praticam-na, entretanto, para suprir a alimentação em estoque, pois os peixes são moqueados, tostados sobre brasas, e assim podem ser conservados por longo período de tempo (Pires, 1978). O produto atinge o estômago do peixe, mas o efeito é sempre obtido pela passagem da água nas guelras. O primeiro efeito sobre o peixe, de acordo com Raizada e Varma (1937), é a reação de fuga, mas a respiração torna-se lenta, sobrevém uma certa apatia e falta de movimentos. Depois, com uma incapacidade de se manter em posição normal, o peixe rebola, vem à superfície, a respiração fica lenta, e por fim ocorre a paralisia.

Com relação ao poder tóxico da rotenona em peixes, esse fato é diversamente apresentado por vários autores: Gersdorft (1931) indica que uma concentração de 0,2 mg.l⁻¹ de água permite uma sobrevida de 65 minutos para os peixes vermelhos (*Carassius auratus*), enquanto uma dose de 0,0012 g já é

capaz de matá-los, sendo 25 vezes mais tóxica que o KCN; Göbel (1937) indica a dose de 0,012 mg.l⁻¹ de água; Caminha Filho (1940) relata que a rotenona é tóxica para os peixes em uma diluição de 0,00001%. Para os peixes acaráis (*Geophagus brasiliensis*), foi obtida a morte, em meia hora, com uma dose de 0,0012 g.l⁻¹ d de água. A morte ocorre por paralisia respiratória, embora os batimentos cardíacos continuem por algum tempo, após sustados os movimentos respiratórios (Corbett, 1940).

Haag (1931) realizou estudos sobre a toxicidade da rotenona utilizando vários métodos de administração da droga. Determinou, assim, intoxicações agudas e crônicas em animais de sangue quente, além de encontrar a dose mínima mortal (D.M.M.) para ratos, coelhos e cães. De um modo geral, em todos os animais em que a rotenona foi ministrada por via oral, observou-se uma irritação no trato digestivo. O autor concluiu, ainda, que as mucosas digestiva e respiratória podem absorver a rotenona, causando a morte do indivíduo. Nesta mesma linha de pesquisa, Ambrose e Haag (1938) verificaram a intoxicação crônica através do uso de concentrações de 0,03% a 0,04% de *D. elliptica* na dieta de cães e ratos. Concluíram, portanto, que *Derris* era sempre venenoso, sendo o fígado desses animais o órgão mais afetado. Lapa *et al.* (1978) concluíram que a rotenona, quando injetada em ratos, induziu bradicardia, hipotensão e parada respiratória e, posteriormente, estudos de Ware (1993) mostraram que a rotenona tem uma dose letal (DL₅₀) em ratos, de aproximadamente 350 mg.Kg⁻¹ de peso vivo.

2.5 Germinação e desenvolvimento de plantas

Para uma semente viável em repouso, por quiescência ou dormência, quando são satisfeitas uma série de condições externas (do ambiente) e internas (intrínsecas do órgão), ocorrerá o crescimento do embrião, o qual conduzirá à

germinação. Por isso, do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (Borges e Rena, 1993).

Após a germinação, o meristema da raiz do embrião é ativado e cresce rapidamente, iniciando o desenvolvimento da raiz primária. Logo depois, o meristema principal da parte aérea da planta inicia o crescimento. Em algumas plantas, os cotilédones emergem para acima com o crescimento do hipocótilo; em outras, os cotilédones permanecem abaixo do solo e somente o epicótilo cresce acima do solo (Metivier, 1986).

O meristema apical do caule não produz somente o caule, mas também folhas, ramos e outros apêndices da parte aérea. O meristema apical é muito mais complexo que o meristema da raiz. Contudo, a semelhança com o meristema da raiz é muito pequeno, usualmente não mais do que uma fração de um milímetro em diâmetro. Os primórdios foliares são formados em intervalos regulares e o caule é dividido por nós em pontos de inserção foliar. Internós são usualmente bem curtos no início. O alongamento do caule tem lugar após a formação das folhas. Em certas plantas, os internós nunca alongam, resultando em bulbos característicos ou hábito de crescimento em roseta. O alongamento do caule é um fenômeno complexo sob a influência de fatores ambientais e controlado por hormônios ou fatores de crescimento. Como nós podemos esperar, muitos padrões diferentes de crescimento ocorrem não somente entre diferentes plantas, mas também entre diferentes internós da mesma planta.

2.6 Nutrição mineral e metabólitos secundários

Segundo Marschner (1995), a importância dos nutrientes minerais para o crescimento de plantas tem sido relatada por vários autores. As plantas têm uma limitada capacidade para absorção seletiva de elementos minerais que são

essenciais para o seu crescimento. Elas também absorvem os elementos minerais que não são essenciais para o seu crescimento e que podem vir a ser tóxicos.

A composição mineral de plantas crescendo em solos não pode, portanto, ser usada para estabelecer se um elemento mineral é essencial. Este fato foi estimado em experimentos conduzidos com culturas em areia e em solução nutritiva, nos quais um elemento mineral particular era omitido. Estas técnicas tornaram possível uma caracterização mais precisa da essencialidade dos elementos minerais e conduzem a um melhor entendimento de seu papel no metabolismo. Para plantas superiores, a essencialidade de catorze elementos minerais está bem estabelecida, embora o conhecimento das exigências do cloro (Cl) e níquel (Ni) ainda esteja restrito a um limitado número de plantas (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Marschner, 1995)

No crescimento do jaborandi através da produção de matéria seca, o quadro sintomatológico das deficiências e a determinação dos níveis analíticos dos macronutrientes nas folhas superiores, inferiores, caule e raízes foram estudados por técnica de diagnose por subtração (Viégas *et al.*, 1997). Estes autores verificaram que todos os tratamentos com omissão afetaram a produção de matéria seca da planta quando comparados com o tratamento completo, sendo o mais afetado a omissão individual de nitrogênio (N).

Considerando que o safrol é extraído de ramos e folhas, Brasil e Viégas (1997) avaliaram o efeito da aplicação da adubação mineral de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) na produção de biomassa da parte aérea de pimenta longa, cultivada em um Latossolo Amarelo de textura média com devida correção da acidez. Não houve efeito significativo de P na produção de matéria seca, no entanto, esse nutriente otimizou a resposta da planta ao N e ao K.

A influência do balanço iônico na produção e no conteúdo de alcalóide em *Datura stramonium* L. (Solanaceae) tem sido estudada por Demeyer e Dejaegere (1992). É bem conhecido que as plantas podem absorver o N sob a

forma de nitrato (NO_3^-) ou amônia (NH_4^+). Embora NO_3^- seja freqüentemente a forma preferida, ambas têm vantagens e desvantagens características, dependendo das condições de solo e clima e das espécies de plantas consideradas. Plantas de *Datura stramonium* var. *tatula* L. torr. foram cultivadas em vermiculita e receberam duas soluções minerais diferentes. Num tratamento, somente N-NO_3^- foi adicionado, enquanto num outro tratamento, o N-NO_3^- foi parcialmente substituído (20%) pelo N-NH_4^+ . A dose total de N, também as relações interiônicas, foram mantidas constantes em ambos os tratamentos. Com o tratamento combinado ($\text{NO}_3^- - \text{NH}_4^+$), um conteúdo de hiosciamina altamente significativo foi encontrado quando uma mais alta biomassa foi alcançada. Isso foi aparentemente o resultado de um aumento na biossíntese do alcalóide. Também o conteúdo de escopolamina foi positivamente influenciado, mas somente no ponto de máxima produção de biomassa. Parece que mais N é disponível para o metabolismo secundário quando N-NH_4^+ está presente no meio de cultura (Demeyer e Dejaegere, 1992).

No caso de plantas consideradas medicinais, semelhante também para outras plantas, o crescimento e o desenvolvimento irregular podem ser observados freqüentemente. Encontrar a causa dessas anormalidades é algumas vezes difícil. Em muitos casos, deficiências de suplementação mineral são a causa das irregularidades do crescimento e do desenvolvimento. Experimentos conduzidos em vasos por um período de três anos, visando responder a questões sobre a produção de óleo essencial de "peppermint", a proporção dos principais componentes do óleo volátil (mentol, mentona e metilacetato) e de como eles podem ser influenciados pela falta dos nutrientes principais (N, P, K) têm sido realizados. Além disso, tem-se examinado se as conseqüências de suprimento incompleto podem ser cessadas dentro da vida do vegetal. No caso da falta completa de N e P, a produção do óleo essencial da "peppermint" decresce significativamente e muda a proporção dos componentes do óleo essencial. O

decréscimo mais baixo de produção de óleo essencial foi mostrado no caso da falta de K. Tratamentos feitos em ordem, para cessar as conseqüências do desenvolvimento inicial por causa da falta de N e P, aumentaram significativamente a produção de óleo volátil e variaram a proporção dos principais componentes do óleo. No caso da falta de K, o tratamento aumentou o conteúdo de óleo essencial num grau consideravelmente mais baixo (Praszna e Bernáth, 1993)

Atropa belladonna Linn., Solanaceae, é uma das plantas mais importantes usada mundialmente na medicina moderna devido a seus alcalóides tropanos: hyosciamina e hyoscina. Montanari Jr. *et al.* (1993) avaliaram os rendimentos de biomassa e alcalóides em condições subtropicais de cultivo, caracterizando também a influência da fertilização NPK em ensaio de campo. Os resultados de biomassa foram de 750 kg de folhas secas/ha no tratamento controle e de 1.700 kg/ha no adubado. Não houve diferença significativa entre os teores de atropina, sendo que as faixas de 0,54 - 0,67 e de 0,45 - 0,90% de atropina, encontradas respectivamente no controle e no adubado, estão dentro dos rendimentos obtidos em áreas tradicionais.

Plantas de *Cephaelis ipecacuanha* multiplicadas *in vitro*, e em seguida transferidas para casa-de-vegetação, foram submetidas semanalmente a diferentes concentrações dos sais do meio básico de Murashige e Skoog (1962) ('MS'). Após 6, 9 e 12 meses de cultivo, foram avaliados os pesos da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular e o conteúdo de emetina. Aos seis meses de cultivo, a solução nutritiva com 25% de concentração dos sais foi a que demonstrou tendência de maior acúmulo de biomassa e biossíntese de emetina. Durante o nono mês, as três variáveis tiveram maiores aumentos com a utilização da solução nutritiva com 50% de concentração dos sais, enquanto, aos 12 meses, a solução com 100% de concentração dos sais induziu a maior síntese de emetina (2,325%) e a solução com 50% promoveu a maior produção de

biomassa seca na parte aérea (1,52g) e no sistema radicular (4,94g) (Costa, 1995).

Moore (1945) estudou os efeitos das deficiências de enxofre (S), nitrogênio (N), fósforo (P), cálcio (Ca), potássio (K), ferro (Fe) e magnésio (Mg) em um clone de *Derris elliptica*, em cultura de areia. Os principais resultados foram os seguintes: restrição no crescimento da brotação, comum em todas as deficiências minerais, sendo mais severo nos tratamentos -K, -P, e -Ca; restrição na matéria seca da raiz maior nos tratamentos -K, -Ca e -Mg; padrões específicos de clorose apareceram nas folhas de todas as deficiências, exceto -N, -K e -Ca; raízes secas de plantas suplementadas com solução nutritiva completa tiveram 1,3% de rotenona, enquanto raízes secas do mesmo clone crescido no campo tiveram 5,2%; a qualidade da raiz, expressa como a concentração de rotenona + rotenóides, foi mais alta nas raízes tratadas com -S e mais baixa nas com -Mg, e o N orgânico solúvel foi diretamente correlacionado com a qualidade da raiz.

2.7 Cultura de tecidos

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais tem aberto grandes perspectivas em muitas áreas relacionadas com a produção vegetal, entre elas a micropropagação de muitas espécies vegetais, cultivo de linhagens livres de doenças, estudo do metabolismo primário e secundário e melhoramento de plantas. Através da cultura de tecidos, praticamente qualquer espécie vegetal pode ser regenerada *in vitro* utilizando vários processos (Dixon, 1985; Tisserat, 1985)

2.7.1 Cultura de calos

Uma massa de células desorganizadas, denominada calo, é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos. Em geral, o calo é o material de partida para a produção e o acúmulo de metabólitos secundários *in vitro*. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro e Floh, 1990).

O crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela curva de crescimento, que geralmente apresenta cinco fase distintas: fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. A fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia; a fase exponencial como biossintética; a fase linear caracteriza-se de diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio (O₂) no interior das células, e por último a fase estacionária, quando ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992).

A dediferenciação, ou seja, a reversão de células adultas a células juvenis pode ocorrer, levando a um processo de intensa multiplicação celular. Esse processo é mais lento do que quando são utilizadas células não diferenciadas e também mais dependente de reguladores de crescimento e de condições ambientais, principalmente luz e temperatura (Pierik, 1989).

Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985), em seu estudo, comprovou

que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; entretanto, quando adicionou citocinina, aumentou a proliferação do mesmo.

A textura do calo pode variar de compacta a friável e de macia a nodular. A coloração pode variar de acordo com o acúmulo dos compostos alvos e também depende da cultura ser fototrófica ou não fototrófica. Em muitos casos, a seleção de células produtoras é muito importante no acúmulo de metabólitos secundários.

Compostos secundários produzidos pela planta mãe, na maioria dos casos, não são encontrados em calos. Apenas a regeneração da raiz, dos brotos foliares e da própria planta restauram a produção destes compostos (Kawaguchi *et al.*, 1993). Em particular, o calo funciona como meristema e a não produção dos compostos secundários está relacionada com a alta atividade metabólica direcionada pela mitose. A diferenciação destas células, assim como a desaceleração da atividade mitótica, progressivamente, permitem o acúmulo dos metabólitos secundários.

2.7.2 Micropropagação

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto na moderna biotecnologia vegetal.

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), citado por Grattapaglia e Machado (1998), ao multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas.

A micropropagação pode ser conduzida por uma destas três maneiras: 1) multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares; 2) multiplicação

mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta e indireta e 3) multiplicação via embriogênese (Grattaplagila e Machado, 1998).

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

A propagação vegetativa de plantas medicinais, aromáticas e inseticidas segue as mesmas técnicas usadas para plantas de interesse agrônomico. As plantas podem ser regeneradas a partir de meristemas (embrião, ápices caulinares, gemas axilares) ou de tecidos não meristemáticos, através da organogênese ou embriogênese. Várias técnicas de propagação clonal têm sido usadas para plantas medicinais, aromáticas e inseticidas. As plantas regeneradas a partir de meristemas são geneticamente idênticas à planta original, sendo interessante do ponto de vista bioindustrial, visando a produção dos mesmos compostos naturais (Balandrin *et al.*, 1985; Balandrin e Klocke, 1985).

2.8 Metabólitos primários e secundários

As proteínas, os ácidos nucleicos e os polissacarídeos constituem as três classes de biomoléculas de alto peso molecular. Os lipídeos, polinucleotídeos, mono e polissacarídeos constituem as classes mais abundantes de compostos encontrados no reino vegetal. Estas moléculas de ocorrência ampla constituem os chamados metabólitos primários, enquanto aquelas de ocorrência restrita às espécies, gêneros ou famílias de plantas, constituem os compostos do metabolismo secundário. Denomina-se metabólito secundário todo composto orgânico de baixo peso molecular obtido a partir da biossíntese de qualquer

organismo vivo e que não seja metabolizado pelo organismo como fonte de carbono.

Os metabólitos secundários têm função de proteção *in vivo* nas plantas contra microorganismos patogênicos, contra a ação destruidora dos raios ultravioleta (U.V.), como repelentes de insetos predadores. Também podem atuar como atraentes de polinizadores, inibidores de crescimento na competição entre vegetais, e em insetos como precursores de ferohormônios sexuais ou como defesa. Devido ao fato dos metabólitos secundários possuírem estas propriedades com valores intrínsecos nas plantas, muitos destes produtos podem ser comercializados e usados como inseticidas na agricultura e fármacos na indústria de medicamentos.

A química de produtos naturais tem promovido avanços no processo de obtenção e no entendimento das funções e aplicações dos metabólitos secundários com benefícios sociais. Já a bioquímica tem contribuído bastante no entendimento da formação dos metabólitos e das enzimas envolvidas no processo. A aplicação da biotecnologia permite estudar as rotas biossintéticas, assim como, através da engenharia genética, produzir plantas transgênicas que apresentem melhor resistência aos ataques de pragas e de doenças; obter melhores rendimentos na produção dos compostos secundários de interesse e melhor adaptação ao meio ambiente.

2.9 Biossíntese dos metabólitos secundários

Os produtos secundários de plantas são usados em benefício do homem como fonte de flavorizantes, inseticidas e como fármacos em geral. As plantas são, também, fontes de vitaminas e matérias primas para a fabricação de utensílios.

Por longo período, os metabólitos secundários foram considerados produtos finais do metabolismo, sem funções definidas para as plantas,

(Mitscher *et al.*, 1984), isoflavanas e isoflavanonas. Os isoflavonóides são compostos que, em geral, possuem atividade antimicrobiana (Honda e Tabata, 1982).

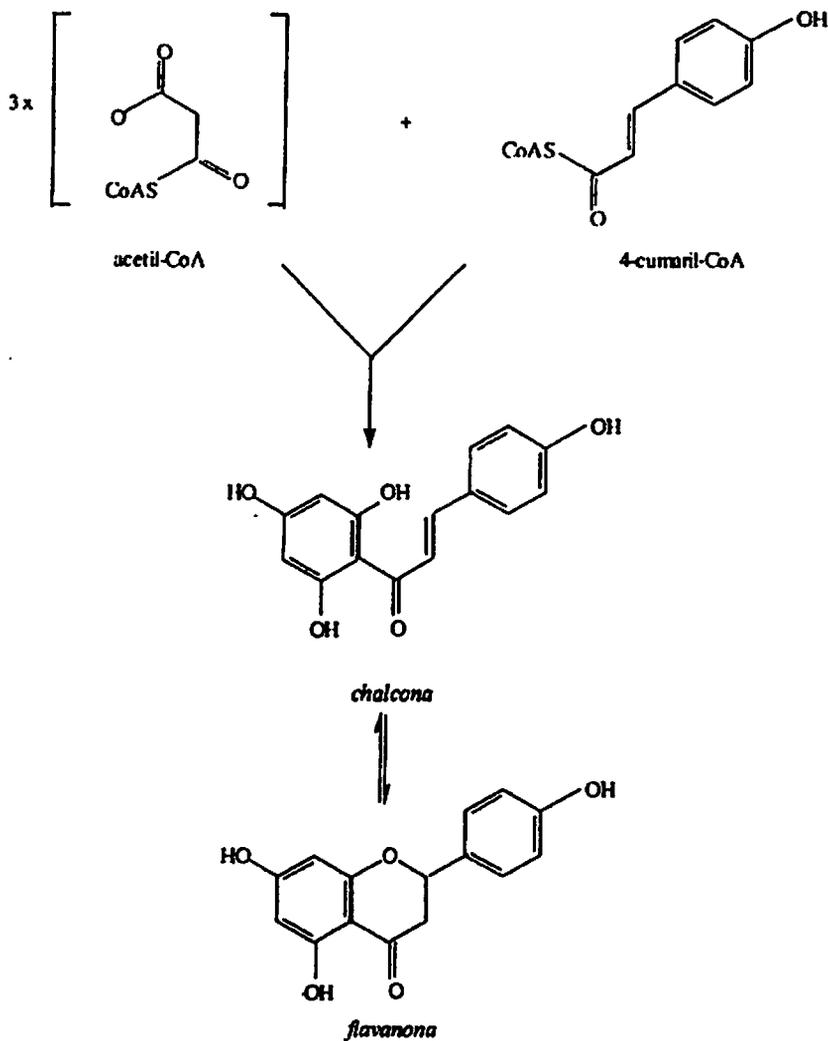


FIGURA 5 – Biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. UFLA, Lavras - MG, 2000.

organismo vivo e que não seja metabolizado pelo organismo como fonte de carbono.

Os metabólitos secundários têm função de proteção *in vivo* nas plantas contra microorganismos patogênicos, contra a ação destruidora dos raios ultravioleta (U.V.), como repelentes de insetos predadores. Também podem atuar como atraentes de polinizadores, inibidores de crescimento na competição entre vegetais, e em insetos como precursores de ferohormônios sexuais ou como defesa. Devido ao fato dos metabólitos secundários possuírem estas propriedades com valores intrínsecos nas plantas, muitos destes produtos podem ser comercializados e usados como inseticidas na agricultura e fármacos na indústria de medicamentos.

A química de produtos naturais tem promovido avanços no processo de obtenção e no entendimento das funções e aplicações dos metabólitos secundários com benefícios sociais. Já a bioquímica tem contribuído bastante no entendimento da formação dos metabólitos e das enzimas envolvidas no processo. A aplicação da biotecnologia permite estudar as rotas biossintéticas, assim como, através da engenharia genética, produzir plantas transgênicas que apresentem melhor resistência aos ataques de pragas e de doenças; obter melhores rendimentos na produção dos compostos secundários de interesse e melhor adaptação ao meio ambiente.

2.9 Biossíntese dos metabólitos secundários

Os produtos secundários de plantas são usados em benefício do homem como fonte de flavorizantes, inseticidas e como fármacos em geral. As plantas são, também, fontes de vitaminas e matérias primas para a fabricação de utensílios.

Por longo período, os metabólitos secundários foram considerados produtos finais do metabolismo, sem funções definidas para as plantas,

entretanto com propriedades biológicas importantes sendo exploradas pelo homem. Nos dias atuais, evidências experimentais mostram que os metabólitos secundários são biossintetizados tanto pelas plantas quanto por outros organismos, devido às suas interações com o meio ambiente (Williams e Harborne, 1989).

Para serem efetivos como moléculas de defesa, os metabólitos secundários precisam ser produzidos e armazenados em concentrações suficientes nos órgãos e sítios intracelulares específicos. Alguns compostos secundários são biossintetizados e acumulados no mesmo local da biogênese (Sauerwein, Ishimaru e Shimomura, 1991), outros são transportados e em seguida acumulados em órgãos diferentes do local da biossíntese (Dawson, 1941; Dawson, 1942 citados por Santos, 1996). A biossíntese de determinados compostos secundários pode ocorrer em todos os tecidos e células de uma dada espécie vegetal devido à totipotência celular. Entretanto, como via de regra, a biossíntese é restrita a determinado órgão, tecido e/ou célula especializada e está relacionada com a diferenciação e o desenvolvimento celular (Wiermann, 1981). Dentro da célula, existem sítios específicos de biossíntese de natureza lipo e hidrofílica que armazenam os produtos secundários de acordo com suas propriedades. Alguns precursores, assim como a própria molécula, podem ser transportados intra ou intercelularmente através de transporte passivo ou ativo (Brodelius e Pedersen, 1993).

2.10 Os isoflavonóides e o grupo dos rotenóides

Os isoflavonóides são compostos orgânicos obtidos a partir de plantas e cuja distribuição no reino vegetal é restrita a algumas famílias. Geralmente são encontrados nas raízes, possuindo uma estrutura básica 1,3-bisfenilpropanóide, que é formada, somente a partir da flavonona, através de um rearranjo do grupo fenila na estrutura cromanona (Figura 5). Os isoflavonóides representam uma

subclasse dos flavonóides muito distinta e importante. Ao contrário dos flavonóides, os isoflavonóides têm uma distribuição muito limitada no reino vegetal e são quase que inteiramente restritos à família Leguminosae, principalmente na subfamília Papilionoideae (Dewick e Martin, 1979; Dewick, 1988). São encontrados, também, nas subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae (Dewick, 1988). Outras famílias conhecidas por produzirem isoflavonóides, mas em pequeno número, são Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Menispermaceae, Moraceae, Myristicaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Stemonaceae, Zingiberaceae (Dewick, 1988) e Nictaginaceae (Messana, Ferrari e Sant'Ana, 1986; Kadota *et al.*, 1989).

A larga variação dos isoflavonóides surpreende em relação à sua distribuição restrita no reino vegetal, o que é alcançado com a diversificação de anéis homo e heterocíclicos, diferentes níveis de oxidação e incorporação de grupos alifáticos e/ou oxigenados. Dentro da subclasse dos isoflavonóides encontram-se seus grupos constituintes: Isoflavonas, isoflavononas, rotenóides (cuja a característica principal é a presença de um carbono extra ligado em C-2 na estrutura da isoflavona, que forma o segundo anel heterocíclico, levando ao grupo dos rotenóides; esse grupo de compostos é subdividido em três subgrupos de acordo com os níveis de oxidação no sistema de anel rotenoídico: subgrupos -rotenóides, 12a-hidróxi-rotenóides e de-hidrorrotenóides) (Figura 6), pterocarpanos, isoflavanos, isoflavenos, coumaronacromonas, 3-arilcoumarinas, coumestanos, α -metildesoxibenzoinas, 2-arilbenzofuranos e oligômeros (Dewick e Martin, 1979; Dewick, 1988; Simões *et al.*, 1999).

Supõe-se que os isoflavonóides atuem como antibióticos, pois no solo estão presentes muitos microorganismos que se infiltram, principalmente nas raízes dos vegetais. Os isoflavonóides são produzidos nas raízes, supostamente no combate a estes agentes invasores. Na maioria dos casos, os isoflavonóides são produzidos como fitoalexinas e esta atividade é atribuída aos pterocarpanos

(Mitscher *et al.*, 1984), isoflavanas e isoflavanonas. Os isoflavonóides são compostos que, em geral, possuem atividade antimicrobiana (Honda e Tabata, 1982).

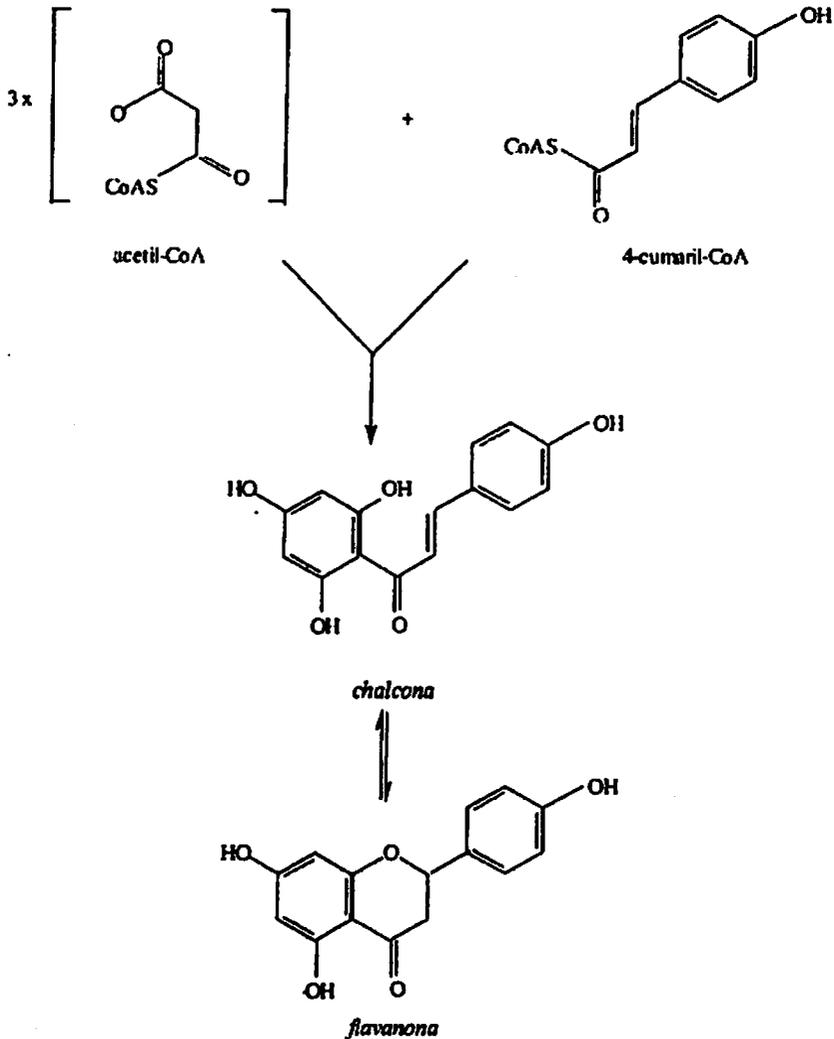


FIGURA 5 – Biossíntese de flavonóides e isoflavonóides. UFLA, Lavras - MG, 2000.

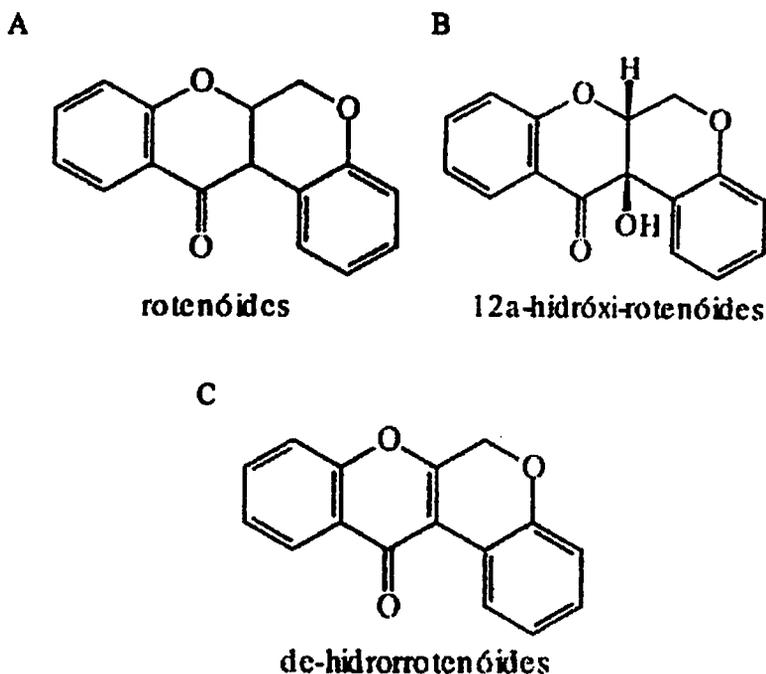


FIGURA 6 – Estruturas de compostos rotenóides. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Outras funções atribuídas aos isoflavonóides são: atividade inseticida, atribuída principalmente aos rotenóides (Birch, Crombie e Crombie, 1985); atividade estrogênica, atribuída às isoflavonas e ao coumestanol (Gil, Rairez e Diaz, 1984); função alelopática, uma isoflavona atua como sinal de reconhecimento da planta hospedeira *Astragalus spp.* pela planta parasita *Agaliun purpurea* (Scrophulariaceae) (Steffens *et al.*, 1982) e a atividade biológica mais recente atribuída aos isoflavonóides, a anti-alimentar de insetos (função deterrente) (Dewick, 1988).

As seguintes atividades biológicas de isoflavonóides foram observadas: anti-arterosclerótica, atribuída à isoflavona genisteína-8-O-glicosídeo (Laman e Oleksrusk, 1982); efeito dilatador coronário, atribuído à isoflavona 7-hidróxi-4', 8-dimetoxiisoflavona (Chen *et al.*, 1983); inibição da fosfodiesterase coronária, atribuída aos rotenóides (Petov *et al.*, 1983); inibição da biossíntese de

prostaglandinas, atribuída à glicopiranosil deidazeína, uma isoflavona isolada de *Dalbergia odorifera* (Goda *et al.*, 1985); antídoto oral contra venenos de cobra e aranha, atribuído aos pterocarpanos cabenegrina A-I e cabenegrina A-II (Nakagawa *et al.*, 1982), e atividade ictiotóxica, atribuída à rotenona.

2.11 Isoflavonóides obtidos em cultura de tecidos

Na maioria dos casos, os isoflavonóides obtidos *in vitro*, são fitoalexinas. Em geral, como toda fitoalexina, são lipofílicas, e devido às suas atividades biológicas, os mesmos são de grande interesse. A produção de isoflavonóides usando cultura de tecidos apresenta algumas vantagens sobre algumas outras classes de metabólitos secundários:

- 1 - As enzimas das rotas dos fenilpropanóides já são bastante conhecidas,
- 2 - Muitas enzimas que formam os isoflavonóides também são conhecidas, e as principais são *L* – fenilalanina amônia liase (PAL), chalcona sintetase (CHS) e chalcona isomerase (CHI) (Dixon e Lamb, 1990),
- 3 - Alguns indutores, assim como os reguladores de crescimento que ativam estas enzimas, produzindo alguns isoflavonóides em concentração mais elevadas que na planta de origem, são conhecidos,
- 4 - Em geral, elicitores bióticos ativam enzimas da rota dos fenilpropanóides *in vitro*

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSE, A.M.; HAAG, H.B. Toxicological studies of *derris*. **Industrial Engineering Chemistry**, Washington, v.30, p.815-821, 1938.

✕ BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A. Medicinal plants. **Science**, Washington, v.229, n.4718, p.1036-1038, Sept. 1985.

✕ BALADRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal material. **Science**, Washington, v.228, n.4704, p.1154-1160, June 1985.

BIRCH, N.; CROMBIE, L.; CROMBIE, W.M. Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, n.12, p.2881-2883, Dec. 1985.

BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES – Comitê Técnico de Sementes Florestais. 1993. C.3. p.83-135.

BRASIL, E.C.; VIÉGAS, I. de J.M. Efeito da adubação NPK na produção de matéria seca de pimenta longa (*Piper hispidinervium*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: , 1997. 3p.

BRODELIUS, P. e PEDERSEN, H. **Biotechnology**. 11: 30, 1993.

CAMINHA FILHO, A. **Timbó e rotenona: uma riqueza nacional inexplorada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1940. 14p.

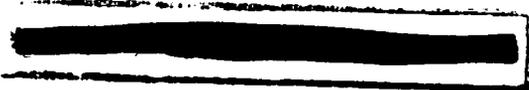
CHEN, C.C.; CHEM, Y.L.; CHN, Y.P.; HSU, H.Y. **Tai wan Yao Hsuch Tsa Chic**. 35: 89 (**Chemical Abstracts** 1983, 99, 191649).

CORBETT, C. E. **Plantas ictiotóxicas: farmacologia da rotenona**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1940. 157p. (Mimeografado).

- COSTA, M.P. da. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. Lavras: UFLA, 1995. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).**
- COSTA, J.P.C. Efeito da variabilidade de timbós de diferentes regiões da amazônia em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). Jaboticabal: UNESP-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, 1996. 119p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).**
- CRAVERO, E.S.; GUERRA, M. de S.; SILVEIRA, C.P.D. da. Manual de inseticidas e acaricidas: aspectos toxicológicos. Pelotas: Aimara, 1976. 229p.**
- CROCOMO, O. J.; MELO, M. Practical aspects of the production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R.; MELO, M. (eds). Biotecnologia para produção vegetal. Piracicaba: Cebetc/Fealq, 1991. p.373-389.**
- CROMBIE, L.; WHITING, A.D. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry*, Oxford, v.49, n.6, p.1479-1507, June 1998.**
- DEMEYER, K.; DEJAEGERE, E. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO_3^- , NH_4^+) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. *Plant and Soil*, The Hague, v.147, n.1, p.79-86, Nov. 1992.**
- DEWICK, P.M. Isoflavonoids. In: HARBORNE, J.B. (ed). *The Flavonoids*. London: Chapman and Hall, 1988. p.125-209.**
- DEWICK, P.M.; MARTIN, M. *Phytochemistry*. v.18, n.4, p.597, 1979.**
- DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture. In: DIXON, R.A. (ed). *Plant cell culture - a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.1-20.**
- DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Regulation of secondary metabolism at the biochemical and genetic levels. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. (eds). *Secondary products from plant tissue culture*. Oxford: Oxford University Press, 1990. p.103-118.**

- FLEMMING, W.E.; BAKER, F.E. Report on *Derris* and its constituents as insecticides and repellents against the Japanese beetle, along with tests miscellaneous materials. New Jersey: Laboratory Report, 1934. 40p.
- GERSDORFT, W.A. A study of toxicity of toxicarol, deguelin and tephrosin using the goldfish as the test animal. *Journal of the American Chemistry Society*, v.53, p.1897-1901, 1931.
- GIL, L.A.; RAIREZ, J.; DIAZ, J.C. Turrialba. 34: 437, 1984. (*Chemistry Abstract*. 1985, 103, 51316).
- GÖBEL, E.F. A toxicologia do extrato de timbó e rotenona e sua aplicação na medicina humana e veterinária. Uma lenda dos índios amazonenses. *Revista de Química Industrial*, Rio de Janeiro, v.9, n.66, p.27-30, 1937.
- GODA, Y.; KATAYAMA, M.; ICHICAWA, K.; SHIBUYA, M.; KIUCHI, F.; SAKAWA, U. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.33: 5606, 1985.
- GORDON, A.; COPPEN, J.J.W. Trends in demand for amazonian gums, resins and rotenoid insecticides and an assessment of their developmental potential, with particular reference to Brazil. Kent: Natural Resources Institute, 1993. 43p. (Relatório – NRI Project N° T0391).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p.183-260.
- HAAG, H.B. Toxicological studies of *Derris elliptica* and its constituents. I. Rotenone. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, v.43, p.193-208, 1931.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/Embrapa/CNPq, 1990. p.203-212.
- HANRIOT, M. M. Sur les substances actives du *Tephrosia vogeli*. *C. R. Acad. Séances*, v.44, n.144, p.150, 1907.
- HONDA, G.; TABATA, M. *Planta Medica*. 46: 122, 1982.

- KADOTA, S.; LAMI, N.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.37, n.12, p.3214, 1989.
- KAWAGUCHI, K.; ASAKA, I.; HIROTANI, M.; FURUYA, T.; KATSUKI, S. Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.5, p.1317-1321, May 1993.
- LAMAN, N.A.; OLEKSRUSK, L.P. **Vestsi Akad Navuk BSSR, Ser Byral Navuk** 101 (Chemical Abstracts 1982, 97, 3540), 1982.
- LAPA, A.J. et al. The pharmacology of timbós: toxic plants used to fish. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1978, Campinas. Anais...**, Campinas: 1978, p.43-46.
- LeCOINTE, P.M. Les plantes à rotenone en Amazonie. **Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale**, Paris, n.180, p.609-615, 1936.
- LIMA, R. R. Os timbós da Amazônia brasileira. **Boletim do Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, v.36, n.7/12, p. 14-29, 1947.
- LIMA, R. R. Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1987. 23p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 42).
- LIMA, R. R.; COSTA, J. P. C. da. Registro de introdução de plantas de cultura pré-colombiana coletadas na Amazônia brasileira. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1991. 210p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 58).
- LIMA, R.R.; COSTA, J.P.C. da. Coleta de plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia brasileira. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998. 102p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 107).
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1997, 319p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. New York: Academic Press, 1995. 889p.

- 
- MESSANA, I.; FERRARI, F. e SANT'ANA, A.E.G. Two 12a-hydroxyrotenoids from *Boerhaavia coccinea*. *Phytochemistry*, Oxford, v.25, n.11, p.2688-89, 1986.
- METIVIER, J.R. Dormência e germinação. In: FERRI, M.G. (Coord.). *Fisiologia Vegetal 2*. 2.ed. São Paulo: EPU, 1986. p.343-392.
- MITSCHER, L.A.; DRAKES, S.; CALAPENDI, S.R.; OKWUTE, S.K. *Journal of Natural Products*, Downers Grone, v.50: 1025, 1984.
- MONTANARI Jr.; FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P.M. e RODRIGUES, N. Influência da fertilização NPK na biomassa e no teor de alcalóides de *Atropa belladonna*, Linn. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Ribeirão Preto, v.5, n.1, p.71, 1993.
- MOORE, R.H. Mineral deficiencies in *Derris elliptica*. San José: Federal Experiment Station in Puerto Rico/USDA, 1945. 26p. (Bulletin, 43).
- MORS, W. Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.32, p.42, 1978a. Suplemento
- MORS, W. Plantas ictiotóxicas: aspectos químicos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1978, Campinas. *Anais...* Campinas, 1978b. p.42.
- MORS, W. Plantas medicinais. *Ciência hoje* 1(3): 14-19, 1982.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAKAGAWA, M.; NAKANISHI, K.; DARKO, L.I.; VICK, J.A. *Tetrahedron Letters*, v.23: 3855, 1982.
- PETOV, E.; UZUNOV, P.; KOSTOVA, I.; SOMLEVA, T.; ORGISJANOV, I. *Planta Medica*, v.47: 273, 1983.
- PIERIK, R.L.M. 1989. *In vitro culture of higher plants*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1989, p.202-220.
- PINTO, A. N. Os timbós e suas aplicações e possibilidades. *Química e Indústria*, p. 247, 1937

- PIRES, J.M. Plantas ictiotóxicas: aspecto da botânica sistemática. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1978, Campinas. Anais ...Campinas: SBPC, 1978. p.37-41.
- PRASZNA, L.; BERNÁTH, J. Correlations between the limited level of nutrition and essential oil production of peppermint. *Acta Horticulturae*, Montreal, n.344, p. 278-289, 1993.
- RAIZADA, M.B.; VARMA, B.S. Plantes des indes ichtyotoxiques. *Revue de Botanique Appliquée et Agriculture Tropicale*, n.194, p.752-757, 1937.
- ROARK, R.C. Rotenone. *Industrial Engineering Chemistry*, Washington, v.25, p.639, 1933.
- ROARK, R.C. *Lonchocarpus species* (barbasco, cube, haiari, nekoe and timbó) used as insecticides. Washington: United States Department of Agriculture, 1936. 133p.
- SANTOS, A.S. Indução da produção e acúmulo de coccineonas (isoflavonóides) em cultura de tecidos de *Boerhaavia coccinea* P. Miller. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 1996. 156p. (Dissertação - Mestrado em Química Orgânica).
- SAUERWEIN, M.; ISHIMARU, K.; SHIMOMURA, K. Indole alkaloids in hairy roots of *Amsonia elliptica*. *Phytochemistry*, Oxford, v.30, n.4, p.1153-1155, Apr. 1991.
- SILVA, F. F. da. Os timbós. *Boletim de Agricultura, Zootecnia e Veterinária*, São Paulo, n.19, p.15-34, 1934.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, C.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, 1999. 821p.
- SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992, 172p.
- SOUZA, H. B. de. Novas perspectivas de emprego do timbó como inseticida. *N. Agron.*, v.2, n.2, p.42-44, 1955.
- STEFFENS, J.C.; LYNN, D.G.; KAMAT, V.S.; RIOPEL, J.L. *Annual Biotechnology*. v.50, 1982.

- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed). *Plant cell culture - a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p. 79-105.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília: Embrapa-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.11-20.
- VICKERY, M. L.; VICKERY, B. *Secondary plant metabolism*. Londres: The Macmillan press LTC, 1981. 335p.
- VIÉGAS, I. de J.M.; CARVALHO, J.G. de; CONCEIÇÃO, H.E. O. da ; SANTIAGO, E.J.A. de. Sintomas de macronutrientes em plantas de jaborandi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS, 1997, Rio de Janeiro. *Anais...*Rio de Janeiro: SBSNP, 1997. 3p.
- WARE, G.W. *The pesticide book*. 4. ed. Fresno: Thomson Publications, 1993. p.57-62.
- WIERMANN, R. Secondary Products and Cell and Tissue Differentiation. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds). *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 1981. v.7, p.85-115.
- WILLIAMS, C.; HARBORNE, J.B. Isoflavonoids. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (eds). *Methods in plant biochemistry*. V.1, New York: Academic Press, 1989. v.1, p.427-428.
- WILLIAMS, L. A peruvian fish poison. *Flad. Mus. Nat.*, v.5, n.8, p.4, 1934.
- ZOGHBI, M. G. B. *et al.* Isolamento de cumestrol de uma espécie de *Derris*. *Acta Amazônica*, Manaus, v.18, n.1/2, p.57-60, mar./jun. 1988.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE PLÂNTULAS DE TIMBÓ EM CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*

1 RESUMO

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **Produção de plântulas de timbó em condições de cultivo *in vitro***. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*.

Estudos sobre propagação e crescimento de espécies de timbós são escassos, desta forma, este trabalho teve como objetivo verificar a influência de variações de concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Derris urucu* em condições de cultivo *in vitro*. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados através das seguintes variáveis de resposta: número de sementes germinadas aos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 dias de cultivo *in vitro*; número de folhas, comprimento do caule e biomassa fresca e seca da raiz, caule e folha (MFR, MFC, MFF, MSR, MSC e MSF, respectivamente) após 12, 24 e 35 dias de cultivo. Sementes de *D. urucu* iniciaram a germinação a partir do terceiro dia de cultivo, no sexto dia atingiram 50% e aos doze dias alcançaram 85% de germinação em meio nutritivo 'MS' formulado com diferentes concentrações dos sais dos macro e micronutrientes deste meio básico. O número de sementes germinadas de *D. urucu* não foi afetado pelas variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'. A melhor resposta de crescimento de plântulas de *D. urucu*, em condições de cultivo *in vitro*, foi proporcionada pela formulação constituída com 50% dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

2 ABSTRACT

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **“Timbó” plantlet production under conditions of in vitro cultivation.** Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)*.

Studies on the propagation and growth of “timbó” species are scarce, thus, this was intended to verify the influence of variations of concentrations of the macro and micronutrient salts of the ‘MS’ nutrient medium on the germination of seeds and growth of *Derris urucu* seedlings under conditions of in vitro cultivation. The effects of the treatments were evaluated through the following response variables: number of seeds germinated at 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 days in vitro cultivation; number of leaves, stem length and fresh and dry biomass of the root, stem and leaf (MRF, MFC, MFF, MSR, MSC and MSF, respectively) after 12, 24 and 35 days of cultivation. *D. urucu* seeds started their germination from the third day of cultivation, on the sixth day they reached 50% and at 12 days they attained 85% of germination in ‘MS’ nutrient medium formulated with different concentrations of the macro and micronutrient salts of this basic medium. The number of seeds germinated of *D. urucu* was not affected by the variations of the concentrations of the macro and micronutrient salts of the ‘MS’ nutritive medium. The best growth response of *D. urucu* seedlings under conditions of in vitro cultivation was provided by the formulation made up of 50% of the macro and micronutrient salts of the ‘MS’ nutrient medium.

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

3 INTRODUÇÃO

Existem muitas plantas com propriedades ictiotóxicas e inseticidas; entretanto, dentre essas destacam-se os timbós brasileiros, cujo uso tem sido relatado há bastante tempo. *Derris urucu* e *Derris nicou* são as principais espécies de timbós produtoras de rotenona (Lima, 1987).

O uso de plantas inseticidas é especialmente predominante em países em desenvolvimento, nos quais elas crescem localmente como recursos genéticos renováveis se são manejadas corretamente, sendo o seu uso mais barato do que os pesticidas químicos sintéticos. Comercialmente, contudo, somente algumas destas plantas, isto é, aquelas que contêm piretro, rotenóides e certos alcalóides, têm sido usadas em alguma extensão, nos Estados Unidos da América do Norte, como fonte de inseticidas (Gordon e Coppen, 1993). Rotenona e rotenóides têm sido usadas como inseticidas e piscicidas.

O habitat dos timbós é a imensa floresta equatorial da planície amazônica, alargando-se para as Guianas e alguns países do mar das Antilhas (Gomes, 1946). As pequenas culturas de timbós existentes nas proximidades das cidades de Belém, Gurupá e Acará, no Pará, e ao longo do Rio Amazonas até Iquitos, no Peru, apresentam um desenvolvimento magnífico. São regiões equatoriais, recebendo, em regra, mais de 2.000 mm de chuvas anuais, distribuídas na maior parte do ano, principalmente de outubro a maio.

Os timbós respondem desfavoravelmente quando crescem fora do seu habitat natural. Moore (1945), trabalhando com uma outra espécie de timbó, a *Derris elliptica*, cujo habitat natural são as ilhas do Sudeste do Pacífico, verificou diferenças marcantes no crescimento e na produção de rotenona e rotenóides em experimento sobre omissão de macronutrientes, em condições de cultivo em areia, em Porto Rico.

Os efeitos de fatores internos e externos que interferem na germinação de sementes de plantas cultivadas em condições de cultivo *ex vitro* são complexos e já foram amplamente documentados por vários autores (Carvalho e Nakagawa, 1983; Popinigis, 1985; Lima e Garcia, 1996); porém, pouco tem sido investigado nas espécies nativas e/ou em fase de domesticação e, em especial, sob condições de cultivo *in vitro*.

Dentre os problemas apresentados pelos timbós, destacam-se aqueles relacionados com a propagação sexual de *D. nicou*, visto que esta espécie floresce com extrema raridade. A propagação vegetativa das espécies também oferece dificuldades. Estudos sobre a propagação e o crescimento de timbós são escassos; desta forma, este trabalho teve como objetivo verificar a germinação de sementes e o crescimento de plântulas de timbó em condições de cultivo *in vitro*, em meio nutritivo formulado com cinco concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de Murashige e Skoog (1962) ('MS').

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Aspectos gerais da germinação de sementes

Para Labouriau (1983), a germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado botanicamente como a retomada do crescimento do embrião, com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula. Todavia, para os tecnólogos de sementes, a germinação é reconhecida como tal desde que as plântulas apresentem tamanho suficiente para que se possam avaliar a normalidade de suas partes e a sua possibilidade de sobrevivência. Do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (Borges e Rena, 1993).

Pancholi, Wetten e Caligari (1995) compararam a germinação *in vivo* com a cultura *in vitro* de embriões, em *Musa velutina*. A germinação *in vivo* alcançou 78% após 9 meses da sementeira. Embriões excisados e inoculados em meio nutritivo 'MS', a meia força, com ou sem suplementação de várias concentrações de ácido giberélico e incubados em condições de luz e de escuro, alcançaram 82% de germinação após duas semanas de cultivo no escuro, em meio nutritivo contendo 0,1 μ M de ácido giberélico.

Beltrão e colaboradores (1999) realizaram estudos sobre a germinação *in vitro* de sementes coletadas de frutos maduros de *Rauwolfia ternifolia*. Quanto à germinação em condições de cultivo *in vitro*, este processo iniciou-se após 14 dias de incubação em tubos de ensaio com meio de cultura de Knop.

Coelho (1999), realizando testes de germinação *in vitro* com sementes seccionadas e embriões de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.], em 'MS' líquido a meia força, suplementado com vitaminas de 'MS' e 2% de sacarose, verificou que os embriões foram superiores em todas as características avaliadas. A mesma autora, realizando outro teste de germinação *in vitro* com sementes escarificadas e embriões de sucupira branca em 'MS', a meia força, suplementado com vitaminas de 'MS' e 2% de sacarose, reporta a existência de diferenças significativas dos fatores estudados para todas as características avaliadas, detectando a superioridade dos embriões sobre as sementes escarificadas.

A germinação de sementes e de embriões em condições de cultivo *in vitro* tem sido usada para várias espécies de plantas. O emprego dessa técnica da cultura de tecidos tem sido necessário para estudar problemas de dormência de sementes, testar viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamento incompatível (Hu e Ferreira, 1990; Pasqual, Ribeiro e Ramos, 1990; Coelho, 1999) e obter explantes jovens e assépticos para diversos estudos em condições de cultivo *in vitro* (Pasqual e Barros, 1992; Pinto et al., 1994).

4.2 Crescimento de plântulas *in vitro*

A quantidade de nutrientes exigida pela planta é função dos seus teores no material e do total de matéria seca produzida. Os minerais são o grupo de nutrientes mais importante após a fonte de carboidratos, para o desenvolvimento *in vitro*. O meio de cultura mais popular é o 'MS' de Murashige e Skoog (1962), justamente porque a maioria das espécies reage favoravelmente. Entretanto, o meio nutritivo nem sempre é favorável para o crescimento e desenvolvimento dos explantes comumente usados nas técnicas de cultura de tecidos, devido à alta composição dos sais minerais.

Santiago (1999) e Santiago *et al.* (1999) verificaram, em pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.), após 75 dias de cultivo *in vitro*, que a redução do nitrogênio amoniacal do meio nutritivo 'MS' não afetou expressivamente os pesos das matérias fresca e seca da plântula quando associado à dosagem normal e duplicada de fósforo. Os autores relatam que a suspensão do nitrogênio amoniacal do meio nutritivo 'MS', mantendo-se apenas o nitrato (KNO_3), proporcionou um maior crescimento em peso das matérias fresca e seca das plântulas de pimenta longa cultivadas *in vitro*. O aumento na relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proporcionou um aumento considerável na produção de matéria seca total.

Para Caldas, Haridasan e Ferreira (1998), os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Influência da concentração dos sais de 'MS' na germinação de sementes e crescimento de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*.

Dois experimentos foram conduzidos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, no período de abril a junho de 1998.

5.1.1 Efeitos de concentrações dos sais de 'MS' sobre a germinação de sementes de *Derris urucu* em condições de cultivo *in vitro*.

5.1.1.1 Desinfestação das sementes

Sementes de *D. urucu* de exemplares do clone 37, do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, foram desinfestadas em etanol 70% durante 60 segundos. Depois em solução de hipoclorito de sódio a 60% da formulação comercial por 15 minutos, sob agitação. Em condições de sala de inoculação, sob ambiente de câmara de fluxo laminar horizontal, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

5.1.1.2 Tratamentos e condições de cultivo

Os tratamentos, em número de cinco, foram obtidos variando as concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS' em 1/1; 1/2; 1/4; 1/8 e 1/16, sem regulador de crescimento. Os meios de cultura foram solidificados com 0,7% de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. A inoculação das sementes foi feita em condições assépticas, colocando 10 sementes por placa de petri contendo 20 mL de meio de cultura de cada tratamento, e em seguida fazendo a vedação da mesma com filme de polietileno.

Todos os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento durante 12 dias, sob irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura e umidade relativa do ar de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e $70\pm 5\%$, respectivamente, e fotoperíodo de 16 h. A variável de resposta estudada foi o número de sementes germinadas (NSG) aos 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 e 12 dias de cultivo *in vitro* (DCIV). A germinação de sementes foi considerada quando a protrusão do sistema radicular apresentava pelo menos 0,5 cm de comprimento.

5.1.1.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 4 repetições, cada uma constituída por uma placa de petri contendo 10 sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para a variável em questão.

5.1.2 Efeitos de concentrações dos sais de 'MS' no crescimento de plântulas de *Derris urucu* em condições de cultivo *in vitro*.

A desinfestação das sementes e as condições de cultivo *in vitro* foram as mesmas descritas para o experimento 5.1.1.

5.1.2.1 Tratamentos e variáveis de respostas

As sementes foram inoculadas em meio básico de 'MS', variando-se as concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS' em 1/1; 1/2; 1/4; 1/8 e 1/16, sem regulador de crescimento, os quais constituíram um dos fatores estudados. As variáveis de respostas estudadas foram número de folhas (NF), comprimento do caule (CC), matéria fresca da raiz (MFR), matéria fresca do caule (MFC), matéria fresca folha (MFF), matéria seca da raiz (MSR), matéria

seca do caule (MSC) e matéria seca da folha (MSF) aos 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* (DCIV).

5.1.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 (5 concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS' - M e 3 épocas de avaliação - DCIV), com 6 repetições, cada uma constituída por 2 tubos de ensaio de vidro de 150 x 25 mm. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para as variáveis em questão, e quando significativos, procederam-se as análises de regressão polinomial de acordo com Pimentel Gomes (1990).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeitos de concentrações dos sais de 'MS' sobre a germinação de sementes de *Derris urucu* em condições de cultivo *in vitro*.

O resultado da análise de variância dos dados é apresentado na Tabela 1. Observa-se que aos doze dias de cultivo *in vitro*, o número de sementes germinadas de timbó não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos, ou seja, as variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS' não interferiram nesta variável até aos doze dias de cultivo *in vitro*. De modo geral, verificou-se que a germinação das sementes de timbó inicia-se no terceiro dia, e a partir do sexto dia, todos os tratamentos já mostravam um número de sementes germinadas superior a 50%. Aos doze dias de cultivo *in vitro*, o número de sementes germinadas variou de 70 a 85%, respectivamente para os tratamentos constituídos com $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'. Pancholi, Wetten e Caligari (1995), estudando a germinação de embriões de

Musa velutina, relatam que 82% de germinação foram obtidos após duas semanas de cultivo na obscuridade, em meio nutritivo 'MS' a meia força, suplementado com 0,1 μ M de ácido giberélico. Resultados semelhantes têm sido relatados por Coelho (1999) para sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth].

TABELA 1 – Resumo da análise de variância para número de sementes germinadas (NSG) de timbó avaliadas aos 12 dias de cultivo *in vitro*. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹
Meio de cultura	4	1,8250 ^{NS}
Resíduo	15	2,7500
Média	-	7,6500
CV (%)	-	21,6770

¹ ns = não significativo a 0,05 de probabilidade pelo teste F.

Estudos de germinação *in vitro* envolvendo diversos fatores deste processo têm sido relatados para várias espécies de plantas (Beltrão e colaboradores, 1999; Hu e Ferreira, 1990; Pasqual, Ribeiro e Ramos, 1990; Pasqual e Barros, 1992; Pinto *et al.*, 1994; Pancholi, Wetten e Caligari, 1995).

Fidelis (1998) estudou, em condições de cultivo *in vitro*, os efeitos da presença ou não do tegumento da semente, de duas condições de fotoperíodo e de quatro concentrações de sacarose em sementes de mama-cadela (*Brosimum guadichaudii* Tréc.). O autor relata respostas diferenciadas de germinação de acordo com os tratamentos usados. Contudo, na comparação geral dos tratamentos, houve superioridade da presença de tegumento da semente e das concentrações de sacarose, até 7%, sobre a germinação de sementes desta espécie.

Coelho (1999) relatou a superioridade, em teste de germinação em condições de cultivo *in vitro*, de embriões sobre sementes seccionadas de sucupira branca, cultivadas em meio líquido diluído para metade da força dos

sais dos macro e micronutrientes de 'MS' suplementado com vitaminas de 'MS' e 2% de sacarose. O máximo de germinação dos embriões foi alcançado aos 14 dias, enquanto, para as sementes seccionadas, este valor só foi encontrado aos 26 dias de cultivo *in vitro*. A superioridade dos embriões sobre as sementes seccionadas foi atribuída à rapidez no processo de embebição, além da maior área de superfície de absorção em contato com o meio líquido; ao contrário nas sementes seccionadas, provavelmente o tegumento da semente ainda agiu como uma barreira nesse processo.

6.2 Efeitos de concentrações dos sais de 'MS' no crescimento de plântulas de *Derris urucu* em condições de cultivo *in vitro*.

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resumos das análises de variância dos dados referentes ao número de folhas, comprimento do caule e matérias fresca e seca da raiz, caule e folha de plântulas de *D. urucu* cultivadas *in vitro*, em meio nutritivo formulado com diferentes concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS', durante 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. Observa-se que o crescimento *in vitro* de plântulas de *D. urucu* em meio nutritivo 'MS' apresentou comportamento variado, indicando que estes efeitos no crescimento foram influenciados pelos tratamentos utilizados.

Respostas de crescimento e desenvolvimento de diversas espécies em condições de cultivo *in vitro*, envolvendo vários aspectos da cultura de células, tecidos e órgãos, têm sido investigadas por vários autores (Fidelis, 1998; Santiago, 1999; Coelho, 1999).

TABELA 2 – Resumo das análises de variâncias para número de folhas (NF), comprimento do caule (CC) e matéria fresca da raiz e caule (MFR e MFC) de plântulas de timbó aos 12, 24 e 35 dias de cultivo. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹			
		NF	CC	MFR	MFC
Meio de cultura (M)	4	4,4000 ^{NS}	8,3968**	0,0612**	0,0142**
Época de avaliação (DCIV)	2	723,8111**	58,2774**	0,6555**	0,1482**
M x DCIV	8	5,5750 ^{NS}	1,9217**	0,0295**	0,0097**
Resíduo	75	3,6777	0,3143	0,0007	0,0005
Média	-	6,8777	2,5311	0,2801	0,1517
CV (%)	-	27,8830	22,1510	9,3000	14,2630

¹NS e ** não significativo e significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

TABELA 3 - Resumo das análises de variâncias para matéria fresca da folha (MFF) e matérias seca da raiz, caule e folha (MSR, MSC e MSF, respectivamente) de plântulas de timbó aos 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹			
		MFF	MSR	MSC	MSF
Meio de cultura (M)	4	0,0730**	0,0003**	0,0001**	0,0001 ^{NS}
Época de avaliação (DCIV)	2	0,5584**	0,0030**	0,0037**	0,0029**
M x DCIV	8	0,0273**	0,0001**	0,0001**	0,0001 ^{NS}
Resíduo	75	0,0014	0,00005	0,00005	0,0001
Média	-	0,4339	0,0230	0,0202	0,0472
CV (%)	-	8,4720	29,4410	35,4650	20,3510

¹NS e ** não significativo e significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

6.2.1. Comprimento do caule (CC)

O resultado da análise de variância dos dados referentes a essa variável de resposta está apresentado na Tabela 2. Verificou-se que nos meios de cultura (M), os dias de cultivo *in vitro* (DCIV) e a interação M*DCIV tiveram efeitos significativos ($P < 0,01$) em plântulas de *D. urucu*. O desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento maior e significativo aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* e teve um comportamento quadrático (Figura 7).

Pôde-se constatar que o comprimento do caule foi reduzido significativamente em meios de cultura constituídos por concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' inferiores a 50% da composição básica deste meio nutritivo e aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*.

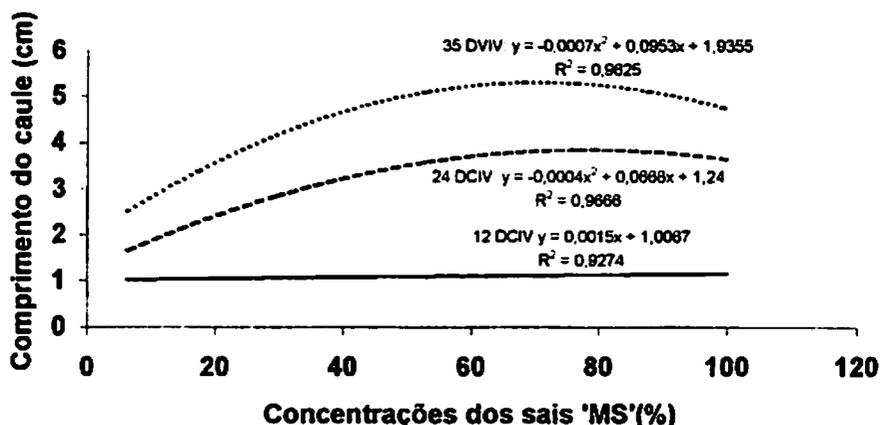


FIGURA 7 – Comprimento do caule de plântulas de *Derris urucu* em meio nutritivo formulado com variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio básico de 'MS', durante 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.2.2. Matérias fresca da raiz, caule e folha (MFR, MFC e MFF)

Os resultados das análises de variância dos dados das variáveis matérias frescas da raiz, caule e folha, respectivamente, de plântulas de *D. urucu*, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Verificou-se que nos meios de cultura (M), as épocas de avaliação (DCIV) e a interação M*DCIV tiveram efeitos significativos ($P < 0,01$) nessas variáveis de respostas.

Com relação à matéria fresca da raiz, verificou-se que o desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento variado e significativo, com baixas correlações aos 12 e 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura

8a), e tiveram um comportamento quadrático. A matéria fresca da raiz foi reduzida significativamente a partir da formulação constituída com 50% da concentração dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS'.

Para a matéria fresca do caule, observou-se que o desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento linear significativo com baixa correlação aos 12 dias de cultivo *in vitro*, e quadrático significativo aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 8b). Aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*, a matéria fresca do caule decresceu significativamente nos meios nutritivos formulados com as concentrações dos macro e micronutrientes inferiores a 50% da concentração básica.

Verificou-se, para a matéria fresca da folha, que o desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento quadrático significativo, com baixa correlação aos 12 dias de cultivo *in vitro* e altas correlações aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 8c). A matéria fresca da folha seguiu o mesmo comportamento das matérias frescas da raiz e do caule de *D. urucu*.

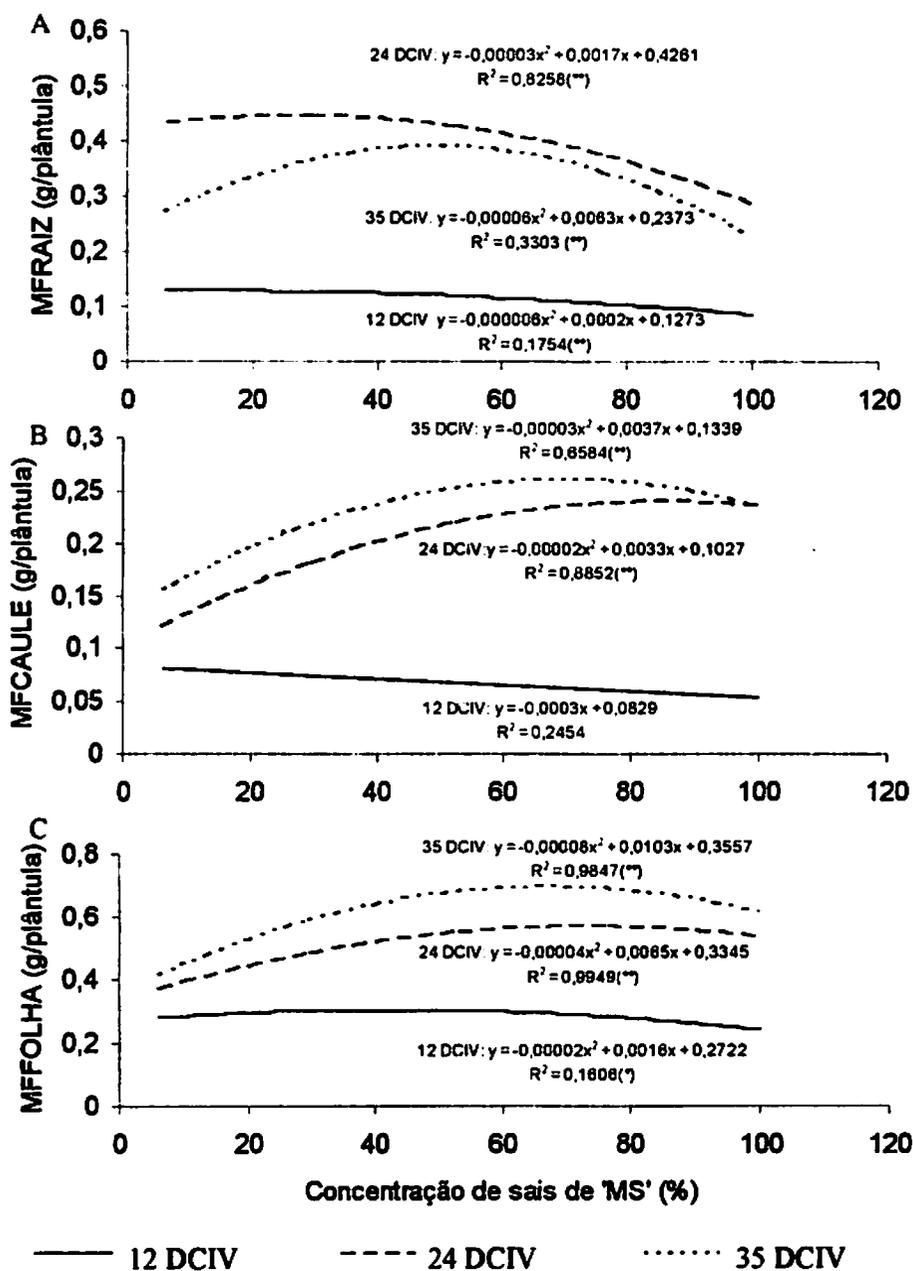


FIGURA 8 – Matérias frescas da raiz (A), caule (B) e folha (C) de plântulas de *Derris urucu*, em meios de cultura formulado com variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS', durante 12, 24 e 35 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG - 2000.

6.2.3. Matéria seca da raiz e do caule (MSR e MSC)

Os resultados estão apresentados na Tabela 3. Verificou-se que a matéria seca da raiz foi estatisticamente diferente ($P < 0,01$) para os tratamentos formulados com as variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' (M), para as épocas de avaliação (DCIV) e para a interação M* DCIV. Verificou-se que o desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento quadrático significativo aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 9a) e seguiu a mesma tendência da matéria fresca da raiz, ou seja, foi reduzida significativamente nos meios formulados com as concentrações dos sais dos macro e micronutrientes de 'MS' superiores a 50%. Para a matéria seca do caule, o desdobramento da interação mostrou que essa variável apresentou um crescimento quadrático significativo aos 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 9b), com reduções de crescimento a partir das concentrações inferiores a 50% dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'.

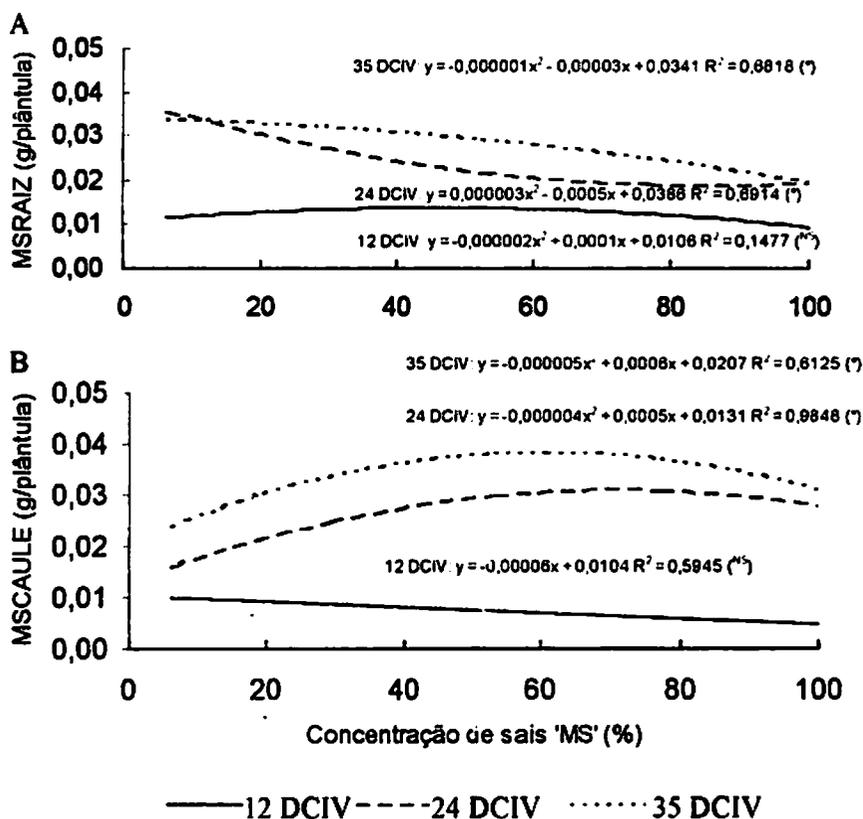


FIGURA 9 – Produção de matéria seca da raiz (A) e do caule (B) de plântulas de *Derris urucu*, em meio nutritivo formulado com variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio básico de 'MS', durante 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.2.4. Número de folhas (NF) e matéria seca da folha (MSF)

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Verificou-se que o número de folhas foi estatisticamente diferente ($P < 0,01$) para épocas de avaliação, obtendo-se melhores resultados aos 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 10). Entretanto, entre os tratamentos formulados com variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS', o

número de folhas surgidas foi semelhante para todos os tratamentos (Tabela 2). Detectou-se, também, que inicialmente o surgimento de folhas foi pequeno, aumentando progressivamente com o tempo de cultivo, com aumentos de 172,61 e 424,78%, respectivamente aos 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. Os resultados da análise de variância dos dados referentes à matéria seca da folha revelaram diferença estatística significativa ($P < 0,01$) para dias de cultivo *in vitro* (Tabela 3), observando-se superioridade desta variável aos 35 dias de cultivo *in vitro* (Figura 10). Verificou-se que inicialmente o crescimento foi pequeno e estatisticamente igual até aos 24 dias de cultivo *in vitro*, e aumentou significativamente aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

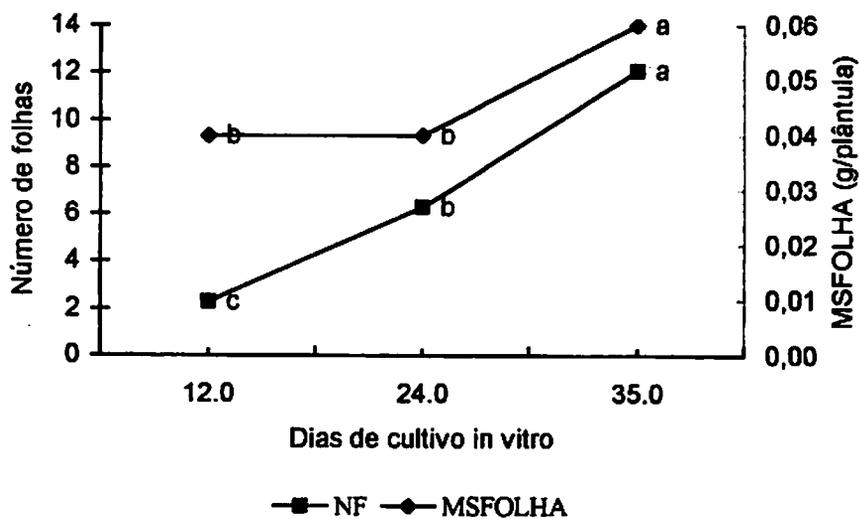


FIGURA 10 – Número de folhas e produção de matéria seca da folha de plântulas de *Derris urucu*, em meio nutritivo formulado com variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio básico de 'MS', durante 12, 24 e 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

De modo geral, o crescimento de plântulas de *D. urucu*, em condições de cultivo *in vitro*, durante 12, 24 e 35 dias, em cinco variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS', apresentou comportamento variado para as variáveis avaliadas. Os valores mais expressivos dessas variáveis foram obtidos aos 35 dias de cultivo *in vitro*, porém, através do comprimento do caule, matéria fresca do caule, matéria fresca da folha e matéria seca do caule, verificou-se uma redução de crescimento de *D. urucu* nos tratamentos formulados com as concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' inferiores a 50%. Por outro lado, as matérias fresca e seca da raiz foram reduzidas significativamente nos tratamentos que usaram concentrações superiores a 50%. As variações nas concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' não influenciaram o crescimento e desenvolvimento de *D. urucu* quando este foi avaliado em termos de número de folhas e da matéria seca da folha.

A cultura *in vitro* requer, para se desenvolver, de acordo com as características de cada espécie, um meio nutritivo composto de macro e micronutrientes, açúcares, vitaminas, reguladores de crescimento e complexos orgânicos, além de condições ambientais propícias, como intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, pH e umidade do ar (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

A quantidade de nutrientes exigida pela planta é função dos seus teores no material e do total de matéria seca produzida. Os minerais são o grupo de nutrientes mais importante, após a fonte de carboidratos, para o desenvolvimento *in vitro*. O meio de cultura mais popular é o 'MS', justamente porque a maioria das espécies apresenta respostas de desenvolvimento favorável neste meio nutritivo. Entretanto, esse meio nutritivo nem sempre é favorável para o crescimento e desenvolvimento dos explantes comumente usados nas técnicas de cultura de tecidos, devido à alta composição dos sais minerais.

O crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plântulas oriundas de embriões de [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.], em diferentes meios de suporte e avaliados por diversas características de crescimento, apresentou o meio líquido como o mais eficiente entre os tipos experimentados (Coelho, 1999). Este comportamento foi atribuído à melhor absorção dos nutrientes pelos embriões no meio líquido, que deve ser mais rápida do que na presença de gelificantes.

O crescimento e desenvolvimento de plântulas de *Brosimum guadichaudii* Tréc. oriundas de sementes imaturas, germinadas *in vitro* em meio nutritivo 'MS' formulado com quatro concentrações de sacarose, após 30 e 60 dias, tiveram o número e tamanho de raízes, o número de gemas axilares e o tamanho da parte aérea aumentados com as doses crescentes de sacarose até aproximadamente 6 – 7%, decrescendo após estes valores (Fidelis, 1998).

Em pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.), após 75 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo 'MS', com variações e combinações de doses de N do nitrato de amônio (NH_4NO_3) e de P do monofosfato ácido de potássio (KH_2PO_4), Santiago e colaboradores (1999) verificaram que a redução de N- NH_4 não afetou expressivamente o peso das matérias fresca e seca quando associado à dosagem normal ou duplicada de P. A suspensão de N- NH_4 do meio de cultura, mantendo-se apenas o N- NO_3 , proporcionou um maior crescimento em termos destas variáveis de resposta nessa espécie.

Ficou comprovado que a variação na concentração dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS' no crescimento de plântulas de *D. urucu* pode resultar em efeitos diferenciados no padrão de crescimento e desenvolvimento desta espécie. Neste trabalho, a resposta mais eficiente de crescimento foi obtida em meio nutritivo 'MS' formulado com 50% da concentração dos sais dos macro e micronutrientes.

7 CONCLUSÕES

Sementes de *Derris urucu* inicia a germinação a partir do terceiro dia de cultivo *in vitro*, no sexto dia atinge 50% e aos doze dias alcança 85% de germinação em meio nutritivo 'MS' formulado com diferentes concentrações dos sais dos macro e micronutrientes deste meio básico.

O número de sementes germinadas de *D. urucu* não é afetado pelas variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'.

A resposta mais eficiente de crescimento de plântulas de *D. urucu*, em condições de cultivo *in vitro*, é proporcionada pela formulação constituída com 50% dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTRÃO, A.E.S.; BELTRÃO, E.M.F.; MARINHO, P.; BARBOSA, J.M.F. Germinação e cultura *in vitro* de *Rauwolfia ternifolia*. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 4., 1999, Ribeirão Preto. Resumos... Ribeirão Preto: UNAERP, 1999. p.48.
- BORGES, E.E. de L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PINÃ-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES – Comitê Técnico de Sementes Florestais. 1993. C.3. p.83-135.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p.87-132.
- CARVALHO, N.M. de.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1983. 429p.
- COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Lavras: UFLA. 1999, 119p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- FIDELIS, I. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (mamacadela) uma espécie considerada medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- GOMES, R.P. A cultura dos timbós. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-Serviço de Informação Agrícola, 1946. 20p.
- GORDON, A.; COPPEN, J.J.W. Trends in demand for amazonian gums, resins and rotenoid insecticides and an assessment of their developmental potential, with particular reference to Brazil. Kent: Natural Resources Institute, 1993. 43p. (Relatório – NRI Project Nº T0391).
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.71-85.

- LABOURIAU, L.A. A germinação das sementes. Washington: OEA, 1983. 174p.
- LIMA, D. de.; GARCIA, L.C. Avaliação de métodos para o teste de germinação em sementes de *Acacia mangium* Willd. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.18, n.2, p.180-185, 1996.
- LIMA, R. R. Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip et Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1987. 23p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 42).
- MOORE, R.H. Mineral deficiencies in *Derris elliptica*. San José: Federal Experiment Station in Puerto Rico/USDA, 1945. 26p. (Bulletin, 43).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- PANCHOLI, N.; WETTEN, A.; CALIGARI, P.D.S. Germination of *Musa velutina* seeds: Comparison of *in vivo* and *in vitro* systems. In Vitro Cellular & Developmental Biology, Centre Park Drive, v.31, n.3, p.127-130, July 1995.
- PASQUAL, M.; BARROS, I. de. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.27, n.7, p.1017-1019, jul. 1992.
- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V.G.; RAMOS, J.D. Influência do GA₃ e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'Natal'. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.25, n.10, p.1477-1482, Out. 1990.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, jun. 1994.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2.ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

SANTIAGO, E. J.A. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) em condições *in vitro* e *in vivo***. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).

SANTIAGO, E.J.A. de; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; CARVALHO, J.G. de; et al. **Growth of the pepper (*Piper hispidinervium* DC.) submitted to different levels of N and P in vitro**. In **Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v.35, n.3 (Part II), p.50-A, Mar. 1999.

CAPÍTULO 3

INDUÇÃO DE CALOS EM TIMBÓ

1 RESUMO

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **Indução de calos em timbó**. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*.

Vários experimentos foram conduzidos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras – UFLA, para determinar um protocolo eficiente para a cultura de calos de timbó, visando a sua utilização como material para sistemas de propagação *in vitro* e de produção de metabólitos secundários. Os experimentos foram conduzidos nos períodos de fevereiro a junho de 1998 e de fevereiro a setembro de 1999, utilizando diversos tipos de explantes e várias concentrações e combinações de auxinas e citocininas. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados através de variáveis de respostas quantitativas e qualitativas. Segmento foliar (SF) oriundo de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro* proporcionou a melhor resposta à indução de calos, em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D, após 28 ou 35 dias de cultivo *in vitro* (DCIV). Segmento radicial (SR) oriundo de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro* propiciou a melhor resposta à indução de calos, em meio nutritivo de 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP ou 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, após 35 DCIV. O mais eficiente meio de cultura de manutenção de calos oriundos de SF e SR de *D. urucu* foi proporcionado pelo meio nutritivo 'MS' suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP. As curvas de crescimento de calos oriundos de SF e SR de *D. urucu* apresentaram cinco fases distintas: lag, até o sexto dia; exponencial, do sexto ao décimo segundo dia; linear, do décimo segundo dia ao vigésimo quarto dia; desaceleração, do vigésimo quarto dia ao vigésimo sétimo dia e estacionária a partir do vigésimo sétimo dia. A produção máxima de crescimento de calos foi obtido aos 24 DCIV.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

2 ABSTRACT

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **Callus induction in “timbó”**. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)*.

Several experiments were conducted in the plant tissue culture laboratory of the Universidade Federal de Lavras – UFLA, to determine an efficient protocol for the “timbó” callus culture, aiming its utilization as a material for in vitro propagation systems and production of secondary metabolites. The experiments were conducted in the periods of February to June, 1998 and February to September, 1999 by utilizing several explant types and various concentrations and combinations of auxins and cytokinins. The effects of the treatments were evaluated through variables of quantitative and qualitative responses. Leaf segment (LS) from *Derris urucu* seedlings germinated in vitro provided the best response to callus induction in ‘MS’ medium supplemented with 1.6 mg.l⁻¹ of 2,4-D after 28 or 35 days of in vitro cultivation (DCIV). Root segment (RS) from *D. urucu* seedlings germinated in vitro provided the best response to callus induction in ‘MS’ nutrient medium supplemented with 1.6 mg.l⁻¹ of ANA + 1.0 mg.l⁻¹ of BAP or 0.8 mg.l⁻¹ of AIB + 2.0 mg.l⁻¹ of BAP, after 35 DCIV. The most efficient culture medium of maintenance of callus from LS and RS of *D. urucu* was provided by the ‘MS’ nutrient medium supplemented with 2.0 mg.l⁻¹ of ANA + 2.0 mg.l⁻¹ of BAP. The growth curves of callus from LF and RS of *D. urucu* presented five distinct phases: lag, until the sixth day; exponential, from the sixth to the twelfth day; linear, from the twelfth day to the twenty-fourth day, deacceleration, from the twenty-fourth day to the twenty-seventh day and stationary from the twenty-seventh day. Maximum yield of callus growth was obtained at 24 DCIV.

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

3 INTRODUÇÃO

Várias espécies, desde algas até plantas vasculares, podem ser induzidas a formar calos em cultura. Em muitos casos, este material de calo pode ser induzido a diferenciar plantas inteiras, através da inclusão de reguladores de crescimento apropriados nos meios de cultura e do ambiente de cultura.

Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados (Handro e Floh, 1990).

Com a descoberta das funções independentes da auxina e citocinina na indução de raízes e de brotos em cultura de calos, e de um processo denominado organogênese, Skoog e Miller (1957) estabeleceram que um dos mecanismos básicos que o regulam parece envolver, entre outras coisas, um balanço entre níveis relativos desses dois grupos de compostos reguladores de crescimento presentes no meio. No sistema utilizando o fumo com o qual eles trabalharam, uma taxa relativamente alta de auxina em relação à citocinina (AIA/cinetina) favorece a formação de raiz. O reverso favorece a formação de broto e concentrações intermediárias favorecem a proliferação contínua de calos. Por outro lado, e mais significativamente, algumas culturas de calos, sob determinadas condições nutricionais e hormonais, podem ser induzidas a formar embrióides adventícios bipolares. O desenvolvimento de tais embrióides somáticos a partir de tecidos somáticos segue uma seqüência através das fases de pró-embrióide, globular e de torpedo, consideradas como embriogênese somática.

A literatura disponível é extremamente escassa de trabalhos sobre calogênese em timbó. Desta forma, considerou-se importante, neste trabalho, determinar um protocolo eficiente para a cultura de calos de *D. urucu*, visando a

sua utilização como material para sistemas de propagação *in vitro* e de produção de metabólitos secundários.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Vários fatores relacionados com o explante interferem na cultura de calos, como o tamanho do explante, composição do meio de cultura e dos reguladores de crescimento, órgão fornecedor do explante, a idade e a época do ano em que o explante é colhido e o genótipo da planta doadora. A frequência de sobrevivência e a velocidade de desenvolvimento dos calos estão diretamente relacionadas com o seu tamanho inicial (Murashige, 1974). A escolha de tecidos dos quais as culturas podem ser iniciadas é maior em espécies dicotiledôneas. Qualquer parte da planta tem potencial para proliferar *in vitro*, mas é freqüentemente encontrado que culturas de calos são mais facilmente estabelecidas desde alguns órgãos do que outros. Tecidos meristemáticos jovens são mais apropriados, mas áreas meristemáticas de partes velhas de uma planta, tais como o câmbio, podem dar início a calos (George, 1993).

4.1 Cultura de calos e regeneração de plantas

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

Alloufa, Campos e Souza (1999) desenvolveram métodos para a obtenção de calos em acerola desde explante foliar cultivado em meio nutritivo 'MS', suplementado com diferentes concentrações de Kin e 2,4-D. Os resultados

indicaram que a melhor formação de calos tem sido obtida usando Kin e 2,4-D nas concentrações 5,0; 0,5 μM e 10,0; 0,5 μM , respectivamente.

Paniego e Guilietti (1994) determinaram que a indução de calos mais eficiente em *Artemisia annua* L. foi obtida em meio 'MS' com 30 g.l^{-1} de sacarose, 100 mg.l^{-1} de mio-inositol, 4,5 μM de 2,4-D ou 5,4 μM de ANA. O uso de 2 mg.l^{-1} de 2,4-D e 2 mg.l^{-1} de BAP apresentou-se como significativo na produção de calos derivados de hipocótilos de *Cassia acutifolia* (Rady e Nazif, 1997).

Uma grande quantidade de calos foi obtida através de sementes de *Pinellia pedatisecta* Schott cultivadas em meio 'B5' (Gamborg, Miller e Ojima, 1968) e 'MS' suplementados com 0,5 a 6,0 mg.l^{-1} de 2,4-D e 0,5 mg.l^{-1} de BA. Os calos cresceram rapidamente e tiveram consistência friável. Já o meio 'MS' suplementado com 0,1 a 4 mg.l^{-1} de ANA e 0,5 mg.l^{-1} de BA influenciou na frequência de diferenciação, tendo havido aumento de calos com diminuição da concentração de ANA (Baocheng *et al.*, 1995).

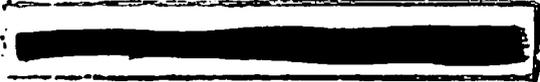
Estudos de Duskova e Dusek (1995), utilizando explantes de raízes e partes aéreas de *Leuzea carthamoides* DC., observaram que os calos da parte aérea se desenvolveram melhor em 0,5 mg.l^{-1} de AIB, obtendo-se 544% de aumento no peso da matéria fresca após quatro semanas. A cultura de calos obtida das raízes cresceu bem menos, sendo que o melhor resultado foi obtido com 1 mg.l^{-1} de 2,4-D e 1 mg.l^{-1} de BAP com 230% no aumento do peso da matéria fresca de calos.

Catapan, Otuki e Viana (1999) relatam a produção de calos através de cultivo *in vitro* em *Phyllanthus fraternus* (Euphorbiaceae). Os reguladores de crescimento utilizados para a indução dos calos foram AIB, AIA, ANA e 2,4-D nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg.l^{-1} adicionados ao meio 'MS', suplementado com 2% (w/v) de sacarose e 0,6% (w/v) de agar. Segmentos nodais de 0,8 – 1,2 cm foram removidos de plantas axênicas com 30-40 dias de

idade e utilizados como explantes para a indução dos calos. As culturas foram mantidas a 25 °C na ausência total de luz. Após 50 dias de cultivo, verificou-se que todas as auxinas induziram a formação de calos em 100% dos explantes, em todas as concentrações testadas, e inibiram a formação de ramos. O 2,4-D promoveu a formação de calos com pesos de matéria fresca significativo, destacando-se a concentração de 0,25 mg.l⁻¹.

Estudos de Lameira e colaboradores (1997) avaliaram a influência do TDZ na formação e manutenção de calos em *Cordia verbenacea* L., oriundos de segmentos caulinares com 3 a 4 cm de comprimento provenientes de mudas cultivadas em casa-de-vegetação. Os explantes foram cultivados em meio nutritivo 'MS' solidificado com 0,6% de agar e complementado com 0,22; 0,68; 2,04 e 6,13 µM de TDZ. A formação de calos ocorreu em todos os tratamentos com 10 a 15 dias de cultivo. Os tratamentos que apresentaram o explante com a maior área coberta com calos, em média 75%, foram 2,04 e 6,13 µM de TDZ. Somente nesses tratamentos os calos aumentaram de volume e mantiveram a coloração inicial quando transferidos para o meio fresco de cultura. Os tratamentos com menores concentrações de TDZ apresentaram explantes com 50% da área coberta com calos, e quando transferidos para o meio fresco de cultura, ocorreu a paralisação do crescimento com posterior morte dos calos.

Nyochembeng e Garton (1998) investigaram os efeitos de vários reguladores de crescimento sobre a morfogênese em tecidos de *Xanthosoma sagittifolium*. Calos foram iniciados usando explantes oriundos de ápice caulinar e pecíolo em meio de proliferação contendo 1,36 µM de dicamba. A produção de calos foi significativamente maior em pecíolos do que em ápice caulinar. O thidiazuron a 0,045 µM aumentou a produção de calos quando foi usado dicamba a 13,5 µM, e foi mais favorável para pecíolos do que para ápice caulinar.



4.2 Curva de crescimento de calos

O crescimento e o desenvolvimento de calos podem ser verificados pela curva de crescimento de calos, que geralmente apresenta cinco fases distintas: fase lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (George, 1993). A fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia; a fase exponencial é a fase biossintética; a fase linear se caracteriza pela diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular; a fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio (O_2) no interior das células, e por último a fase estacionária, quando ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários (Smith, 1992). A duração relativa dessas fases varia entre culturas de calos de diferentes espécies e também depende, em grande parte, dos componentes do meio de cultura.

Curvas de crescimento de calos e de células em suspensão de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) foram estabelecidas por Lameira (1997). O crescimento de calos e células apresentaram as cinco fases distintas, proporcionando curvas do tipo sigmóide. Na curva de crescimento de calos e células, os maiores percentuais de crescimento, respectivamente 30 e 37%, são obtidos na fase exponencial, e os menores percentuais são obtidos durante a fase de desaceleração para os calos (7%) e na fase lag para as células (3%). O período de maior crescimento (12 dias) ocorre na fase linear para as células e na exponencial para os calos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Indução de calos em timbós com diferentes tipos de explantes e reguladores de crescimento.

Foram conduzidos quatro experimentos utilizando diferentes tipos de explantes de timbó. O meio nutritivo utilizado foi o 'MS', sacarose 3%, solidificado com 0,7% de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento a $26,0 \pm 1,0$ °C, umidade relativa do ar $70 \pm 5\%$, fotoperíodo de 16 h e irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância. Quando significativos, procederam as análises de regressão polinomial e/ou a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade, de acordo com a natureza das variáveis de respostas em questão.

5.1.1 Indução de calos em explante foliar de timbó.

Foi usado explante foliar com cerca de 1 cm^2 , oriundo de plântulas de *D. urucu*, de exemplares do clone 37, germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS', suplementado com 2,4-D a 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg.l^{-1} , durante 35 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: presença de calo (PC), cor do calo (CC), tamanho do calo (TC), dureza do calo (DC) e matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6×3 (6 concentrações de 2,4-D e 3 épocas de avaliação – 21, 28 e 35 dias após a inoculação), com 5 repetições, sendo cada uma dessas constituída por 2 tubos de ensaio.

5.1.2 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento ANA e BAP.

Neste experimento foi usado explante radicial com cerca de 1 cm de comprimento, oriundo de plântulas de *D. urucu* de exemplares do clone 37, germinadas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS', suplementado com ANA a 0,0; 1,6 e 3,2 mg.l⁻¹ e BAP a 0,0; 1,6 e 3,2 mg.l⁻¹, durante 35 dias. Foram avaliadas as seguintes variáveis de resposta: presença de calo (PC), cor do calo (CC), tamanho do calo (TC), dureza do calo (DC) e matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 (3 concentrações de ANA e 3 concentrações de BAP), com 3 repetições, cada uma constituída por 3 tubos de ensaio.

5.1.3 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento picloram (PIC) e BAP.

Explantes radiciais semelhantes aos usados no experimento 5.1.2 foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS', suplementado com PIC a 0,0; 1,6 e 3,2 mg.l⁻¹ e BAP a 0,0; 1,6 e 3,2 mg.l⁻¹, durante 35 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: presença de calo (PC), cor do calo (CC), tamanho do calo (TC), dureza do calo (DC) e matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 (3 concentrações de PIC e 3 concentrações de BAP), com 3 repetições, cada uma constituída por 3 tubos de ensaio.

5.1.4 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, AIB, PIC e BAP.

Explantos radiciais com cerca de 1 cm de comprimento, oriundos de plântulas de *D. urucu* de exemplares do clone 37, foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS' e mantidos em sala de crescimento durante 30 dias. Os tratamentos usados foram os seguintes: R₁ = 0,4 mg.l⁻¹ de 2,4-D; R₂ = 0,8 mg.l⁻¹ de 2,4-D; R₃ = 3,2 mg.l⁻¹ de ANA; R₄ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₅ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₆ = 1,6 mg.l⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₇ = 3,2 mg.l⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₈ = 1,6 mg.l⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP e R₉ = 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: presença de calo (PC), cor do calo (CC), tamanho do calo (TC), dureza do calo (DC) e matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 5 repetições, sendo cada uma dessas constituída por 2 tubos de ensaio.

5.2 Manutenção de calos de *Derris urucu* oriundos de explantes foliar e radicial.

5.2.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.

Foram usados fragmentos de calos de cerca de 1 cm², oriundos de 3 tratamentos de indução de calos [um de explante foliar (L₄ = 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D) e dois de explante radicial (R₄ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP e R₉ = 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP)]. Os explantes (calos) foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio nutritivo de manutenção, sacarose 3%, solidificado com 0,7% de ágar, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e mantidos em sala de crescimento a 26,0±1,0 °C, umidade relativa do ar

70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 28 dias. Foram usados os seguintes tratamentos de manutenção de calos: M_1 = 'MS' sem regulador de crescimento; M_2 = 'MS' + 2,0 mg.l^{-1} de BAP; M_3 = 'MS' + 2,0 mg.l^{-1} de ANA e M_4 = 'MS' + 2,0 mg.l^{-1} de ANA + 2,0 mg.l^{-1} de BAP. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de respostas: matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente).

5.2.2 Delineamento experimental e análise estatística.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições, cada uma constituída por 4 frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio nutritivo de manutenção. Neste trabalho, os calos oriundos de cada tratamento de indução (I_4 , R_4 e R_9) foram considerados como experimentos isolados. Os dados coletados foram submetidos à análise de variância. Quando significativos, procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 0,05 de probabilidade.

5.3 Construção da curva de crescimento de calos.

5.3.1 Material vegetal, tratamentos, condições de cultivo e coleta de dados.

Foram determinadas três curvas de crescimento de calos de *D. urucu*, usando-se os calos induzidos em segmentos foliar e radicial de plântulas de *D. urucu* de exemplares do clone 37, no meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg.l^{-1} de 2,4-D; 1,6 mg.l^{-1} de ANA + 1,0 mg.l^{-1} de BAP e 0,8 mg.l^{-1} de AIB + 2,0 mg.l^{-1} de BAP. Após duas subculturas nestes meios de indução, o material foi transferido para frasco de vidro de 250 mL contendo 30 mL do meio de manutenção – 'MS' suplementado com 2,0 mg.l^{-1} de ANA + 2,0 mg.l^{-1} de BAP. Em cada frasco foram colocados três fragmentos de calos de aproximadamente 8

mm de comprimento. A cultura foi mantida em sala de crescimento a $26,0 \pm 1,0$ °C, umidade relativa do ar $70 \pm 5\%$, fotoperíodo de 16 h e irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 36 dias. A cada três dias foram coletados três frascos ao acaso de cada tratamento e determinados os pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Indução de calos em explante foliar de timbó.

Os resultados das análises de variância dos dados de matérias fresca e seca de calos de timbó induzidos em segmento foliar (SF), com várias concentrações de 2,4-D (D) durante três épocas de cultivo (DCIV), são apresentados na Tabela 4. Podem ser observados efeitos altamente significativos para todos os fatores e para a interação D*DCIV. Os efeitos promovidos pelas concentrações de 2,4-D e de épocas de cultivo sobre as produções das matérias fresca ou seca de calos de timbó apresentaram comportamento quadrático (Figuras 11 e 12). As concentrações de 2,4-D promoveram um estímulo nas produções de matérias fresca e seca até $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ ($2,3787 \text{ g}$ e $0,1081 \text{ g}$, respectivamente), aos 35 dias de cultivo *in vitro*, com posterior inibição na concentração subsequente. Nesta concentração, as produções das matérias fresca e seca de calos de *D. urucu* foram, respectivamente, de $0,6337 \text{ g}$ e $0,0346 \text{ g}$ aos 21 dias e de $1,9153 \text{ g}$ e $0,0913 \text{ g}$ aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Resultados semelhantes em relação aos efeitos de 2,4-D sobre a indução de calos têm sido relatados para várias espécies a partir de explante oriundo de segmento foliar, em meio nutritivo 'MS' (Buyukalaca e Mavituna, 1996; Chan *et al.*, 1998). Por outro lado, alguns autores relatam que em explante foliar, as melhores respostas de indução de calos foram obtidas com ANA + BAP ($2,0 + 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$), conforme

constatado em *Tridax procumbens* e *Rauwolfia caffra* (Cerqueira, 1999 e Upadhyay *et al.*, 1992, respectivamente).

TABELA 4 – Resumo da análise de variância para as variáveis de respostas pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) do timbó em função de concentrações de 2,4-D (D) e dias de cultivo *in vitro* (DCIV). Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		MFCALO	MSCALO
D	5	4,7827**	0,0108**
DCIV	2	9,9669**	0,0152**
D*DCIV	10	0,7433**	0,0011**
Resíduo	72	0,0904	0,0001
Média	-	1,0934	0,0522
CV (%)	-	27,5000	18,5200

¹** significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

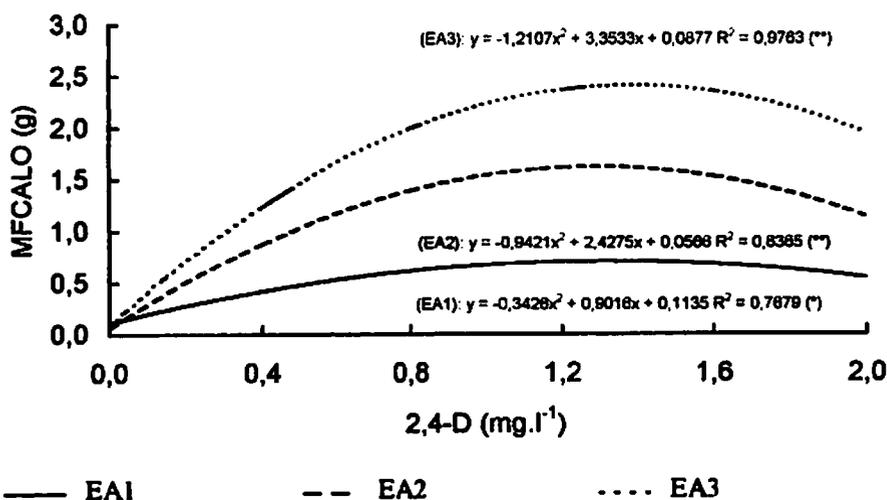


FIGURA 11 – Produção de matéria fresca de calos de *Derris urucu* induzidos em explante foliar tratados com 2,4-D, durante 21, 28 e 35 dias de cultivo *in vitro* (EA1, EA2 e EA3, respectivamente). UFLA, Lavras - MG, 2000.

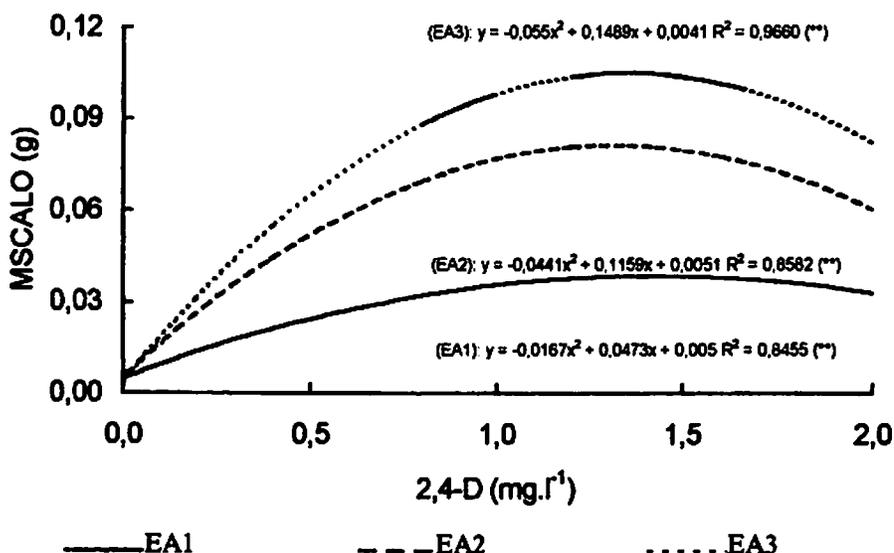


FIGURA 12 – Produção de matéria seca de calos de *Derris urucu* induzidos em explante foliar tratados com 2,4-D, durante 21, 28 e 35 dias de cultivo *in vitro* (EA1, EA2 e EA3, respectivamente). UFLA, Lavras - MG, 2000.

A Tabela 5 apresenta os resultados sistematizados de variáveis qualitativas observadas em calos de timbó oriundos de segmento foliar, durante 21, 28 e 35 dias de cultivo *in vitro*. De modo geral, a cor dos calos (CC) foi predominantemente verde até aos 28 dias, mudando para amarelo aos 35 dias (Figura 13); o tamanho dos calos (TC) foi avaliado como grande durante todo o período de cultivo, exceto na presença de 0,8 e 1,2 mg.l⁻¹ de 2,4-D aos 21 dias, e a dureza dos calos (DC) foi constantemente friável. A cor de calos de *Tridax procumbens* induzidos por 2,4-D em explantes foliar e caulinar foi predominantemente amarelo e verde escuro, respectivamente (Cerqueira, 1999).

Vários fatores podem influenciar na coloração e consistência de calos. Declerck e Korbam (1996) citados por Landa (1999), estudando a influência de reguladores de crescimento e diferentes fontes de carbono em segmentos foliares

de *Prunus persica* L. Batsch cv. Elberta, em meio nutritivo 'MS' com metade da concentração dos sais, constataram que a presença de TDZ produziu calos verdes e de consistência compacta, e na presença de 2,4-D, os calos formados foram amarelos e de consistência friável.

TABELA 5 – Respostas de variáveis qualitativas observadas em calos de *Derris urucu* induzidos com seis concentrações de 2,4-D, em explante foliar de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

2,4-D (mg.l ⁻¹)	Dias de cultivo <i>in vitro</i>								
	21			28			35		
	CC	TC	DC	CC	TC	DC	CC	TC	DC
0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,4	V	G	F	V	G	F	A	G	F
0,8	A	M	F	V	G	F	V	G	F
1,2	V	M	F	A	G	F	A	G	F
1,6	V	G	F	V	G	F	A	G	F
2,0	V	G	F	A	G	F	A	G	F

LEGENDA: Cor do calo (CC) (A = amarelo e V = verde); tamanho do calo (TC) (M = 0,5 a 1,0 cm e G = > 1,0 cm) e dureza do calo (DC) (F = friável).

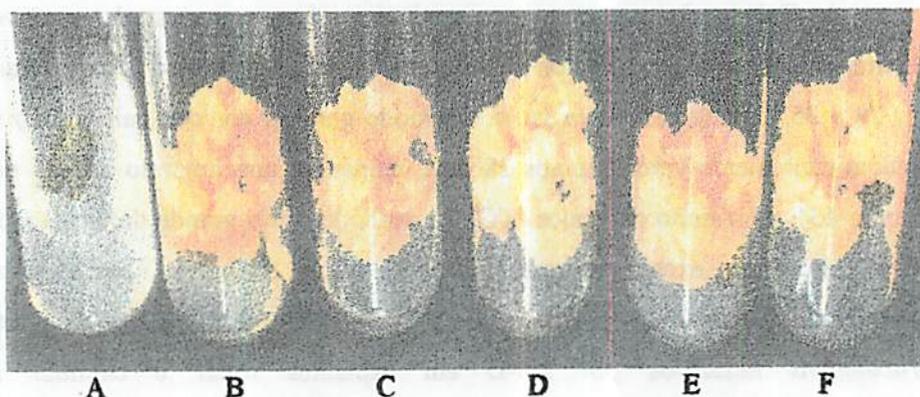


FIGURA 13 – Aspecto geral de calos de *Derris urucu* induzidos em segmento foliar (SF) de plântulas germinadas *in vitro*, em meio nutritivo 'MS', suplementado com 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D (A, B, C, D, E e F, respectivamente), após 35 dias de cultivo *in vitro* (DCIV). UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.2 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento ANA e BAP.

Os resultados das análises de variância dos dados de matérias fresca e seca de calos de *D. urucu*, em segmento radicial (SR) induzidos em meio nutritivo 'MS' suplementado com ANA e BAP, são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 – Resumo da análise de variância para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) de timbó induzidos em SR, em função de concentrações de ANA e BAP. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		MFCALO	MSCALO
ANA	2	0,2281**	0,0013**
BAP	2	0,0222 ^{ns}	0,0003 ^{ns}
ANA*BAP	4	0,0331 ^{ns}	0,0002 ^{ns}
Resíduo	18	0,0219	0,0001
Média	-	0,2276	0,0179
CV (%)	-	65,0140	56,9950

¹NS e ** não significativo e significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Pode-se verificar que apenas o fator ANA teve efeito significativo na indução de calos em segmento radicial. Na Figura 14 observa-se que as produções de matérias fresca e seca dos calos responderam significativamente às concentrações de ANA, resultando em efeitos quadráticos. As maiores produções de matérias fresca e seca de calos em segmento radicial de *D. urucu* tratados com ANA + BAP foram detectadas no tratamento contendo 3,2 mg.l⁻¹ de ANA + 0,0 mg.l⁻¹ de BAP e foram da ordem de 0,3923 g e 0,0258 g, respectivamente. Essas produções corresponderam a 16,49% e 23,87% dos pesos das matérias fresca e seca de calos, respectivamente, às obtidas com o melhor tratamento de 2,4-D, em segmento foliar.

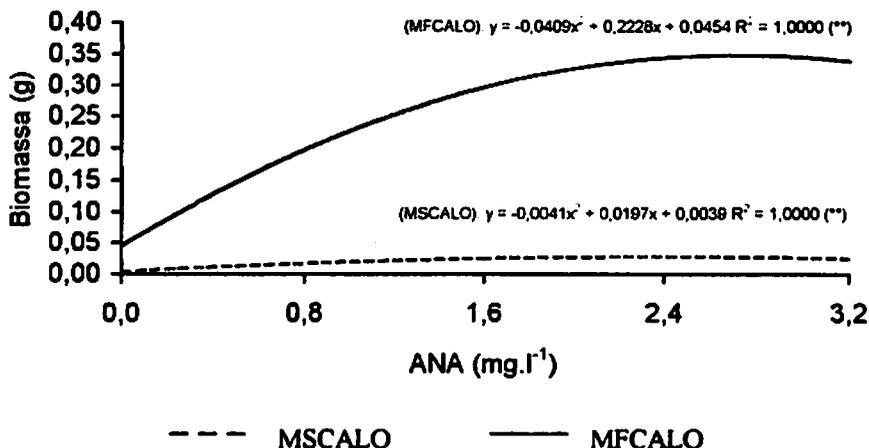


FIGURA 14 - Produção de matérias fresca e seca de calos de *Derris urucu* induzidos em explante radicial tratados com ANA, durante 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

A Tabela 7 apresenta os resultados sistematizados de variáveis qualitativas observadas em calos de *D. urucu* oriundos de segmento radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 35 dias de cultivo. Em geral, a cor de calos (CC), o tamanho de calos (TC) e a dureza dos calos (DC) dos tratamentos combinados com ANA e BAP apresentaram respostas diferenciadas. O aumento da concentração de BAP no meio nutritivo 'MS' propiciou a formação de calos de cor verde-amarelada, tamanho grande e consistência dura. As Figuras 15a e 15b mostram os aspectos gerais dos calos induzidos em segmento radicial (SR) tratados com ANA + BAP.

Calos friáveis são correlacionados com um menor estágio de diferenciação do que calos compactos (Fransz e Schel, 1990), e a proporção de calos friáveis aumentou com o aumento das subculturas. Em geral, calos friáveis são induzidos a partir de calos compactos, obtidos inicialmente em meio sólido.

TABELA 7 – Respostas de variáveis qualitativas em calos de *Derris urucu* induzidos com combinações de concentrações de ANA + BAP em explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

ANA+BAP (mg.l ⁻¹)	Variáveis de respostas		
	CC	TC	DC
0,0 + 0,0	-	-	-
1,6 + 0,0	A	M	F
3,2 + 0,0	A	G	F
0,0 + 1,6	A	P	F
1,6 + 1,6	A	G	F
3,2 + 1,6	A	M	F
0,0 + 3,2	A	P	F
1,6 + 3,2	V/A	G	±D
3,2 + 3,2	V/A	G	±D

LEGENDA: Cor do calo (CC) (A = amarelo e V = verde); tamanho do calo (TC) (P = <0,5 cm; M = 0,5 a 1,0 cm e G = > 1,0 cm) e dureza do calo (DC) (F = friável e D = duro).



A 0,0 + 3,2 mg.l⁻¹

1,6 + 3,2 mg.l⁻¹

3,2 + 3,2 mg.l⁻¹



B 0,0 + 0,0 mg.l⁻¹

3,2 + 0,0 mg.l⁻¹

1,6 + 0,0 mg.l⁻¹

FIGURA 15 – Aspecto geral dos calos de *Derris urucu* obtidos em segmento radicial oriundos de plântulas germinadas *in vitro* e induzidos em meio nutritivo 'MS' suplementado com diversas concentrações de ANA + BAP. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.3 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento picloram (PIC) e BAP.

Os resultados das análises de variância dos dados de matérias fresca e seca de calos de *D. urucu*, em segmento radicial induzidos com PIC e BAP, são apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – Resumo da análise de variância para as variáveis de respostas pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) do timbó em função de concentrações de PIC e BAP. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		MFCALO	MSCALO
PIC	2	0,4691**	0,0018**
BAP	2	0,3386**	0,0008**
PIC*BAP	4	0,0894**	0,0002**
Resíduo	18	0,0122	0,00004
Média	-	0,2622	0,0163
CV (%)	-	42,2140	40,0690

¹** significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

Podem ser verificados efeitos significativos para todos os fatores e para a interação. Observou-se que a matéria fresca do calo respondeu significativamente às concentrações de PIC e BAP, com efeito linear de PIC dentro BAP₁ e quadrático para PIC dentro de BAP₂ e BAP₃ (Figura 16). Para a matéria seca do calo, verificaram-se efeitos lineares para PIC dentro de BAP₁ e BAP₂ e quadrático para PIC dentro de BAP₃ (Figura 17). De modo geral, as melhores respostas para a indução de calos em segmento radicial, em termos de pesos das matérias fresca e seca, foi alcançada com o tratamento 1,6 + 3,2 mg.l⁻¹ de PIC + BAP, alcançando 0,7841 g e 0,0420 g, respectivamente, valores superiores aos induzidos por ANA + BAP, mas ainda bem inferiores aos calos formados em segmento foliar, induzidos por 2,4-D

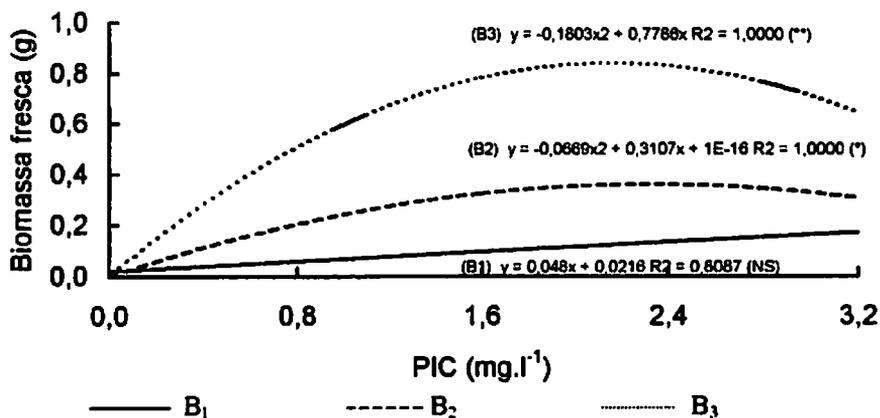


FIGURA 16 – Produção de matéria fresca de calos de *Derris urucu* induzidos em segmento radicial tratados com PIC + BAP, após 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

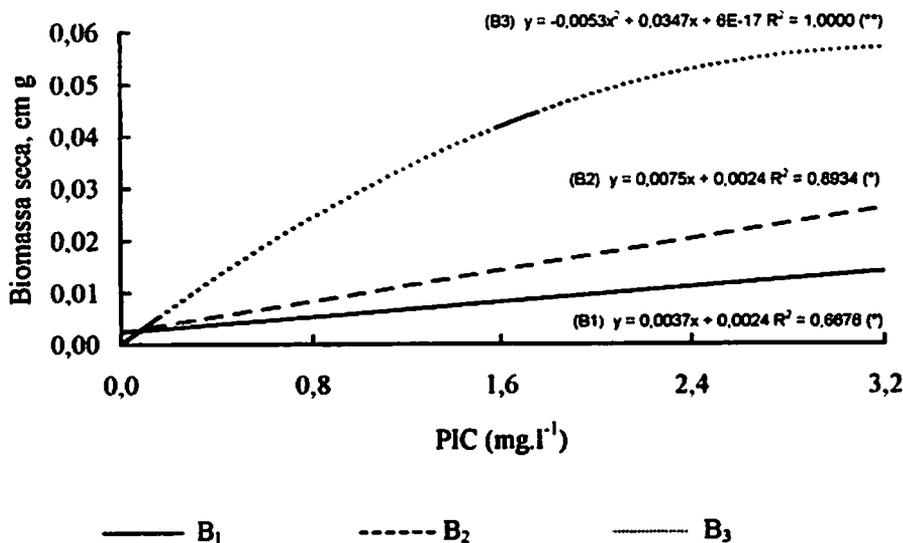


FIGURA 17 – Produção de matéria seca de calos de *Derris urucu* induzidos em segmentos radiciais tratados com PIC + BAP, após 35 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

A Tabela 9 apresenta os resultados sistematizados de variáveis qualitativas observadas em calos de *D. urucu* oriundos de segmentos radiciais de plântulas germinadas *in vitro*, após 35 dias de cultivo *in vitro*. De um modo geral, a cor de calos (CC), o tamanho de calos (TC) e a dureza dos calos (DC) dos tratamentos combinados com concentrações de PIC e BAP apresentaram respostas diferenciadas. A cor calos formados foi predominantemente marrom, com tamanho variado e consistência friável. A Figura 18 apresenta um aspecto geral dos calos obtidos em segmentos radiciais tratados com PIC + BAP.

TABELA 9 – Respostas de variáveis qualitativas observadas em calos de *Derris urucu* induzidos com combinações de concentrações de PIC + BAP em explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

PIC+BAP (mg.l ⁻¹)	Variáveis de respostas		
	CC	TC	DC
0,0 + 0,0	-	-	-
1,6 + 0,0	M	P	F
3,2 + 0,0	M	P	F
0,0 + 1,6	-	-	-
1,6 + 1,6	M	M	F
3,2 + 1,6	M	M	F
0,0 + 3,2	-	-	-
1,6 + 3,2	M	G	F
3,2 + 3,2	A	P	F

LEGENDA: Cor do calo (CC) (A = amarelo e M = marrom); tamanho do calo (TC) (P = <0,5 cm; M = 0,5 a 1,0 cm e G = > 1,0 cm) e dureza do calo (DC) (F = friável).



0,0 + 3,2 mg.l⁻¹

1,6 + 3,2 mg.l⁻¹

3,2 + 3,2 mg.l⁻¹

FIGURA 18 – Aspecto geral de calos formados em segmentos radiciais oriundos de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro* e induzidos em meio nutritivo 'MS' suplementado com concentrações de PIC + BAP. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.4 Indução de calos em explante radicial de timbó através dos reguladores de crescimento 2,4-D, ANA, AIB, PIC e BAP.

Os resultados das análises de variância dos dados de matérias fresca e seca de calos em segmento radicial tratados com diferentes reguladores de crescimento são apresentados na Tabela 10.

Pode-se verificar que 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP (R₄) e 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP (R₉) apresentaram um ganho de matéria fresca e seca superior aos demais tratamentos (Tabela 11). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para várias espécies, nas quais tem sido observado que os melhores resultados de indução de calos oriundos de diferentes tipos de explantes são obtidos em meio nutritivo suplementado com auxina e citocinina

(Cerqueira, 1999; Alloufa, Campos e Souza, 1999; Rady e Nazif, 1997; Baocheng *et al.*, 1995; Li e colaboradores. 1995; Kajiki, 1996; Landa, 1999). Entretanto, a combinação ou a interação dos reguladores de crescimento na indução de calos vai depender principalmente do genótipo. Neste experimento, as produções de matéria fresca e seca de calos induzidas em segmento radicial de *D. urucu* em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP (R₄) e 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP (R₉) estão muito próximas às obtidas para a indução de calos em segmento foliar cultivado em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg/L de 2,4-D (Figuras 11 e 12).

TABELA 10 – Resumo da análise de variância para as variáveis de respostas pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) do timbó em função de concentrações de várias auxinas + BAP. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		MFCALO	MSCALO
Tratamento	8	1,2824 **	0,0026 **
Resíduo	36	0,0468	0,0001
Média	-	0,8209	0,0466
CV (%)	-	26,3580	20,7990

¹ ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F.

Os resultados sistematizados de variáveis qualitativas observadas em calos de *D. urucu* oriundos de segmento radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 30 dias de cultivo, são apresentados na Tabela 12. De modo geral, a cor de calos (CC), o tamanho de calos (TC) e a dureza dos calos (DC) apresentaram respostas diferenciadas. A cor calos formados variou entre amarelo, verde e marrom, com tamanho predominantemente grande e consistência friável.

TABELA 11 – Valores médios das matérias fresca e seca de calos de *Derris urucu* oriundos de explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 30 dias de cultivo. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento	Variáveis de Resposta	
	MFCALO (g)	MSCALO (g)
R ₁ (0,4 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	0,6824 bc	0,0402 bc
R ₂ (0,8 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	0,8454 b	0,0508 b
R ₃ (3,2 mg.l ⁻¹ de ANA)	0,3810 c	0,0240 c
R ₄ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	1,6513 a	0,0795 a
R ₅ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,5431 bc	0,0280 c
R ₆ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,6300 bc	0,0420 bc
R ₇ (3,2 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,6308 bc	0,0439 bc
R ₈ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,3313 c	0,0238 c
R ₉ (0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	1,6924 a	0,0876 a

¹ Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 12 – Respostas de variáveis qualitativas observadas em calos de *Derris urucu* induzidos em explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Tratamento	Variáveis de respostas		
	CC	TC	DC
R ₁ (0,4 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	A	G	F
R ₂ (0,8 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	A	G	F
R ₃ (3,2 mg.l ⁻¹ de ANA)	A	M	F
R ₄ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₅ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₆ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	M	G	F
R ₇ (3,2 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₈ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₉ (0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	A	G	F

LEGENDA: Cor do calo (CC) (A = amarelo, M = marrom e V = verde); tamanho do calo (TC) (M = 0,5 a 1,0 cm e G = > 1,0 cm) e dureza do calo (DC) (F = friável).

Os trabalhos realizados com calos formados a partir de fragmentos de plantas são realizados principalmente para determinar as condições de cultura *in vitro* que os explantes requerem para sobreviver e crescer, para estudar o desenvolvimento celular, para explorar produtos do metabolismo primário e

secundário, para obter suspensão celular, e ainda para a propagação com formação de gemas adventícias ou embriões somáticos. As auxinas, citocininas e a interação auxina/citocinina são normalmente consideradas os reguladores de crescimento mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Desta forma, os níveis de auxinas e citocininas em culturas *in vitro* são balanceados e controlados. Entretanto, as respostas de células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* podem variar de acordo com condições da cultura, do tipo de explante e do genótipo (Gaspar *et al.*, 1996). A indução de calos em *D. urucu* apresentou respostas diferenciadas quanto ao tipo de explante e a concentração e interação de reguladores de crescimento. As etapas de indução de calos de *D. urucu* em segmentos foliar e radicial oriundos de plântulas germinadas *in vitro* são mostradas na Figura 19.

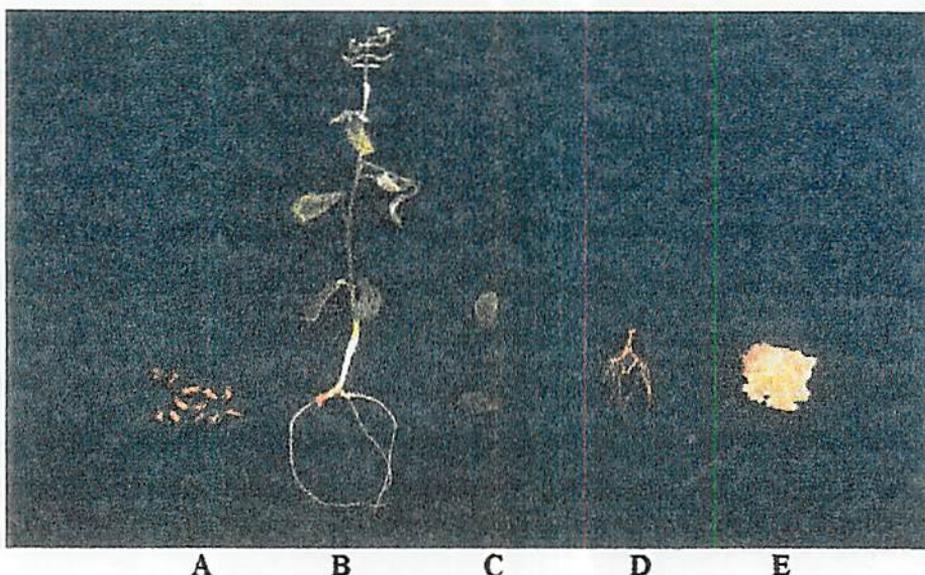


FIGURA 19 – Etapas (A = semente; B = plântula germinada *in vitro*; C e D = explantes foliar e radicial e E = calo) de indução de calos de *Derris urucu*, em segmentos foliar e radicial, oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Neste trabalho, houve a indução e a formação de calos em explantes foliar e radicial de *D. urucu* cultivados em meios nutritivos 'MS', suplementados com várias concentrações e interações de substâncias reguladoras de crescimento. Em explante foliar, o melhor resultado foi obtido com $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D, com produções de matérias fresca e seca de calos da ordem de 2,3787 e 0,1081g, respectivamente, aos 35 dias de cultivo (Figuras 11 e 12). Nesta concentração, os calos foram considerados grandes, de consistência friável e coloração amarelada (Tabela 5). Por outro lado, em explantes radiciais inoculados em meios de cultura 'MS', suplementados com $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA + $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP ou $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP, as produções de matérias fresca e seca de calos foi de 1,6513 e 0,0795 g ou 1,6924 e 0,0876 g, respectivamente, após 35 dias de cultivo (Tabela 11), e apresentavam-se com

coloração verde ou amarelada e consistência friável (Tabela 12). De acordo com estes resultados, verificou-se que as substâncias reguladoras de crescimento 2,4-D, para explante foliar, e ANA e AIB mais BAP, para explante radicial, adicionadas aos meios de cultura, foram as mais efetivas para a indução e formação de calos em explantes foliar e radicial de timbó. Estes resultados estão de acordo com os relatados por vários autores (Paniego e Guilietti, 1994; Duskova e Dusek, 1995; Catapan, Otuki e Viana, 1999), os quais trabalharam com diversos tipos de explantes, oriundos de várias espécies de plantas. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985), em seu estudo, comprovou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, entretanto, quando adicionou citocinina, aumentou a proliferação de calos.

6.5 Manutenção de calos de timbó oriundos de explantes foliar e radicial.

Os resultados das análises de variância são apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Resumo da análise de variância para as variáveis de respostas pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) do timbó em função de concentrações de ANA e BAP, durante a fase de manutenção de calos. Dados não transformados. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância por tipo de Explante					
		1,6 mg.l ⁻¹ de 2,4-D (I ₄)		1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP (R ₄)		0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP (R ₅)	
		MFCALO	MSCALO	MFCALO	MSCALO	MFCALO	MSCALO
Trat.	3	4,7544 *	0,0019 ^{ns}	3,0308 **	0,0049 **	8,4578 **	0,0041 **
Resíduo	12	0,9038	0,0008	0,2746	0,0004	0,4068	0,0001
Média	-	2,5891	0,0942	1,6441	0,0738	1,9359	0,0747
CV (%)	-	36,7180	29,0840	31,8750	28,1850	32,9450	12,7110

^{ns}, * e ** = não significativo e significativo aos níveis de 0,05 e 0,01% de probabilidade pelo teste de F.

Após a indução do calos no explante primário, é necessário a manutenção do crescimento e desenvolvimento do tecido. Em geral, utiliza-se o mesmo meio de indução para manter a calogênese. Pode-se verificar que as matérias fresca e seca de calos de todos os tratamentos de manutenção apresentaram efeitos significativos, com exceção da matéria seca do calo induzido em meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D (L₄). A melhor resposta dos tratamentos de manutenção foi proporcionada pelo tratamento formulado em 'MS', suplementado com 2,0 + 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + BAP (Tabela 14). Estes resultados são similares aos obtidos para a manutenção de calos de *Tridax procumbens* (Cerqueira, 1999) e de *Caryocar brasiliense* Camb. (Landa, 1999). Em geral, quando o calo está sendo cultivado por várias semanas, mostrará sinal de 'velhice', que é notado por uma desaceleração do crescimento, necrose, escurecimento e finalmente secamento. Esta velhice resulta da exaustão de nutrientes, inibição da absorção de nutrientes, evaporação acompanhada pelo aumento na concentração de algum nutriente e acumulação de metabólitos, alguns dos quais podem ser tóxicos.

TABELA 14 – Valores médios para pesos das matérias fresca e seca (em g) de calos de *Derris urucu* oriundos de três meios de indução em segmentos foliar e radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 30 dias de cultivo nos meios de manutenção. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento (mg.l ⁻¹)	Variáveis de Resposta, em g					
	1,6 mg.l ⁻¹ de 2,4-D (L ₄)		1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP (R ₄)		0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP (R ₆)	
	MFCALO	MSCALO	MFCALO	MSCALO	MFCALO	MSCALO
0,0	1,7513 b	0,0750 a	0,4132 b	0,0258 b	0,9650 b	0,0547 b
2,0 BAP	2,6875 ab	0,0946 a	2,2403 a	0,0968 a	1,0273 b	0,0537 b
2,0 ANA	1,8230 b	0,0823 a	1,6445 a	0,0696 a	1,6905 b	0,0686 b
2,0 BAP + 2,0 ANA	4,0948 a	0,1249 a	2,2786 a	0,1030 a	4,0608 a	0,1218 a

¹ Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

6.6 Curva de crescimento de calos.

As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas de crescimento de calos determinadas em segmentos foliar e radicial de *D. urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. Pelas tendências das curvas, verificou-se que tanto para a matéria fresca do calo como para a matéria seca do calo, as cinco fases distintas de crescimento de calos ocorreram conforme o mencionado para diversas espécies (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977; Smith, 1992; Lameira, 1997; Abreu, 1998; Cerqueira, 1999; Landa, 1999).

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 exponencial de crescimento ocorreu entre o sexto e décimo segundo dia. O período de crescimento linear ocorreu entre o décimo segundo dia e o vigésimo quarto dia; nesta fase a divisão celular diminui e as células crescem. O período de desaceleração de crescimento ocorreu entre o vigésimo quarto dia e o vigésimo sétimo dia. A fase estacionária, ou período no qual o número de células é constante, ocorreu a partir do vigésimo sétimo dia. Nesta fase, geralmente ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários.

Os padrões de crescimento de calos obtidos neste trabalho, para as fases exponencial e linear, foram semelhantes aos encontrados para *Cordia verbenaceae* L. (Lameira, 1997) e para *Cissus sicyoides* L. (Abreu, 1998) e diferentes para *Tridax procumbens* L. (Cerqueira, 1999). Por outro lado, os maiores valores das médias das produções das matérias fresca e seca de calos de *D. urucu* foram muito superiores aos obtido por Lameira (1997) e Cerqueira (1999). O máximo de crescimento de calos foi observado aos 24 dias de cultivo *in vitro*, independente do tipo de calo e do meio de indução, embora tenha havido um menor acúmulo das matérias fresca e seca de calos induzidos em segmento radicial de *D. urucu* com $0,8 + 1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB + BAP (Figuras 20 e 21).

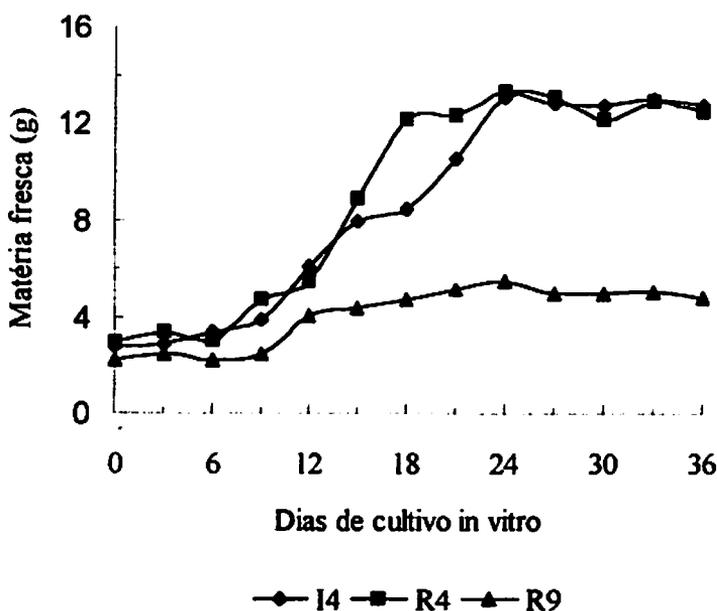


FIGURA 20 – Curvas de crescimento de calos de *Derris urucu* construídas com base na produção de matéria fresca de calos induzidos em segmento foliar (I₄) e segmentos radiciais (R₄ e R₉), durante 36 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Os nutrientes do meio podem influenciar a passagem de uma fase para outra, acelerando-a ou retardando-a. É importante obter a determinação do nutriente limitante, pois através dele pode-se ter um controle sobre a longevidade da fase estacionária (Aitchison, Macleod e Yeoman, 1977). Segundo Aitchison, Macleod e Yeoman (1977), o acúmulo de metabólitos secundários ocorre nas diferentes fases de crescimento celular, podendo ser durante a fase estacionária, com relação inversa entre crescimento e acúmulo, e acúmulo durante a fase logarítmica, quando o mesmo está associado com a divisão celular. Este acúmulo apresenta correlação aparente entre diferenciação estrutural e produção de metabólitos secundários, podendo, em vários casos, ser

devido a um aumento na habilidade de vacuolização das células para acumular estes metabólitos. O conhecimento do padrão de crescimento de calos é importante para que o manejo da cultura *in vitro* possa ser empregado com diversas finalidades na área da biotecnologia vegetal.

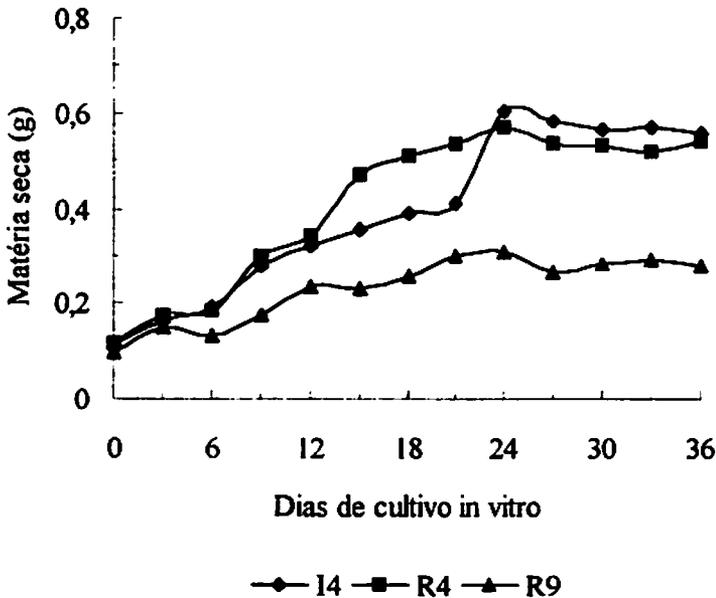


FIGURA 21 – Curvas de crescimento de calos de *Derris urucu* construídas com base na produção de matéria seca de calos induzidos em segmento foliar (I₄) e segmentos radiciais (R₄ e R₉), durante 36 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

A Figura 22 apresenta, com base nos resultados obtidos neste trabalho, um protocolo para a cultura de calos de timbós.

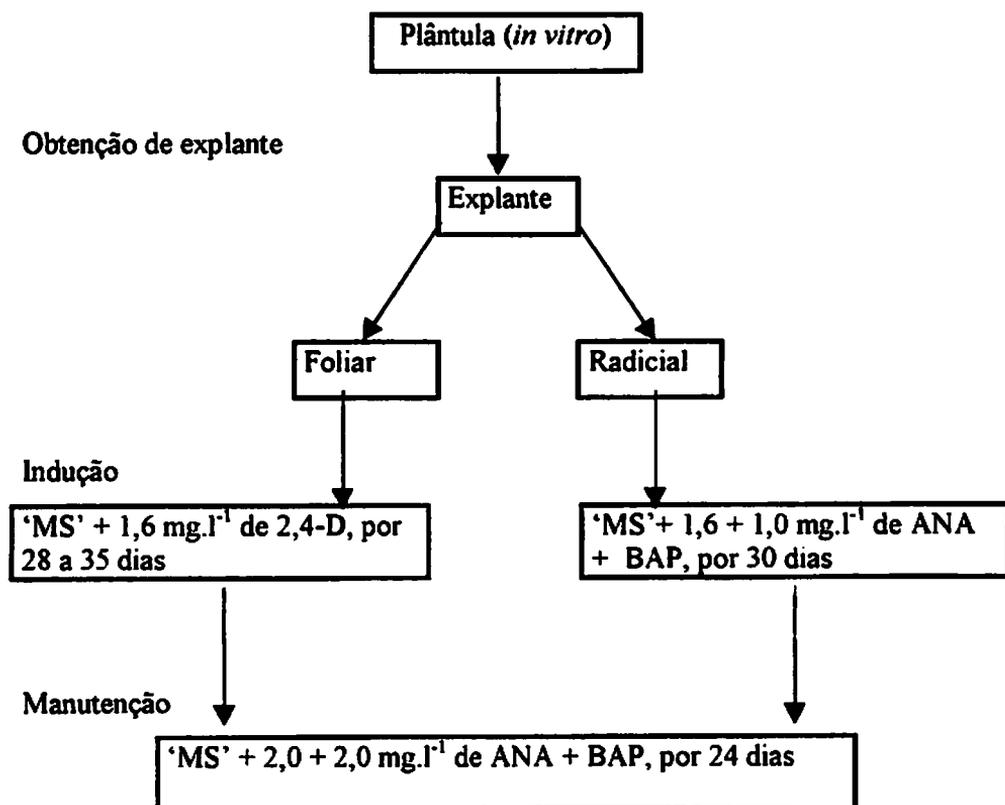


FIGURA 22 – Protocolo para indução e manutenção de calos de *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

7 CONCLUSÕES

Segmento foliar (SF) oriundo de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro* proporcionou a melhor resposta à indução de calos em meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D, após 28 ou 35 dias de cultivo *in vitro*.

Segmento radicial (SR) oriundo de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro* propiciou a melhor resposta à indução de calos em meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP ou 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

O melhor meio de manutenção de calos induzidos em segmentos foliar e radicial de *D. urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro* foi proporcionado pelo meio nutritivo 'MS', suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP.

As curvas de crescimento de calos determinadas em explantes foliar e radical oriundos de plântulas de *D. urucu* apresentam cinco fases distintas: lag, até o sexto dia; exponencial, do sexto ao décimo segundo dia; linear, do décimo segundo dia ao vigésimo quarto dia; desaceleração do vigésimo quarto dia ao vigésimo sétimo dia e estacionária a partir do vigésimo sétimo dia.

A produção máxima de crescimento de calos foi obtido aos 24 dias de cultivo *in vitro*, independentemente do tipo de explante.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. de. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- AITCHISON, P.A.; MacLEOD, A.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. (ed.) *Plant tissue and cell culture*. 2.ed. California: Blackwell Scientific Publications, 1977. p.267-306.
- ALLOUFA, M.A.I.; CAMPOS, M. de A.; SOUZA, E.V.F. de. Callus formation from acerola (*Malpighia glabra* L.) leaf explants cultivated *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Largo Drive West, v.35, n.3, p.54-A, Mar. 1999.
- BAOCHENG, Z.; AIMIN, W.; YALI, C. *et al.* Studies on tissue culture of *Pinellia pedatisecta* Schott and analysis of its medicinal composition. *Acta Agronomica Sinica*, Beijing, China, v.21, n.4, p.475-478, 1995.
- BUYUKALACA, C.; MAVITUNA, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.46, n.3, p.227-235, Sept. 1996.
- CATAPAN, E.; OTUKI, M.; VIANA, A.M. Efeito das auxinas na formação de calos de *Phyllanthus fraternus* (Euphorbiaceae). In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS. UNAERP, 4., 1999, Ribeirão Preto. Resumos...Ribeirão Preto: UNAERP, 1999. p.49.
- CERQUEIRA, E.S. Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- CHAN, J.L.; SAÉNZ, L.; TALAVENA, C.; HORNUNG, R.; ROBERT, M.; OROPECA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, New York, v.17, n.6/7, p.515-521, Apr. 1998.
- DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea carthamoides* DC. *In vitro*. *Herba-Polonica*, Pozman, v.41, n.4, p.165-169, 1995

- FRANSZ, P.F.; SCHEL, J.H.N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of mayze (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, n.1, p.26-33, Jan. 1990.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology – Plant**, Columbia, v.32, p.272-289, Oct/Dec. 1996.
- GEORGE, E.F. Plant propagation and micropropagation. In: GEORGE, E.F. (ed.). **Plant propagation by tissue culture: part 1 the technology**. 2.ed. Somerset: Exegetics, 1993. Cap.2, p.37-66.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPQ, 1990. p.203-212.
- KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. Piracicaba: ESALQ. 1996. 96p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- LAMEIRA, O.A. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. Lavras: UFLA, 1997. 87p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- LAMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M.L. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.47-49, Jan./Mar. 1997.
- LANDA, F. de S.L. **Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Lavras: UFLA, 1999. 73p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).

- LI, Q.R.; YANG, J.Y.; CAO, A.F.; ZHAO, M.; LI, Q.R.; YANG, J.Y.; CAO, A.F.; ZHAO, M. Callus culture of *Barberis pruinosa* e berberine content in callus. *Acta Botanica Yunnanica*, Yunnan, v.17, n.3, p.325-330, 1995.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- NYOCHEMBERG, L.M.; GARTON, S. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.53, n.8, p.127-134, 1998.
- PANIEGO, N.P.; GUILIETTI, A.M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Netherlands, v.36, n.2, p.163-168, 1994.
- RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. *Fitoterapia*, Roma, v.68, n.4, p.349-354, 1997.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultered *in vitro*. *Symposium of Society for Experimental Biology*, v.11, p.118-131, 1957.
- SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 171p.
- TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. (ed.). *Plant Cell Culture, a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.
- UPADHYAY, N.; MAKOVEYCHUK, A.Y.; NIKOLAEVA, L.A. *et al.*, Organogenesis and somatic embryogenesis in leaf callus culture of *Rauwolfia caffra* Sond. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.140, n.2, p.218-222, 1992.

CAPÍTULO 4

MICROPROPAGAÇÃO DE TIMBÓ

1 RESUMO

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. Micropropagação de timbó. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*.

A micropropagação é uma alternativa para propagar em larga escala espécies vegetais elites. O objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo eficiente para a micropropagação de timbós. Segmentos nodais de *Derris urucu* e de *D. nicou* apresentaram uma capacidade de desenvolvimento de gemas axilares em meio nutritivo 'MS' suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, sem regulador de crescimento. Segmentos nodais de *D. urucu* contendo duas gemas axilares, apresentaram um desenvolvimento superior em termos de número e tamanho de brotações e taxa de multiplicação quando comparados ao segmento nodal com uma gema axilar e ao explante contendo ápice caulinar. Brotações oriundas de segmentos nodais com duas gemas axilares foram enraizadas em meio nutritivo 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em AIB a 2.000 ppm, com pH ajustado para 4,5 ou 5,7 e em 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em ANA a 2.000 ppm, com pH ajustado para 5,7. *Derris urucu* não apresentou uma proliferação de brotos em forma de roseta. As concentrações de citocininas usadas não foram eficientes para promover a proliferação de brotos em timbós. O timbó mostrou uma tendência de multiplicação através de segmentos nodais. As plântulas enraizadas foram transplantadas para substrato plantmax e aclimatadas em casa-de-vegetação e apresentaram uma taxa de sobrevivência de 90%.

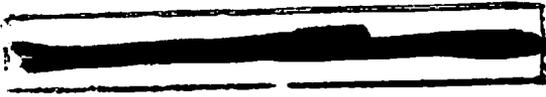
*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso – UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

2 ABSTRACT

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. "Timbó" micropropagation. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)*.

Micropropagation is an alternative for propagating in large scale top plant species. The objective of the work was to develop a efficient protocol for "timbó" micropropagation. Nodal segments of *Derris urucu* and of *D. nicou* presented a developmental capacity of axilar buds in 'MS' nutrient medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% of agar, with no growth regulator. Nodal segment of *D. urucu* containing two axilar buds presented development superior in terms of number and size of shoots and multiplication rate as compared with the nodal segment with an axilar bud and the explant containing shoot apex. Shoots from nodal segments with two axilar buds were rooted in 'MS'/2 nutrient medium + 2% of sucrose + 0.55% of agar + soaking for 30 seconds in IBA at 2,000 ppm with pH adjusted to 4.5 or 5.7 and in 'MS'/2 + 2% of sucrose + 0.55% of agar + soaking for 30 seconds in ANA at 2,000 ppm with pH adjusted to 5.7. *Derris urucu* did not present any rosette-shaped shoot proliferation. The concentrations of cytokinins used were not efficient to promote the proliferation of shoot on "timbós". The "timbó" showed multiplication trend through nodal segments. The rooted seedlings were transplanted to the substrate plantmax and acclimatized in greenhouse and presented a survival rate of 90%

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.



3 INTRODUÇÃO

Dentre as aplicações da biotecnologia vegetal, destaca-se a propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados. A micropropagação foi descrita por Giles (1985) como um processo que envolve a multiplicação *in vitro* de plantas, em condição estéril e em um meio nutritivo definido, com incorporação de reguladores de crescimento específicos que estimulam respostas de crescimento. Os reguladores de crescimento promovem respostas fisiológicas diversas, porém são empregados na técnica de micropropagação com intuito de induzir crescimento normal, desenvolver gemas axilares precoces e/ou desenvolver sistema radicular. Assim, a transferência de tecidos de plantas de um meio para outro possibilita a multiplicação, crescimento e enraizamento de plântulas, que são posteriormente transferidas para casa-de-vegetação e campo.

Muitos trabalhos contribuíram de forma eminente para o estabelecimento da metodologia de micropropagação (Morel, 1960; Murashige e Skoog, 1962; Murashige, 1974). Murashige (1974) dividiu o processo de micropropagação em três estágios: Estágio I: Estabelecimento do explante *in vitro*; Estágio II: Multiplicação do propágulo e Estágio III: Enraizamento e transferência da plântula para o solo.

Atualmente, a técnica de micropropagação tem alcançado grande sucesso, principalmente com referência às espécies de importância na horticultura. Hu e Wang (1983) atribuem este sucesso à fraca dominância apical, à grande capacidade de regeneração do sistema radicular da maioria das plantas herbáceas e também ao suporte financeiro das indústrias de alimentos do primeiro mundo. Exemplos bem sucedidos de plantas micropropagadas em escala industrial incluem *Allium*, *Asparagus*, *Brassica*, *Phaseolus*, e entre as

herbáceas ornamentais estão *Anthurium*, *Chrysanthemum*, *Gerbera*, *Gladiolus* e *Gypsophila*.

O número de arbóreas multiplicadas em escala comercial é reduzido quando comparado às espécies herbáceas. Várias dificuldades são encontradas no processo de multiplicação de plantas adultas, principalmente no estágio I por contaminações e oxidação dos explantes, e no estágio III com a dificuldade de formação de raízes adventícias. A micropropagação de arbóreas pode ser realizada por meio de três sistemas diferentes: gemas axilares, produção de gemas adventícias e embriogênese somática (Thorpe, Harry e Kumar, 1991).

A literatura especializada disponível não relata nenhuma informação acerca da micropropagação de timbós. Desta forma, considerou-se importante, neste trabalho, desenvolver um protocolo eficiente para a micropropagação destas plantas.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Aspectos gerais da micropropagação.

Explantos adequados de mais de 350 espécies de plantas vasculares, que incluem angiospermas, gimnospermas e samambaias, podem ser cultivados *in vitro* e induzidos a formar brotos adventícios, gemas, embriões e plantas inteiras (Vasil e Vasil, 1980; Mantell, Mathews e McKee, 1994).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis. Ao contrário do que se acredita, por exemplo, a composição do meio de cultura não é a variável determinante do sucesso da micropropagação ou segredo de um protocolo comercial (Grattapaglia e Machado, 1998).

Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos. O verdadeiro desafio, portanto, está no material vegetal e na sua manipulação antes de excisar o explante inicial, e em todos os passos até o transplante da planta produzida (Grattapaglia e Machado, 1998).

4.2 Respostas de explantes nodais e internodais e de reguladores de crescimento.

Um protocolo eficiente e seguro para a propagação rápida de clones superiores de phlox (*Phlox paniculata* L.) foi descrito por Mackay, Sankhla e Sankhla (1999) usando segmentos nodal e internodal cultivados em meio 'MS' contendo 3% de sacarose, 0,25% de gelrite e BA ou TDZ, numa faixa de concentração de 1 – 20 μM . Após 4 a 5 semanas, até 2 brotos axilares proliferaram sobre explante uninodal, enquanto em multinodal, formaram-se de 4 a 7 brotos na porção terminal do explante. Os brotos foram colocados em meio nutritivo contendo 1 μM de BA e 5 μM de AIB, resultando, em ambos, o alongamento de brotos e o enraizamento, simultaneamente. A BA foi mais efetiva do que TDZ e induziu um grande número de brotos. A adição de TDZ resultou na formação extensiva de calos e decresceu o número de brotos, os quais permaneceram pequenos e atrofiados.

Sul e Korban (1994) investigaram a influência de diferentes citocininas, em várias concentrações, sobre a proliferação e o alongamento de 5 genótipos de *Sequoia sempervirens*, usando segmentos de caule de plantas crescidas em casa-de-vegetação, em meio nutritivo de Wolter & Skoog (WS) sem regulador de crescimento, durante 4 semanas. Brotos novos desenvolvidos desde gemas

axilares foram então subcultivados num meio fresco contendo diferentes citocininas, cada uma na concentração de 5 μM por tratamento. Cada genótipo respondeu diferentemente às citocininas testadas. O uso da zeatina resultou num maior número de brotos e brotos maiores para 3 genótipos de *S. semprevirens*.

Sahoo, Pattnaik e Chand (1997) descreveram um protocolo eficiente para a propagação *in vitro* de uma planta herbácea aromática e medicinal, *Ocimum basilicum* L. ("sweet basil"), através da proliferação de brotos axilares de explantes nodais, coletados de plantas crescidas em campo. Alta frequência de quebra de gema e o máximo número de formação de broto axilar foi induzida em explantes nodais sobre meio nutritivo de 'MS' contendo BA a 1,0 mg.l^{-1} . Além disso, o crescimento e a proliferação de brotos necessitaram de transferência para um meio contendo BA em concentração relativamente baixa (0,25 mg.l^{-1}). Ácido giberélico (GA_3) a 0,4 mg.l^{-1} adicionado ao meio, junto com BA a 1,0 mg.l^{-1} , aumentou a frequência da quebra de gemas. Brotos formados *in vitro* foram enraizados sobre o meio 'MS' a meia força, suplementados com 1,0 mg.l^{-1} de AIB. Plântulas enraizadas foram sucessivamente aclimatadas em vermiculita, dentro de uma câmara de crescimento, e eventualmente estabelecidas em solo.

4.3 Respostas de explantes de ápices caulinares e de reguladores de crescimento.

Um método rápido para a propagação *in vitro* de garlic foi descrito por Alloufa e Souza (1999). O método consiste na multiplicação *in vitro* por cultura de ápice caulinar, em meio nutritivo de 'MS'. Os resultados mostraram que a formação de brotos adventícios ou raízes dependeram dos níveis dos reguladores de crescimento usados. A proliferação de brotos adventícios foi máxima em meio nutritivo contendo 2 mg.l^{-1} de Kin e 0,5 mg.l^{-1} de ANA. Os brotos adventícios foram enraizados e cresceram como plantas normais.

Um sistema de micropropagação para *Acacia mearnsii* De Wild foi descrito por Huang, Al-khayri e Gbur (1994) usando ápice caulinar de 5 mm de comprimento oriundo de plântulas germinadas *in vitro*, com 3 semanas de idade. Estes foram cultivados em 'MS' a ¾ de força e suplementados com combinações de auxinas (AIB e ANA) e citocininas (Kin e BAP). A formação de multibrotos foi promovida com BAP a 2 mg.l⁻¹ e a combinação mais alta de BAP (6 mg.l⁻¹) com ou sem 0,01 mg.l⁻¹ de AIB. Citocininas em concentrações menores do que 1 mg.l⁻¹, combinadas com auxinas na concentração de 0,01 a 0,1 mg.l⁻¹, inibiram a formação de multibrotos e promoveram o enraizamento de explantes de ápices caulinares. Culturas de multibrotos foram mantidas pela transferência de segmentos de aglomerados de multibrotos em meio nutritivo contendo 2 mg.l⁻¹ de BAP e 0,01 mg.l⁻¹ de AIB. Níveis mais altos de BAP promoveram mais formação de multibrotos e permitiram o alongamento de brotos tão bem quanto a multiplicação. Brotos produzidos *in vitro* foram induzidos ao enraizamento em meio 'MS' a meia força com 0,6 mg.l⁻¹ de ANA. As plântulas foram transferidas para vasos contendo solo e exibiram crescimento normal sob condições de casa-de-vegetação.

Jusaitis (1995) desenvolveu métodos para propagação *in vitro*, produção de plântulas enraizadas e estabelecimento no solo em *Phebalium equestre* D. A. e *Phebaltum hillebrandii* J. H. Willis, usando ápice caulinar e segmento nodal. Para cada espécie, a proliferação de broto foi iniciada sobre o meio De Fossard MZZM suplementado com 1 µM de BA. Brotos excisados de *P. equestre* iniciaram o enraizamento quando cultivados em meio MZZM contendo 60 µM de 2,4-D, enquanto *P. hillebrandii* necessitou do meio LZZL contendo 10 µM de 2,4-D para o máximo de enraizamento. Ambas as espécies necessitaram ser transferidas para meio MZZM sem regulador de crescimento após 2 semanas de enraizamento inicial, para melhor crescimento e desenvolvimento. As plântulas

foram sucessivamente transferidas para solo com 80% de sobrevivência, após 2 meses.

Chen, Hu e Huang (1995) desenvolveram um protocolo baseado na cultura de brotos de plântulas de *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae) de um mês de idade, visando a multiplicação assexual rápida. Ápices caulinares excisados com 3-5 mm de comprimento foram usados como explante. O meio nutritivo de 'MS' suplementado com 1 mg.l⁻¹ de BA foi empregado para estabelecer as culturas primárias e subsequentes multibrotos. Brotos são subcultivados sobre o mesmo meio e podem ser aumentados em uma taxa de 7,5 novos brotos por setor de 2 brotos a cada 3 semanas. O enraizamento foi realizado em meio com gelrite contendo sais de 'MS' a 1/3 da força, suplementado com 0,1 mg.l⁻¹ de ANA.

4.4 Respostas de diversos explantes e reguladores de crescimento.

Sarma e Rogers (1999) estabeleceram um método para indução *in vitro* de multibrotos de *Juncus effusus*, uma monocotiledônea de terras úmidas usada para remediar água poluída e na medicina popular. Plântulas crescidas *in vitro*, em meio 'MS' suplementado com BA, 2-iP e Kin, promoveram a indução de multibrotos. Entre as três citocininas, 2-iP causou uma mais alta frequência de regeneração e de número de brotos por explante. A cinetina causou a menor regeneração.

Estudos de Barringer, Mohamed-Yasseen e Splittstoesser (1996) descrevem um procedimento para regenerar brotos e plantas a partir de eixo embrionário de plântulas de abacate com benziladenina e thidiazuron. Explantes foram crescidos no escuro por 10 dias, e então transferidos para fotoperíodo de 18 h para indução de multibrotos. Aumentos na concentração de benziladenina ou thidiazuron resultaram num aumento de produção de brotos. Brotos foram transferidos para um meio nutritivo promotor de broto, no qual brotos adicionais

foram formados. Cerca de 80% dos brotos com raízes sobreviveram em casa-de-vegetação e produziram plantas fenotipicamente normais.

Parra e Amo-Marco (1998) relatam que dois estoques de brotos crescidos *in vitro*, obtidos de plântulas ou de plantas adultas, foram usados para estudar os efeitos do material de origem, do número de subculturas prévias sobre o meio de estabelecimento, do tipo de explante e dos macronutrientes sobre a multiplicação e o alongamento de broto em *Myrtus communis* L., sempre na presença de 4,4 μ M de BA. A proliferação de brotos foi influenciada principalmente pela origem do estoque, com respostas mais altas em material adulto do que em plântulas, e pelo número de subculturas, com taxas mais altas de multiplicação e alongamento na primeira subcultura. Na primeira subcultura, o material adulto foi caracterizado por taxas altas de multiplicação e alongamento de brotos, e alguns brotos apresentavam-se hiperhídricos. Por outro lado, a primeira subcultura de material de plântulas foi caracterizada pela mais baixa taxa de multiplicação e alongamento de brotos, e alguns brotos estavam afetados por necrose apical. Na terceira e quinta subculturas, a multiplicação e o alongamento de brotos declinou em ambos os materiais, e hiperhidricidade ou necrose apical não foram encontradas, embora uma mais alta multiplicação e alongamento de brotos tenham sido consistentemente encontradas para o material adulto.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Com exceção do experimento sobre efeitos de TDZ, no qual foram utilizados explantes de *D. nicou* oriundos do clone 495, cultivados em casa-de-vegetação, nos demais usaram-se explantes nodais contendo uma ou duas gemas axilares, obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, de *D. urucu*, de exemplares do clone 37. Os explantes foram inoculados no meio nutritivo 'MS' e mantidos em

sala de crescimento sob irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura e umidade relativa do ar de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e $70\pm 5\%$, respectivamente, e fotoperíodo de 16 h. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para as variáveis de respostas em questão. Quando significativos, procederam-se as análises de regressão polinomial e/ou as comparações das médias pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, de acordo com a natureza dos tratamentos usados.

5.1 Efeitos de BAP e TDZ sobre explantes nodais de *Derris urucu* e *Derris nicou* visando à indução de brotos.

5.1.1 Efeitos de BAP

Explantes nodais contendo uma ou duas gemas axilares foram inoculados no meio nutritivo 'MS' contendo 0,7% de ágar, 3 ou 4% de sacarose e 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.l^{-1} de BAP, os quais constituíram os tratamentos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento durante 28 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: número de brotos (NB) e tamanho de brotos (TB, em cm). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 4 \times 2$ (2 tipos de explantes, 4 concentrações de BAP e 2 concentrações de sacarose), com 5 repetições, cada uma constituída por 2 tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura.

5.1.2 Efeitos de TDZ

Explantes nodais contendo uma ou duas gemas axilares foram obtidos de plantas de *D. nicou* e inoculados no meio básico de MS contendo 0,7% de ágar e 3% de sacarose, suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.l^{-1} de TDZ, os quais constituíram os tratamentos. Os tratamentos foram mantidos em sala de

crescimento durante 28 dias e os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: número de brotos (NB) e tamanho de brotos (TB, em cm). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5 (2 tipos de explantes e 5 concentrações de TDZ), com 4 repetições, cada uma constituída por dois tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura.

5.2 Efeitos de concentrações de sacarose e de BAP, do número de gemas axilares em explante nodal e de explante contendo ápice caulinar na indução de brotos em timbó.

Explantes nodais com uma ou duas gemas axilares e explante com cerca de 1 cm de comprimento, contendo o ápice caulinar de plântulas de *D. urucu*, foram inoculados em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de meio nutritivo 'MS', 3 ou 4% de sacarose, 0,0 ou 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para 5,7±0,1, durante 21 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: número de brotos (NB), tamanho de brotos (TB, em cm) e taxa de multiplicação (TM). O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com 10 tratamentos (Quadro 1) e 12 repetições, cada uma constituída por 1 tubo de ensaio.

QUADRO 1 – Tratamentos do experimento sobre efeitos de concentrações de sacarose e de BAP, do número de gemas axilares em explante nodal e de explante contendo ápice caulinar na indução de multibrotações em timbó. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento	Composição do tratamento ¹
1	SN ₁ + Sacarose 3% + 0,0 mg.l ⁻¹ de BAP
2	SN ₂ + Sacarose 3% + 0,0 mg.l ⁻¹ de BAP
3	SN ₁ + Sacarose 4% + 0,0 mg.l ⁻¹ de BAP
4	SN ₂ + Sacarose 4% + 0,0 mg.l ⁻¹ de BAP
5	SN ₁ + Sacarose 3% + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP
6	SN ₂ + Sacarose 3% + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP
7	SN ₁ + Sacarose 4% + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP
8	SN ₂ + Sacarose 4% + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP
9	Segmento com ápice caulinar + SAC 3% + 0,0 mg.l ⁻¹ de BAP
10	Segmento com ápice caulinar + SAC 3% + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP

¹ SN₁ e SN₂ = Explantes com uma ou duas gemas axilares; BAP = 6-Benzilaminopurina e SAC = Sacarose.

5.3 Indução de brotos adventícios em explantes nodais com duas gemas axilares e de explante contendo ápice caulinar de timbó

Explantes nodais contendo duas gemas axilares e explante com cerca de 1 cm de comprimento, contendo o ápice caulinar, oriundos de plântulas de *D. urucu*, foram inoculados em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de meio nutritivo 'MS' com as seguintes formulações: MS com ½ da concentração dos sais, sem regulador de crescimento (IB-1); 'MS' com ½ da concentração dos sais + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 0,5 mg.l⁻¹ de ANA + 0,5 mg.l⁻¹ de GA₃ (IB-2); 'MS' com ½ da concentração dos sais + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 0,5 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de GA₃ (IB-3); 'MS' com ½ da concentração dos sais (soluções C, D, E e F), onde: C = 6,2 mg de H₃BO₃ + 170 mg de KH₂PO₄ + 0,83 mg de KI + 0,25 mg de Na₂MoO₄.2H₂O + 0,025 mg de CoCl₂.6H₂O; D = 440 mg de CaCl₂; E = 370 mg de MgSO₄.7H₂O + 22,3 mg de MnSO₄.4H₂O + 8,6 mg de ZnSO₄.7H₂O + 0,025 mg de CuSO₄.5H₂O e F = 37,25 mg de Na₂EDTA.2H₂O + 27,85 mg de FeSO₄.7H₂O, por litro de solução, todo o KNO₃,

sem NO_3NH_4 + 0,5 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 0,5 mg.l⁻¹ de GA_3 (IB-4); 'MS' com ½ da concentração dos sais (soluções C, D, E e F), todo o KNO_3 , sem NO_3NH_4 + 0,5 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 1,0 mg.l⁻¹ de GA_3 (IB-5) e 'MS' com ½ da concentração dos sais (soluções C, D, E e F), todo o KNO_3 , sem NO_3NH_4 , sem regulador de crescimento (IB-6). Os meios de cultura foram solidificados com 0,7% de agar, sacarose 3%, pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e mantidos em sala de crescimento durante 21 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: número de brotos (NB) e tamanho de brotos (TB, em cm). O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 6 (2 tipos de explantes e 6 formulações de meios de cultura), com 6 repetições, cada uma constituída por 1 tubo de ensaio.

5.4 Indução de brotos e enraizamento em explante nodal com duas gemas axilares oriundo de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro*.

O experimento constou de duas etapas: a) indução de alongamento de gema axilar e/ou brotos adventícios e b) indução de enraizamento de brotos oriundos de gema axilar e/ou adventícia. Na primeira etapa foram usados os seguintes tratamentos: MN-1 = 'MS' com 3% de sacarose, 0,7% de agar, sem regulador de crescimento e MN-2 = 'MS' com 3% de sacarose, 0,7% de agar + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP. Na segunda etapa, as brotações oriundas dos tratamentos MN-1 e MN-2 foram distribuídas em 5 formulações do meio nutritivo 'MS' e 2 valores de pH, totalizando 20 tratamentos, cada um contendo 3 tubos de ensaio por repetição com 15 mL de meio nutritivo solidificado com agar a 0,55%. O Quadro 2 apresenta a estrutura dos tratamentos usados na segunda etapa. Os meios de cultura contendo os tratamentos respectivos foram mantidos em sala de crescimento durante 21 dias, em cada fase do experimento. Na primeira etapa do experimento, os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis

de resposta: número de brotos (NB), tamanho de brotos (TB, em cm), taxa de multiplicação (TM), pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente, em g) e pesos das matérias fresca e seca de brotos (MFBROT e MSBROT, respectivamente, em g). Na segunda etapa, os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: porcentagem de enraizamento (%R), número de raízes (NR) e tamanho de raízes (TR). Na primeira fase do experimento, o delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 7 repetições, cada uma composta por 3 tubos de ensaio contendo 15 mL do meio nutritivo. Na segunda etapa, o delineamento usado foi inteiramente casualizado, em fatorial 2 x 5 x 2 (brotações oriundas dos tratamentos – MN-1 e MN-2, 5 formulações do meio nutritivo ‘MS’ e 2 pHs), com 3 repetições cada uma com 3 tubos de ensaio.

QUADRO 2 – Tratamentos usados na segunda etapa do experimento de indução e enraizamento de brotos oriundos de explante nodal com duas gemas axilares de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Identificação	Tratamentos
1 A pH 4,5	‘MS’/2 + sacarose 2%, sem regulador de crescimento
2 A pH 4,5	‘MS’/2 + sacarose 2% + 0,5 mg.l ⁻¹ de ANA
3 A pH 4,5	‘MS’/2 + sacarose 2% + 0,5 mg.l ⁻¹ de IBA
4 A pH 4,5	‘MS’/2 + sacarose 2% + I/30” em IBA a 2.000 ppm.
5 A pH 4,5	‘MS’/2 + sacarose 2% + I/30” em ANA a 2.000 ppm.
1 B pH 5,7	‘MS’/2 + sacarose 2%, sem regulador de crescimento
2 B pH 5,7	‘MS’/2 + sacarose 2% + 0,5 mg.l ⁻¹ de ANA
3 B pH 5,7	‘MS’/2 + sacarose 2% + 0,5 mg.l ⁻¹ de IBA
4 B pH 5,7	‘MS’/2 + sacarose 2% + I/30” em IBA a 2.000 ppm.
5 B pH 5,7	‘MS’/2 + sacarose 2% + I/30” em ANA a 2.000 ppm.

‘MS’/2 = ‘MS’ com a metade das concentrações dos macro e micronutrientes.

I/30” = imersão por 30 segundos de 0,5 cm da parte distal da brotação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeitos de BAP

6.1.1 Número e tamanho de brotos em explante nodal de timbó com uma ou duas gemas axilares.

Os resultados das análises de variâncias são apresentados na Tabela 15. Para número de brotos, verificaram-se efeitos significativos para os fatores BAP e segmentos nodais, as interações sacarose*BAP e BAP*segmentos nodais e para a interação tripla, enquanto, para tamanho de brotos, observaram-se efeitos significativos para todos os fatores individuais e suas interações, com exceção da interação tripla.

TABELA 15 - Resumo das análises de variâncias para NB e TB, em segmento nodal de *Derris urucu* contendo uma ou duas gemas axilares, submetidos às concentrações e combinações de SAC e BAP. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		NB ²	TB ³
Sacarose (Sac)	1	0,00005 ^{NS}	2,2499*
BAP	3	0,4221**	8,6402**
Segmento nodal (SN)	1	0,4509**	3,5156**
Sac x BAP	3	0,0985**	1,4538*
Sac x SN	1	0,0197 ^{NS}	2,8900*
BAP x SN	3	0,0783**	3,0794**
Sac x BAP x SN	3	0,0516*	0,8829 ^{NS}
Resíduo	48	0,0174	0,4306
Média	-	1,6524	2,2406
CV (%)	-	7,9720	29,2870

¹ NS, * e ** = Não significativo e significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

² Dados transformados para raiz ($x + 1$).

³ Dados não transformados

Com relação ao número de brotos, verifica-se, na Tabela 16, que os tratamentos contendo uma gema axilar, em meio de cultura contendo 1,0 mg.l⁻¹ de BAP + 3% de sacarose ou 2,0 mg.l⁻¹ de BAP + 4% de sacarose, diferiram estatisticamente dos demais tratamentos, de combinação segmento nodal*sacarose*BAP. Os tratamentos contendo duas gemas axilares, não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos formulados com 3 ou 4% de sacarose, ou mesmo com o presença de BAP no meio de cultura.

TABELA 16 – Médias da interação tripla para número de brotos, induzidos em explantes de *Derris urucu* oriundos de segmentos nodais contendo uma ou duas gemas axilares, submetidos às variações de concentrações e combinações de sacarose e BAP¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Segmento nodal	BAP (mg/L)	Sacarose (%)	
		3	4
Uma gema axilar	0,0	1,00 a	1,00 a
	1,0	1,96 a	1,00 b
	2,0	1,00 b	1,96 a
	4,0	2,24 a	1,73 a
Duas gemas axilares	0,0	1,00 a	1,00 a
	1,0	2,24 a	2,48 a
	2,0	2,24 a	2,74 a
	4,0	2,48 a	2,24 a

¹ Médias seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas comparam as concentrações de BAP dentro de cada combinação de segmento nodal * sacarose e diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Pela Figura 23, verifica-se que o número de brotos no segmento nodal com uma gema axilar teve uma tendência de aumento linear, independentemente da concentração de sacarose no meio de cultura, enquanto no segmento nodal com duas gemas axilares, este comportamento foi quadrático, com aumentos até 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, com 3 ou 4% de sacarose.

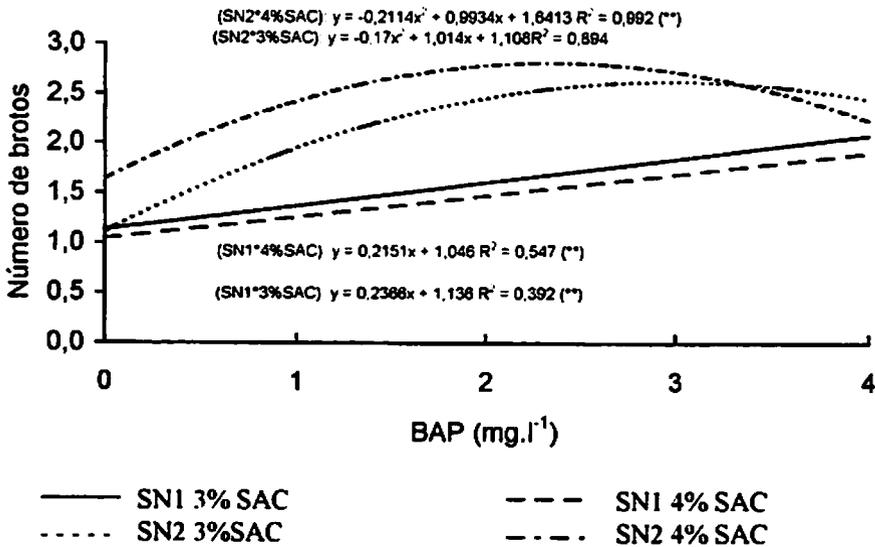


FIGURA 23 – Regressões polinomiais para os níveis da interação tripla para número de brotos, em segmentos nodais com uma gema axilar (SN₁) e duas gemas axilares (SN₂) de *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Verificou-se que o maior tamanho de brotos em explante nodal de *D. urucu* foi encontrado para as concentrações de 0,0 e 1,0 mg.l⁻¹ de BAP e 3% de sacarose (Tabela 17). Esta variável, na presença de 3 ou 4% de sacarose, teve tendências de comportamento quadrático e linear, respectivamente, além de redução significativa de crescimento, em concentrações de BAP superiores a 1 mg.l⁻¹ (Figura 24).

TABELA 17 – Comparação das médias da interação sacarose*regulador de crescimento para tamanho de brotos de *Derris urucu*, em segmentos nodais com uma e duas gemas axilares, submetidos às variações de concentrações e combinações de sacarose e BAP¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Regulador de crescimento (BAP, em mg.l ⁻¹)	Sacarose (%)	
	3	4
0,0	3,68 a	2,90 b
1,0	2,56 a	1,60 b
2,0	1,86 a	2,18 a
4,0	1,60 a	1,54 a

¹ Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas comparam as concentrações de sacarose dentro de cada concentração do regulador de crescimento e diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

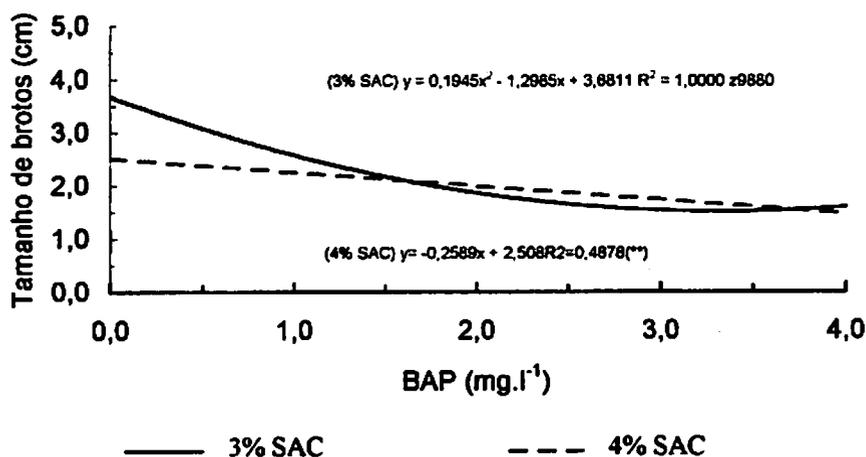


FIGURA 24 – Regressões polinomiais para os níveis da interação regulador de crescimento*sacarose para tamanho de brotos, em *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Na Tabela 18 verifica-se que o melhor tratamento deste experimento foi encontrado para segmentos nodais com duas gemas axilares em meio nutritivo contendo 3% de sacarose. Observa-se, também, que esta variável teve um

comportamento linear e quadrático, respectivamente para segmentos nodais com uma e duas gemas axilares, sendo que o maior tamanho de brotos foi encontrado na ausência de BAP (Figura 25).

TABELA 18 – Comparação para médias da interação sacarose*segmento nodal para tamanho de brotos (em, cm) de *Derris urucu*, oriundos de segmentos nodais com uma e duas gemas axilares submetidos às variações de concentrações e combinações de sacarose e segmento nodal¹. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Sacarose (%)	Segmento nodal	
	Uma gema axilar	Duas gemas axilares
3	1,98 a	2,86 a
4	2,03 a	2,08 b

¹ Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas comparam as concentrações de sacarose dentro de cada tipo de segmento nodal e diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

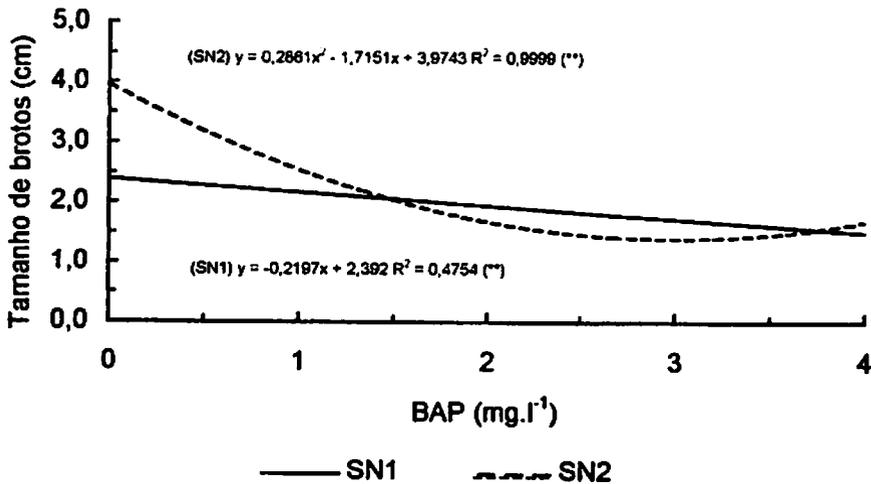


FIGURA 25 – Regressões polinomiais para os níveis da interação regulador de crescimento (RC)*segmentos nodais (SN) para tamanho de brotos, em *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Os efeitos de reguladores de crescimento na indução de brotações e/ou no desenvolvimento de gemas axilares oriundas de explantes nodais de várias espécies têm sido descritos na literatura especializada, conforme citam Mackay, Sankhla e Sankhla (1999) em *Phlox paniculata* L.; Sul e Korban (1994) em *Sequoia semprevirens*; Sahoo, Pattnaik e Chand (1997) em *Ocimum basilicum* L. ('sweet basil'); Jusaitis (1995) em *Phebalium equestre* D.A. e *P. hillebrandii* J.H. Willis; Cerqueira (1999) em *Tridax procumbens* L.; Fidelis (1998) em *Brosimum guadichaudii* Tréc.; Coelho (1999) em *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.; Pereira (1999) em *Echinodorus cf scaber* Rataj.; Lameira (1997) em *Cordia verbenaceae* L.; Costa (1995) em *Cephaelis ipecacuanha* e Abreu (1998) em *Cissus sicyoides*.

A adição de reguladores de crescimento tem por objetivo principal suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz. A adição de citocinina é favorável ou até necessária. Hu e Wang (1983) estudaram a frequência de utilização de cada citocinina em meios de isolamento para cerca de 100 espécies, e verificaram que o BAP é utilizado em 68% dos meios, a cinetina em 23% e o 2-iP, zeatina e o SD 8339 (6-benzil-9-tetrahidropirone adenina) em 9%. A adição de citocinina ao meio de cultivo é imprescindível para que se obtenha qualquer sistema de proliferação (Metivier, 1979), e a concentração exógena de citocininas parece ser o principal fator que influencia na taxa de multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998).

Neste trabalho, a influência de concentrações de sacarose e BAP e de segmentos nodais de explantes de *D. urucu*, avaliada em termos de número e tamanho de brotos, mostrou que as médias de número de brotos em segmentos nodais com duas gemas axilares foram sempre maiores do que em segmento nodal com uma gema axilar, independentemente das concentrações de sacarose e BAP (Tabela 16 e Figura 23); para tamanho de brotos, o maior tamanho médio

de brotos foi encontrado na ausência de BAP (Tabela 17 e Figuras 24 e 25). Estes resultados são diferentes dos relatados por Quraishi e Mishra (1998) para segmentos nodais de plantas adultas de *Cleistanthus collinus* cultivados em meio 'MS' suplementado com 0,44 μM (equivalente a 0,1 mg.l^{-1}) de BAP; no entanto, são semelhantes aos encontrados por Cerqueira (1999) para *Tridax procumbens* L.; Pereira (1999) para *Echinodorus cf. scraber* Rataj. e Saleh e Shepherd (1997) para *Clusia nemorosa*.

Na Figura 26 observam-se as respostas morfogenéticas de BAP em segmentos nodais de *D. urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*.

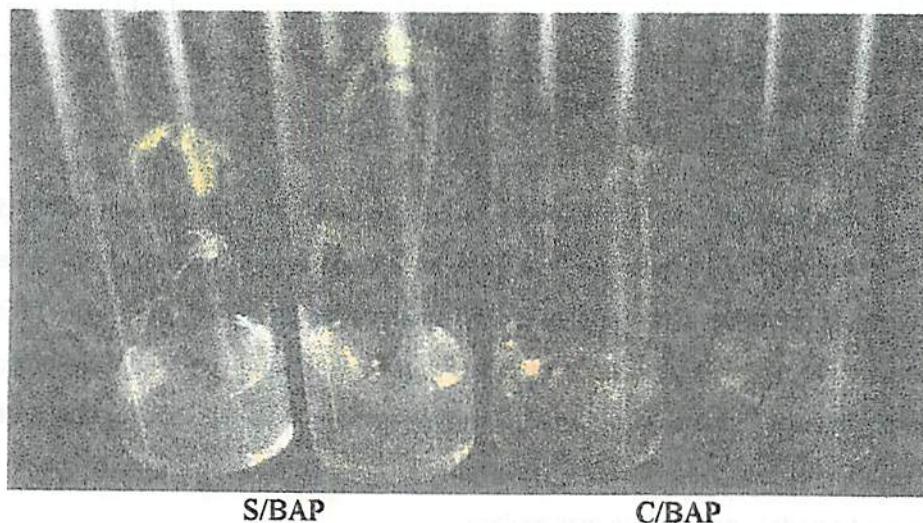


FIGURA 26 – Respostas morfogenéticas de BAP em segmentos nodais de *Derris urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.2 Efeitos de TDZ

6.2.1 Número e tamanho de brotos em explante nodal de timbó contendo uma ou duas gemas axilares.

Os resultados das análises de variância são apresentados na Tabela 19. Para número de brotos, verificaram-se efeitos significativos dos fatores TDZ e

segmento nodal, e para tamanho de brotos, observou-se efeito significativo apenas para TDZ.

TABELA 19 - Resumo das análises de variâncias para NB e TB em segmento nodal de *Derris nicou*, contendo uma ou duas gemas axilares, submetidos ao TDZ. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância ¹	
		NB ²	TB ³
TDZ (T)	4	0,3428**	7,11163**
Segmento nodal (SN)	1	0,5473**	0,9923 ^{NS}
T x SN	4	0,0609 ^{NS}	1,0160 ^{NS}
Resíduo	30	0,0522	0,3221
Média	-	1,6828	1,2125
CV (%)	-	13,5780	46,8060

¹ ^{NS} e ** = Significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

² Dados transformados para raiz (x + 1).

³ Dados não transformado.

Para número de brotos, observou-se que os efeitos das concentrações de TDZ sobre a indução de brotos em segmentos nodais com uma ou duas gemas axilares apresentaram um aumento até a concentração de 0,5 mg.l⁻¹ de TDZ, decrescendo nas demais concentrações (Figura 27). O número médio de brotos em segmentos nodais com uma ou duas gemas axilares, observado neste trabalho, foi de 1,45 e 2,24, respectivamente, com superioridade para o segmento nodal com duas gemas axilares.

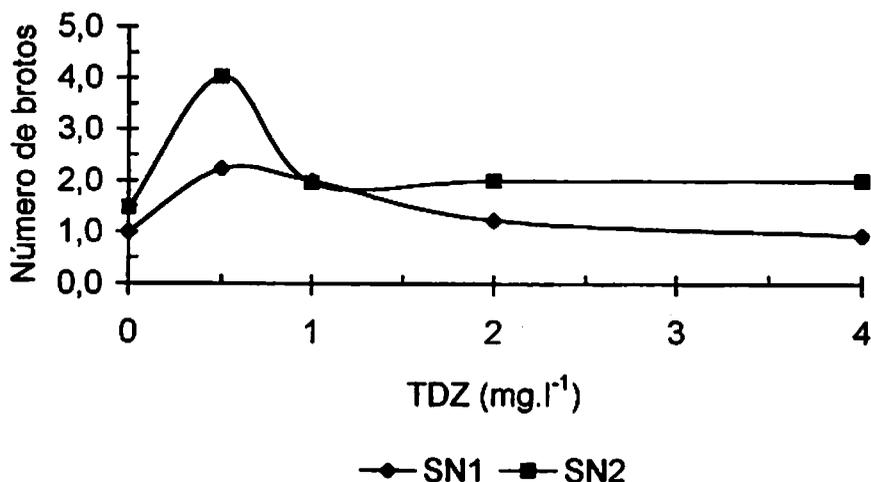


FIGURA 27 - Número de brotos induzidos com níveis de TDZ em segmentos nodais com uma e duas gemas axilares de *Derris nicou*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Para tamanho de brotos, observou-se que os efeitos das concentrações de TDZ sobre essa variável, em segmentos nodais com uma e duas gemas axilares, apresentaram comportamento quadrático, verificando-se um decréscimo no tamanho de brotos na presença de TDZ. Constatou-se que segmentos nodais com duas gemas axilares, em meio nutritivo 'MS' sem regulador de crescimento, foram superiores ao segmento nodal com uma gema axilar (Figura 28). Neste trabalho, a indução de brotos em segmentos nodais com uma e duas gemas axilares de *D. nicou*, proporcionadas pelo TDZ e avaliadas através do número e tamanho de brotos, mostrou que o TDZ exibiu uma resposta negativa sobre o número de brotos nessa espécie. Estes resultados corroboram os obtidos por Fidelis (1998) para *Brosimum guadichaudii* Tréc. e Cerqueira (1999) para *Tridax procumbens* L., porém diferem dos obtidos para *Phyllanthus niruri* (Becker, 1997) usando TDZ nas concentrações de 0 a 1 mg.l⁻¹, que obteve

brotações em forma de rosetas, sendo que o melhor resultado foi obtido com 0,125 mg.l⁻¹ de TDZ , que propiciou uma média de 5 brotos por explante.

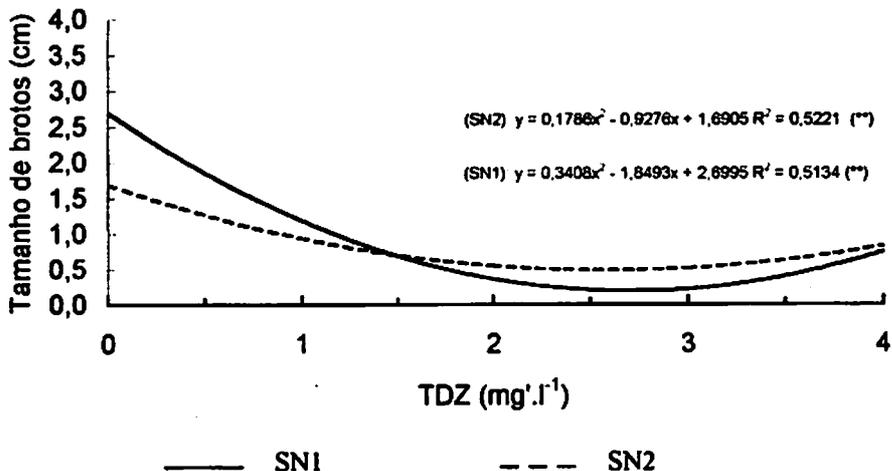


FIGURA 28 - Regressões polinomiais com níveis de TDZ para tamanho de brotos induzidos em segmentos nodais de *Derris nicou*, contendo uma e duas gemas axilares. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Comparando os resultados de indução de brotos em segmentos nodais de *D. urucu* e *D. nicou*, em meio 'MS' suplementado com BAP e TDZ, nota-se que estes reguladores de crescimento produziram respostas morfogenéticas depressivas nestas espécies. De modo geral, estes reguladores de crescimento apresentam respostas significativas de estabelecimento, indução e multiplicação em explantes nodais de diversas espécies (Lameira, 1997; Pereira, 1999; Sahoo, Pattnaik e Chand, 1997).

As citocininas geralmente estimulam a divisão celular, quebra da dormência de gemas axilares e indução da formação de gemas adventícias. A divisão celular é regulada pela ação conjunta das auxinas e citocininas, cada uma influenciando uma determinada fase do ciclo celular. As auxinas afetam a replicação do DNA, enquanto as citocininas parecem exercer

algum controle sobre os eventos que levam à mitose e citocinese. Desta forma, os níveis de auxinas e citocininas em culturas *in vitro* são balanceados e controlados. Entretanto, as respostas de células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* podem variar de acordo com as condições da cultura, do tipo do explante e do genótipo (Gaspar *et al.*, 1996). Neste trabalho, os resultados obtidos parecem indicar que não há necessidade de utilizar os reguladores de crescimento BAP e TDZ, sugerindo que os tecidos destas espécies parecem sintetizar e/ou conter estes hormônios em quantidades suficientes para manter um padrão de crescimento com dominância apical e fornecer um número razoável de segmentos nodais para favorecer um eficiente sistema de propagação.

Na Figura 29 observam-se os efeitos de TDZ em segmentos nodais de *Derris nicou* oriundos de plantas crescidas em casa-de-vegetação, enquanto os efeitos morfogenéticos gerais de BAP e TDZ em explantes nodais de *D. urucu* e *D. nicou* são mostrados na Figura 30.

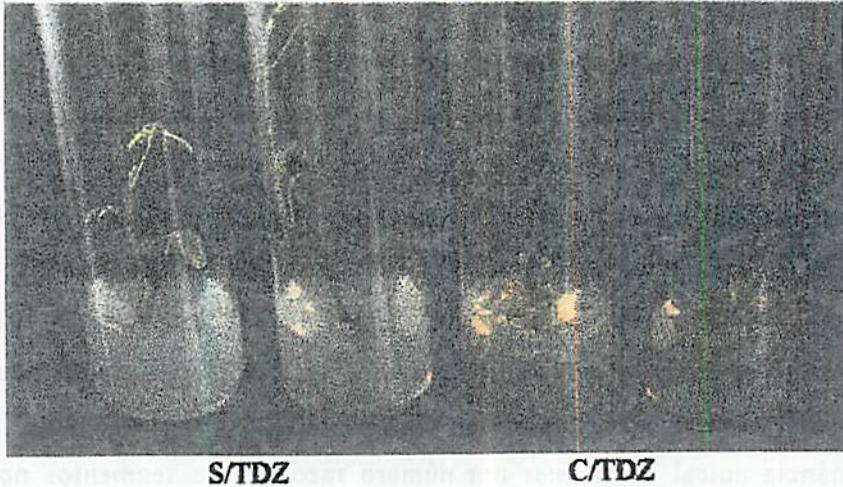


FIGURA 29 – Aspecto geral dos efeitos de TDZ em segmentos nodais de *Derris nicou* oriundos de plantas crescidas em casa de vegetação. UFLA, Lavras - MG, 2000.

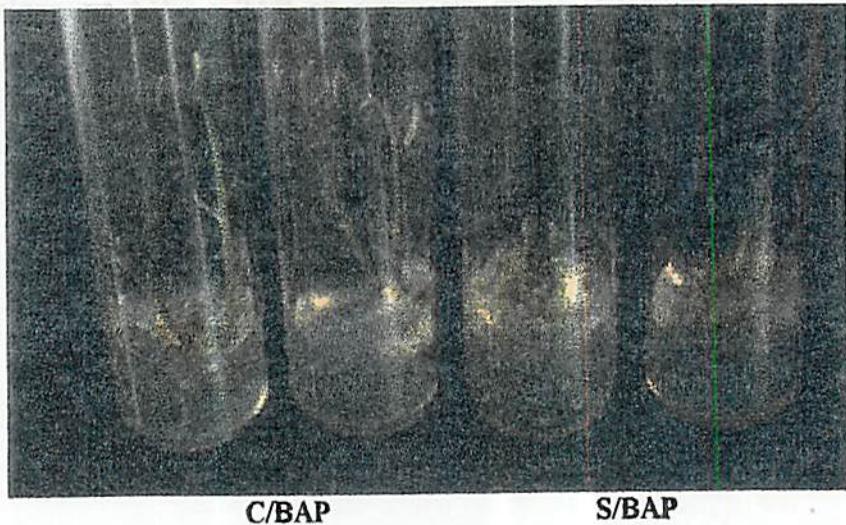


FIGURA 30 – Aspecto geral dos efeitos de BAP, em *Derris urucu* e de TDZ, em *D. nicou*, em segmentos nodais. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.3 Efeitos de concentrações de sacarose e BAP e do número de gemas axilares em explante nodal e de explante contendo ápice caulinar na indução de brotos em timbó.

Os resultados das análises de variância dos dados referentes ao número e tamanho de brotos e a taxa de multiplicação de diversos tipos de explantes de *D. urucu* são apresentados na Tabela 20. Podem ser verificados efeitos significativos para tratamentos. Pela Tabela 21, verifica-se, para número de brotos, que os tratamentos 6 e 8 foram superiores aos demais, com médias de 2,6 e 2,1 brotos por explante, enquanto para tamanho de brotos e taxa de multiplicação, houve superioridade do tratamento 8 em relação aos demais tratamentos, porém este não diferiu estatisticamente do tratamento 2 para tamanho de brotos, cuja a média foi de 1,93 cm, e dos tratamentos 6 e 2 para taxa de multiplicação, com médias de 2,7 e 2,6 brotos por explante, respectivamente. Observou-se, no entanto, que os brotos induzidos nos tratamentos 6 e 8 apresentaram aspecto hiperhídrico, engrossamento do caule e eventual clorose e necrose de folhas do fluxo superior do caule, incluindo o ápice caulinar. Nestes tratamentos, também foi observada a formação de calos e alguma indução de brotos axilar e adventício.

TABELA 20 – Resumo das análises de variância para número de brotos (NB), tamanho de brotos (TB) e taxa de multiplicação (TM) em três tipos de explantes de *Derris urucu*¹. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio		
		NB	TB	TM
Tratamento	9	0,3550 **	0,3330 **	0,5622 **
Resíduo	110	0,0164	0,0291	0,0436
Média	-	1,5111	1,4852	1,6886
CV (%)	-	8,4810	11,4820	12,3600

¹ Dados transformados para raiz ($x + 1$).

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

O uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se principalmente pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento (Lane, 1979; Leshem *et al.*, 1988, citados por Grattapaglia e Machado, 1998).

TABELA 21 – Valores médios para número de brotos (NB), tamanho de brotos (TB, em cm) e taxa de multiplicação (TM) em três tipos de explantes de *Derris urucu*¹. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Tratamento Explante ² + [Sac (%) + BAP (mg.l ⁻¹)] ³	Variáveis		
	NB	TB	TM
1 – SN ₁ + Sac 3 + 0,0 de BAP	1,0 b	1,53 abc	1,9 bcd
2 – SN ₂ + Sac 3 + 0,0 de BAP	1,0 b	1,93 ab	2,6 ab
3 – SN ₁ + Sac 4 + 0,0 de BAP	0,9 b	0,78 de	1,3 cd
4 – SN ₂ + Sac 4 + 0,0 de BAP	1,0 b	1,26 bcde	2,1 bc
5 – SN ₁ + Sac 3 + 2,0 de BAP	1,1 b	1,00 cde	1,1 d
6 – SN ₂ + Sac 3 + 2,0 de BAP	2,6 a	1,41 abcd	2,7 ab
7 – SN ₁ + Sac 4 + 2,0 de BAP	1,2 b	0,87 de	1,4 cd
8 – SN ₂ + Sac 4 + 2,0 de BAP	2,1 a	2,11 a	3,3 a
9 – Seac. + Sac 3 + 0,0 de BAP	1,0 b	0,67 e	1,4 cd
10 – Seac + Sac 3 + 2,0 de BAP	1,1 b	0,75 e	1,2 cd

¹ Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

² SN₁, SN₂ e Seac = Segmentos nodais com uma e duas gemas axilares, e segmento com ápice caulinar, respectivamente.

³ Sac = Sacarose.

6.4 Indução de brotos adventícios em explante nodal e em explante contendo ápice caulinar de *Derris urucu*.

Os resultados das análises de variância são apresentados na Tabela 22.

Para número de brotos, verificaram-se efeitos significativos para tipo de explante, enquanto, para tamanho de brotos, observaram-se efeitos significativos para todos os fatores e para a interação. Para número de brotos, ficou constatada a superioridade do segmento nodal com duas gemas axilares sobre o explante contendo

¹ Médias seguidas por letras distintas entre colunas diferem entre si ao nível de 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste de Tukey
² MS/2 modif. = MS com 1/2 da concentração dos sais (soluções C, D, E e F), todo o KNO₃, sem NO₃NH₄.

Formulação		Tipo de explante	
		Nodal	Apical
IB-1 ('MS'/2, sem regulador de crescimento)	1,89 a	0,00 b	0,00 b
IB-2 ('MS'/2 + 2,0 BAP + 0,5 ANA + 0,5 GA ₃)	1,14 a	0,00 b	0,00 b
IB-3 ('MS'/2 + 2,0 BAP + 0,5 ANA + 1,0 GA ₃)	1,17 a	0,00 b	0,00 b
IB-4 ('MS'/2 modif. ² + 2,0 BAP + 0,5 ANA + 0,5 GA ₃)	1,02 a	0,00 b	0,00 b
IB-5 ('MS'/2 modif. ² + 2,0 BAP + 0,5 ANA + 1,0 GA ₃)	0,53 a	0,00 b	0,00 b
IB-6 ('MS'/2 modif. ² sem regulador de crescimento)	1,23 a	0,05 b	0,05 b

TABELA 23 – Médias de tamanho de brotos (cm) induzidos em explantes nodal e apical de *Derris urucu*¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	
		NB	TB
Explante (E)	1	6,4570 **	3,8206 **
Formulação (F)	5	0,0421 ^{NS}	0,0674 **
E x F	5	0,0481 ^{NS}	0,0658 **
Resíduo	60	0,0225	0,0105
Média	-	1,3110	1,2343
CV (%)	-	11,4350	8,3050

¹Dados transformados para raiz (x + 1).
^{NS} e ** = não significativo e significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 22 – Resumo das análises de variância para indução de brotos adventícios em explantes nodal e em explante contendo ápice caulinar¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

quando em meio nutritivo 'MS' sem regulador de crescimento. segmento nodal com duas gemas axilares em relação aos outros tipos de explantes, obtidos em outros experimentos desenvolvidos neste trabalho, a melhor resposta do crescimento). Pode-se notar, mais uma vez, que em concordância com resultados a melhor média foi apresentada pela formulação IB-1 ('MS'/2, sem regulador de nodal com duas gemas axilares sobre explante contendo ápice caulinar (Tabela 23), e respectivamente. Para tamanho de brotos, verificou-se a superioridade do segmento ápice caulinar, sendo detectadas médias de 1,59 e 0,0231 brotos por explante,

6.5 Indução de brotos e enraizamento em explante nodal com duas gemas axilares oriundo de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro*

Os resultados das análises de variâncias são apresentados nas Tabelas 24 e 25. Observaram-se efeitos significativos dos tratamentos usados, exceto para a variável tamanho de brotos, que não foi influenciada pela concentração de BAP utilizada.

TABELA 24 – Resumo das análises de variâncias para pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), NB e TB, em brotos de *Derris urucu* oriundos de explantes binodais tratados ou não com BAP. UFLA, Lavras - MG. 2000. Dados não transformados.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados Médios e Significância ¹			
		MFCALO	MSCALO	NB	TB
Indução (I)	1	1,4351**	0,0081**	40,0192**	0,0224 ^{NS}
Resíduo	12	0,0195	0,00003	0,3209	0,7655
Média	-	0,3206	0,0241	2,6907	3,1043
CV (%)	-	43,6600	27,3160	21,0520	28,1850

^{NS} e ** = não significativo e significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 25 – Resumo das análises de variância para pesos das matérias fresca e seca de brotos (MFBROT e MSBROT, respectivamente) e TM, em brotos de *Derris urucu* oriundos de explantes binodais tratados ou não com BAP. UFLA, Lavras - MG. 2000. Dados não transformados.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados Médios e Significância ¹		
		MFBROT	MSBROT	TM
Indução (I)	1	0,1680**	0,0009**	16,0714**
Resíduo	12	0,0098	0,00004	0,4086
Média	-	0,1549	0,0148	3,3571
CV (%)	-	63,8820	43,8830	19,0400

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

Pela Tabela 26 verifica-se, para todas as variáveis de respostas usadas, com exceção do tamanho de brotos, que o tratamento C/BAP foi superior ao

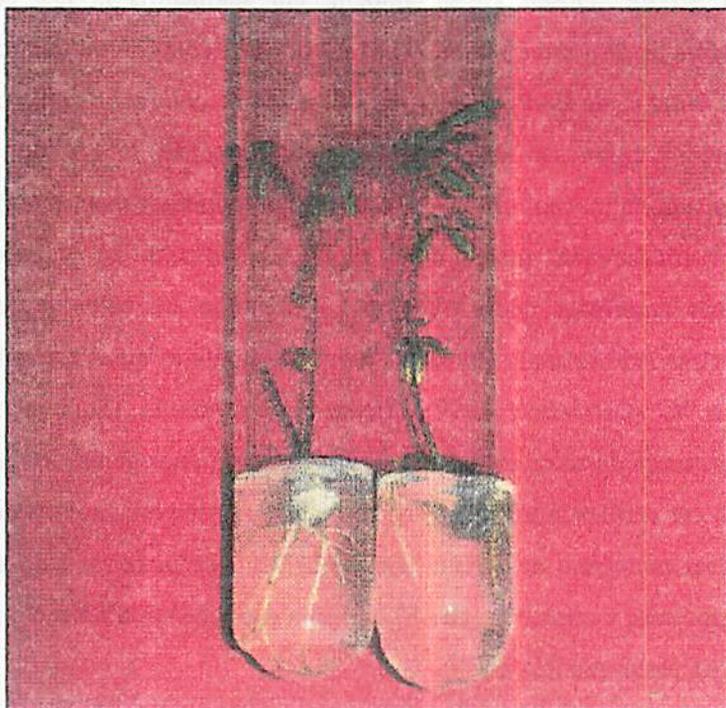
tratamento S/BAP. Observou-se, também, em segmentos nodais com duas gemas axilares de *D. urucu*, em meio nutritivo 'MS', com 3% de sacarose, 0,7% de agar e 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, a ocorrência de calos de coloração verde-clara e de tamanho médio, engrossamento do caule, hiperhidratação, folhas com sinais de vitrificação, má formação, clorose e necrose de folhas da metade superior do caule, com conseqüente morte desta região, semelhante ao já relatado em experimentos anteriores deste trabalho. A presença de calos e de plantas defeituosas tem sido relatada em outras espécies, dentre as quais citam-se *Tridax procumbens* L. (Cerqueira, 1999), *Ricinus communis* L. (Sujatha e Reddy, 1998). A presença de calos em segmentos nodais com duas gemas axilares de *D. urucu* pode ser explicada por efeito no desbalanço hormonal (auxina/citocinina) e/ou no nível endógeno de auxina dos explantes, que pode ter sido suficiente para interagir com a citocinina (BAP) exógena suplementada no meio nutritivo, resultando na formação de calos.

Na Figura 31 observam-se os efeitos de AIB e ANA no enraizamento de segmentos nodais com duas gemas axilares de *D. urucu*, oriundos de plântulas germinadas *in vitro*.

TABELA 26 – Médias dos pesos das matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente, em g), número de brotos (NB), tamanho de brotos (TB, em cm), pesos das matérias fresca e seca de brotos (MFBROT e MSBROT, respectivamente, em g) e taxa de multiplicação (TM) em segmento nodal com duas gemas axilares oriundo de plântulas de *Derris urucu* tratado ou não com BAP. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento	Variáveis de respostas ¹						
	MFCALO	MSCALO	NB	TB	MFBROT	MSBROT	TM
C/BAP	0,6403 a	0,0482 a	4,3814 a	3,1443 a	0,2644 a	0,0230 a	4,4286 a
S/BAP	0,0000 b	0,0000 b	1,0000 b	3,0643 a	0,0454 b	0,0066 b	2,2857 b

¹ Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey



AIB 2000 ppm, pH 4,5 ANA 2000 ppm, pH 5,7

FIGURA 31 - Aspecto geral do enraizamento de brotos de *Derris urucu* com AIB e ANA. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Os resultados das análises de variância dos dados referentes à porcentagem de enraizamento (%R), número de raiz (NR) e tamanho de raiz (TR) de brotos de *D. urucu* são apresentados na Tabela 27. Nestas variáveis de respostas, verificaram-se efeitos significativos diferenciados para fatores e suas interações. Pela Tabela 28, observou-se que para a porcentagem de enraizamento (%R), as médias da comparação da interação T*M*P evidenciaram a superioridade dos tratamentos S/RC (M: 4 e pH: 4,5), S/RC (M: 5 e pH: 5,7) e S/RC (M: 4 e pH: 5,7) sobre os demais tratamentos. De modo geral, a porcentagem de enraizamento (%R) dos tratamentos C/RC (M*P) não apresentou diferenças significativas e as médias foram inferiores ao tratamento S/RC (Tabela 28).

TABELA 27 – Resumo das análises de variâncias para porcentagem de enraizamento (%R), número de raiz (NR) e tamanho de raiz (TR) de brotos de *Derris urucu* oriundos de explantes binodais tratados ou não com BAP e subcultivado em vários meios de cultura, com pH ajustado em dois níveis. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância		
		%R ¹	NR ²	TR ²
T.indução (T)	1	15.309,9395**	4,5684**	4,2212**
Meio de cultura (M)	4	1.290,7867**	0,2815**	0,1161**
pH (P)	1	53,7383 ^{NS}	0,0133 ^{NS}	0,0016 ^{NS}
T x M	4	519,9318**	0,0461 ^{NS}	0,0667*
T x P	1	493,0674*	0,0826*	0,0989*
M x P	4	535,5891**	0,2046**	0,2344**
T x M x P	4	256,5598*	0,0390 ^{NS}	0,0471 ^{NS}
Resíduo	40	77,9591	0,0186	0,0224
Média	-	17,8942	1,3279	1,3455
CV (%)	-	49,3430	10,2700	11,1200

¹ Dados transformados para arc.sem da raiz (x/100).

² Dados transformados para raiz (x + 1).

^{NS}, * e ** = não significativo e significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

As Tabelas 29 e 30 apresentam as médias das interações T*P para número e tamanho de raiz, respectivamente. Observou-se, para número e tamanho de raiz, que o tratamento S/RC foi superior ao tratamento C/RC, independentemente do pH do meio de cultura.

TABELA 28 – Médias para comparar a interação M*T*P da variável de resposta porcentagem de enraizamento (%R) de brotos de *Derris urucu* oriundos de segmentos nodais com duas gemas axilares tratados ou não com BAP e subcultivados em vários meios de cultura, com pH ajustado em dois níveis¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

T.indução (T)	Meio de cultura ² (M)	pH (P)	
		4,5	5,7
'MS' S/RC	1 ('MS'/2 + Sac 2%, S/RC)	10,82bA ₁	10,82cA ₁
	2 ('MS'/2 + Sac 2% + 0,5 mg/L de ANA)	10,82bB ₁	33,30bcA ₁
	3 ('MS'/2 + Sac 2% + 0,5 mg/L de AIB)	19,44bA ₁	10,82cA ₁
	4 ('MS'/2 + Sac 2% + 1/30" em AIB a 2000 ppm)	84,10aA ₁	66,70abA ₁
	5 ('MS'/2 + Sac 2% + 1/30" em ANA a 2000 ppm)	10,82bB ₁	75,00aA ₁
'MS' C/RC	1 ('MS'/2 + Sac 2%, S/RC)	0,00aA ₂	0,00aA ₂
	2 ('MS'/2 + Sac 2% + 0,5 mg/L de ANA)	0,00aA ₂	0,00aA ₂
	3 ('MS'/2 + Sac 2% + 0,5 mg/L de AIB)	0,00aA ₂	0,00aA ₂
	4 ('MS'/2 + Sac 2% + 1/30" em AIB a 2000 ppm)	10,82aA ₂	0,00aA ₂
	5 ('MS'/2 + Sac 2% + 1/30" em ANA a 2000 ppm)	0,00aA ₂	0,00aA ₂

¹ Letras minúsculas comparam os M dentro de cada combinação T*pH. Letras maiúsculas comparam médias de pH dentro de cada combinação de T*M e, finalmente, os números comparam T dentro de cada combinação de M*pH, e quando distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de TuKey.

² 'MS'/2 = 'MS' com metade das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes; Sac = Sacarose e 1/30" = Imersão por 30 segundos de 0,5 cm da parte distal da brotação.

TABELA 29 – Médias para comparar a interação T*P da variável de resposta número de raiz de brotos de *Derris urucu* oriundos de segmentos nodais com duas gemas axilares tratados ou não com BAP e subcultivados em vários meios de cultura, com pH ajustado em dois níveis¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

T.indução (T)	pH (P)	
	4,5	5,7
S/RC	1,50aA	1,64aA
C/RC	0,22bA	0,00bB

¹ Médias seguidas por letras minúsculas na vertical (comparam T) e médias seguidas por letras maiúsculas na horizontal (comparam pH), quando distintas, diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 30 – Médias para comparar a interação T*P da variável de resposta tamanho de raiz (TR) de brotos de *Derris urucu* oriundos de segmentos nodais com duas gemas axilares tratados ou não com BAP e subcultivados em vários meios de cultura, com pH ajustado em dois níveis¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

T.indução (T)	PH (P)	
	4,5	5,7
S/RC	1,48aA	1,71aA
C/RC	0,27bA	0,07bB

¹ Médias seguidas por letras minúsculas na vertical (comparam T) e médias seguidas por letras maiúsculas na horizontal (comparam pH), quando distintas, diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

Em geral, as melhores respostas morfogênicas referentes à indução e enraizamento de brotos oriundos de segmentos nodais com duas gemas axilares de *D. urucu* foram apresentadas nos seguintes meios nutritivos: 'MS' + 3% de sacarose + 0,7% de ágar, sem regulador de crescimento para indução e 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em AIB a 2000 ppm, pH 4,5 ou 5,7 e 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% + imersão por 30 segundos em ANA a 2000 ppm, pH 5,7 para enraizamento. A indução de brotos e a formação de raízes adventícias de brotos oriundos da multiplicação são importantes para o posterior transplântio nas condições *ex vitro*. Para plantas lenhosas, esta etapa da micropropagação é geralmente difícil. A restauração da competência de enraizamento é, do ponto de vista prático da micropropagação, considerada sinônimo de rejuvenescimento. Em trabalhos com *Eucalyptus citriodora*, Grattapaglia e Machado (1998) relatam que as culturas de alguns clones isolados de ramos adultos enxertados se multiplicam bem após 4 subculturas mensais, mas o enraizamento das partes aéreas ainda foi abaixo de 5%. Após 8 subculturas, foi possível enraizar 40% das partes aéreas, e após 12, o enraizamento atingiu 70 a 80%. Esse resultado sugere que embora a capacidade de multiplicação e a competência de enraizamento sejam características correlacionadas, elas não são adquiridas necessariamente ao mesmo tempo pelas

7 CONCLUSÕES

Segmentos nodais de *Derris urucu* e de *Derris nicou* apresentaram um bom desenvolvimento de gemas axilares em meio nutritivo de 'MS' suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, sem regulador de crescimento.

Segmentos nodais com duas gemas axilares de *D. urucu* inoculados em meio nutritivo 'MS' suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, na ausência de regulador de crescimento, apresentaram um desenvolvimento superior em termos de número e tamanho de brotações e taxa de multiplicação, quando comparados aos segmentos nodais com uma gema axilar e explante contendo ápice caulinar.

Brotações oriundas de segmentos nodais com duas gemas axilares foram enraizadas em meio nutritivo de 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em AIB a 2.000 ppm, com pH ajustado para 4,5 ou 5,7 e, em 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em ANA a 2.000 ppm, com pH ajustado para 5,7. As plântulas enraizadas foram transplantadas para substrato plantmax e aclimatadas em casa-de-vegetação e apresentaram uma taxa de sobrevivência de 90%.

Derris urucu não apresentou uma proliferação de brotos em forma de roseta rosetas.

As concentrações de citocininas usadas não foram eficientes para promover a proliferação de brotos em timbós.

O timbó mostrou uma tendência de multiplicação através de segmentos nodais.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABREU, I.N. de. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagens em *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- ALLOUFA, M.A.I.; SOUZA, E.V.F. de. In vitro propagation of *Garlic sativum* L. through shoot tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Largo Drive West, v.35, n.3, p.50-A, Mar. 1999.
- BARRINGER, S.A.; MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W.E. In vitro multiplication and plantlet establishment of avocado. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Centre Park Drive, v.32, n.2, p.119-121, Apr/June 1996.
- BECKER, L. Propagação *in vivo* e *in vitro*, indução de calos, nutrição e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg. (Quebra-pedras). Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- CERQUEIRA, E.S. 1999. Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1999. 81p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- CHEN, L.J.; HU, T.W.; HUANG, L.C. A protocol toward multiplication of the medicinal tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Centre Park Drive, v.31, n.4, p.193-198, Oct. 1995.
- COELHO, M.C.F. Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.]. Lavras: UFLA, 1999. 119p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- COSTA, M.P. da. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. Lavras: UFLA, 1995. 61p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- FIDELIS, I. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* Tréc. (mamacadela) uma espécie considerada medicinal. Lavras:UFLA, 1998. 109p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)

- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology – Plant*, Columbia, v.32, p.272-289, Oct/Dec. 1996.
- GILES, K.L. Micropropagation in a growing world: the impact of micropropagation. *World Crops*, New York, v.37, n.3, p.6-10, 1985
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. p.183-260.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. e YAMADA, Y. (eds.). *Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding*. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.
- HUANG, F.H.; AL-KHAYRI, M.; GBUR, E.E. Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Centre Park Drive, v.30P, n.1, p.70-74, Jan. 1994.
- JUSAITIS, M. In vitro propagation of *Phebalium equestre* e *Phebalium hillebrandii* (Rutaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Centre Park Drive, v.31, n.3, p.140-143, July 1995.
- LAMEIRA, O.A. Propagação *in vivo* e *in vitro*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). Lavras: UFLA, 1997. 87p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia).
- MACKAY, W.A.; SANKHLA, D.; SANKHLA, N. Micropropagation of superior selections of perennial phlox. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, Largo Drive West, v.35, n.3, p.49-A, Mar. 1999.
- MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; McKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética de plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.
- METIVIER, J.R. Citocininas. In: FERRI, M.G. *Fisiologia vegetal*. São Paulo: EPU/ Ed. Da Universidade de São Paulo, v.1-2, 1979, p.93-128.

- MOREL, G. Producing virus-free cymbidiuns. **American Orchid Society Bulltin**, v.29, p.495-497,1960.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1979.
- PARRA, R.; AMO-MARCO, J.B. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L.: A comparison of adult and seedling material. In **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v. 34, n.2, p.104-107, Apr./June 1998.
- PEREIRA, F.D. Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos em chapéu de couro (*Echinodorus cf scaber* Rataj.), uma planta medicinal. Lavras: UFLA, 1999. 112p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- QURAIISHI, A.; MISHRA, S.K. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Reports**, New York, v.17, n.5, p.430-433, Mar. 1998.
- SAHOO, Y.; PATTNAIK, S.K.; CHAND, P.K. In vitro clonal propagation of na aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. ("Sweet basil") by axillary shoot proliferation. In **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v. 33, n.4, p.293-296, Oct./Dec. 1997.
- SALEH, E.O.; SHEPHERD, S.L.K. Estudos de germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Clusia nemorosa* (Guttiferae). In: **Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 3. 1997, Campinas. Resumos... Campinas:CPQBA – UNICAMP, 1997. p.67.
- SARMA, K.S.; ROGERS, S.M.D. In vitro shoot induction from seedlings explants of softtrush (*Juncus effusus*), a wetland monocot, over a range of medium pH. In **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v.35, n.3, p.50-A, Mar. 1999.
- SUJATHA, M.; REDDY, T.P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v.18, n.6/8, p.561-566, Apr. 1998.

SUL, I.; KORBAN, S.S. Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Centre Park Drive, v.30P, n.3, p.131-135, July 1994.

THORPE, T.A., HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: **DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H.** **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-36.

VASIL, I.K.; VASIL, V. Isolation and culture of protoplasts. In: **VASIL, I.K.** **Perspectives in plant cell and tissue cultures**. New York: Academic Press, 1980.

CAPÍTULO 5

NUTRIÇÃO MINERAL, CRESCIMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE ROTENÓIDES EM TIMBÓ

1 RESUMO

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. **Nutrição mineral, crescimento e quantificação de rotenóides em timbó.** Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)*.

Estudos sobre nutrição mineral de timbós são raros; assim sendo, este trabalho foi conduzido com objetivo de determinar alguns aspectos da nutrição mineral de timbós em condições de cultivo *in vivo* e *in vitro* e as suas relações com os compostos rotenóides. A omissão de K da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetou o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 20 e 40 dias de cultivo. As omissões de Ca, Mg e S da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetaram significativamente o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 40 dias de cultivo. A matéria seca da raiz foi reduzida significativamente em todos os tratamentos, com exceção do deficiente em S. No caule e na folha, as maiores reduções de matérias secas foram detectadas nos tratamentos com omissões de N, Ca e P. A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento do calos, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo 'MS'. Calos oriundos de explante radicial apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides. Os efeitos de várias formulações sobre o crescimento e a nutrição mineral de plântulas de *D. urucu*, durante 45 dias de cultivo *in vitro*, apresentaram respostas diferenciadas. A biossíntese de compostos rotenóides foi detectada no sistema radicular de plântulas de *D. urucu*, independentemente dos tratamentos usados, e os teores destes compostos variaram entre 0,017 e 0,013% aos 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente.

*Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

2 ABSTRACT

CONCEIÇÃO, H.E.O. da. Mineral nutrition, growth and quantification of rotenoids in “timbó”. Lavras: UFLA, 2000. 191p. (Thesis – Doctorate in Crop Science)*.

Studies on mineral nutrition of “timbós” are rare, so this work was conducted with the objective of determining some aspects of the mineral nutrition of “timbós” under in vivo and in vitro conditions and their relationships with the rotenoid compounds. The omission of K of Bolle-Jones nutrient solution did not significantly affect the growth of the shoot of *D. urucu* after 40 days cultivation. The root dry matter was reduced significantly in all the treatments with the exception of the one deficient in S. In the stem and leaf, the greatest reductions of dry matter were detected in the treatments with lacks of N, Ca and P. The reduction and/or absence of both forms of N resulted into marked reductions of growth of the callus, regardless or not of the reduction of the concentration of P of the ‘MS’ nutrient medium. Callus from root explant presented positive response of biosynthesis of rotenoid compounds. The effects of several formulations upon the growth and mineral nutrition of *D. urucu* seedlings for 45 days of in vitro cultivation presented distinct responses. The biosynthesis of rotenoid compounds was detected in the root system of *D. urucu* seedlings, independently of the treatments used and the contents of those compounds ranged from 0.017 and 0.013% at 30 and 45 days of in vitro cultivation, respectively.

*Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso - UFLA, Osmar Alves Lameira - EMBRAPA/AMAZÔNIA ORIENTAL.

3 INTRODUÇÃO

Em adição aos principais nutrientes de sua estrutura orgânica, carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O), as plantas contêm uma grande variedade de nutrientes. Uma considerável porção dos minerais, particularmente nitrogênio (N), enxofre (S) e cálcio (Ca), está presente como parte da estrutura orgânica. Alguns minerais estão presentes como componentes de enzimas e moléculas catalíticas. Outros minerais podem estar presentes simplesmente porque são absorvidos não seletivamente junto com a água e tendem a acumular como dissolvidos ou armazenados como substância iônica – selênio (Se), estrôncio (Sr), sódio (Na) e potássio (K), ou quando presente em excesso ou como precipitado no tecido - alumínio (Al), silício (Si) e cálcio (Ca) (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Marschner, 1995).

Segundo Marschner (1995), os nutrientes minerais têm funções essenciais e específicas no metabolismo das plantas. Desta forma, quando um dos nutrientes essenciais não está presente em quantidades satisfatórias ou em condições que o tornam pouco disponível, a deficiência desse nutriente nas células promoverá alterações no seu metabolismo. Estes distúrbios geralmente se revelam através de sintomas visíveis de clorose e necrose de folhas, crescimento reduzido ou outras anomalias. Os sintomas de carências minerais são mais ou menos características para cada nutriente, dependendo também da severidade da deficiência, da espécie, variedade ou cultivar e de fatores ambientais.

O objetivo da produção de metabólitos secundários em cultura de tecidos vegetais é atingir um estágio em que se consiga produzir os compostos secundários *in vitro* mais rápido e em maior quantidade do que a planta possa produzir durante o seu desenvolvimento. Contudo, vários fatores podem influenciar este processo, e dentre estes destaca-se a nutrição mineral.

A importância do suprimento e da absorção de nutrientes para a produção das culturas tem resultado, por muitos anos, em uma vasta experimentação e literatura pertinente à nutrição e ao crescimento da planta. Uma grande quantidade de publicações tem relacionado experimentos com plântulas em estudos de laboratórios, nas quais a suposição básica é de que sob ambiente controlado, os efeitos de diferentes nutrientes minerais sobre o crescimento da planta podem ser mais facilmente estudados do que no campo (Marschner, 1995).

Os efeitos dos nutrientes minerais no crescimento e produção são usualmente estudados em termos das suas funções no metabolismo das plantas. Além disso, a nutrição mineral pode também influenciar o crescimento e a produção das plantas cultivadas de forma secundária, causando modificações na forma de crescimento, na morfologia, na anatomia e na sua composição química (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Mengel e Kirkby, 1987)

Moore (1945) estudou os efeitos das deficiências de S, N, P, Ca, K, Fe e Mg em um clone de *Derris elliptica* em cultura de areia. Entre os resultados obtidos, destacaram-se os teores de 1,3 e 5,2% de rotenona + rotenóides em raízes secas de plantas cultivadas em solução nutritiva completa e crescidas no campo, respectivamente.

Estudos sobre nutrição mineral, crescimento e quantificação de compostos rotenóides em timbós são raros, assim sendo, este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar alguns aspectos da nutrição mineral e do crescimento de timbó em condições de cultivo *in vivo* e *in vitro* e as suas relações com a produção de compostos rotenóides.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. Aspectos gerais da nutrição mineral de plantas

4.1.1 Avaliação do estado nutricional e aspectos gerais dos macronutrientes em plantas

Avaliar o estado nutricional consiste em comparar a amostra ou o indivíduo com um padrão. Padrão, no caso, seria um indivíduo ou uma população “normal”. Planta normal é aquela que apresenta, no seu tecido, todos os macro e micronutrientes em quantidades e proporções não limitantes para o crescimento e a produção em todas as fases do seu ciclo de vida (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Mengel e Kirkby, 1987). Existem vários métodos de avaliação do estado nutricional de plantas, e dentre eles cita-se o da diagnose por subtração. Esta técnica faz a comparação do aspecto e da produção da planta submetida a um tratamento chamado ‘completo’ com outros tratamentos nos quais os nutrientes são omitidos um de cada vez. Em plantas de guar (*Cyamopsis tetragonoloba* L. (Taub.) cv. Brooks) com omissão de macronutrientes, boro e zinco, foi obtido o quadro sintomatológico das carências e avaliado o efeito da omissão sobre a produção de matéria seca das plantas; qualquer um dos nutrientes reduz o peso da matéria seca das plantas (Haag, Câmpora e Forti, 1990).

No crescimento do jaborandi através da produção de matéria seca, o quadro sintomatológico das deficiências e a determinação dos níveis analíticos dos macronutrientes nas folhas superiores, inferiores, caule e raízes foram estudados por técnica de diagnose por subtração (Viégas *et al.*, 1997). Estes autores verificaram que todos os tratamentos com omissão afetaram a produção de matéria seca da planta, quando comparados com o tratamento completo, sendo mais afetada a omissão individual de N.

As plantas superiores são capazes de absorver o N de diferentes formas: como N_2 , aminoácidos, NH_4^+ e, predominantemente nas condições naturais, como NO_3^- . Em uma planta normal, quase todo o N se encontra em formas

orgânicas, representadas principalmente por aminoácidos e proteínas. A forma do suprimento de N (NH_4^+ ; NO_3^- ; N_2 fixado) desempenha um papel chave na relação cátion-ânion em plantas. Cerca de 70% dos cátions e ânions absorvidos pelas plantas são representados por NH_4^+ ou NO_3^- (van Beusichem *et al.*, 1988 citados por Marschner, 1995). Portanto, a princípio, plantas que se alimentam com NH_4^+ são caracterizadas por uma alta taxa de absorção cátion-ânion e, em contraste, as que se alimentam com NO_3^- apresentam uma alta taxa de absorção ânion-cátion (Marschner, 1995). O denominador comum da carência ou falta de N em plantas superiores é uma clorose que começa nas folhas mais velhas, as mais novas se mantêm verdes em consequência da redistribuição. A coloração amarelada está associada com a menor produção de clorofila e com modificações na forma dos cloroplastos (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Marschner, 1995; Mengel e Kirkby, 1987).

O fósforo é um macronutriente aniônico muito menos exigido pelas culturas que o N, aparecendo na matéria seca com teores da ordem de décimos de 1%. O fósforo é absorvido predominantemente na forma de H_2PO_4^- . O fósforo absorvido na forma mineral é rapidamente incorporado com compostos orgânicos. O fósforo aparece na planta em formas inorgânicas e orgânicas: as primeiras representam uma proporção relativamente alta de P no tecido, ao contrário do que sucede com o N. As funções do P na vida da planta se classificam do seguinte modo: estruturais – fosfolípidos de membranas; armazenamento e fornecimento de energia – ATP. Devido ao papel do P na síntese de proteínas, sua falta se reflete no menor crescimento da planta. Os frutos e sementes acumulam quantidades também menores. A rápida redistribuição do P dos órgãos mais velhos para os mais novos, quando há a carência do nutriente, faz com que as folhas mais velhas sejam as primeiras a mostrar os sintomas na forma de uma coloração verde azulada, frequentemente com a tonalidade roxa da antocianina (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997).

Segundo Marschner (1995), o potássio é absorvido pelas raízes em forma iônica, K^+ , sendo o processo essencialmente ativo e servindo a solução do solo como fonte do nutriente. As exigências de K das culturas são grandes, comparáveis às de N. Entretanto, o K não possui função estrutural na vida da planta. O que o potássio faz dentro da planta pode ser assim resumido: regulador da turgidez do tecido, ativação enzimática, abertura e fechamento de estômatos, transporte de carboidratos, transpiração, resistência à geada, seca e salinidade, resistência a doenças, qualidade dos produtos e resistência ao acamamento. Os sintomas de carência de K se manifestam em primeiro lugar nas folhas mais velhas, com uma clorose seguida de necrose das pontas e margens.

O cálcio é absorvido pelas raízes como Ca^{+2} , sendo a absorção diminuída por altas concentrações de K^+ e de Mg^{+2} no meio, como também por muito NH_4^+ . A falta de cálcio afeta particularmente os pontos de crescimento da raiz: aparecem núcleos poliplóides, células binucleadas, núcleos constrictos, divisões amitóticas; cessa o desenvolvimento, há escurecimento e morte. O cálcio é indispensável para a germinação do grão de pólen e para o crescimento do tubo polínico. Cerca de 60% do Ca total das folhas estão presentes nos cloroplastos (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997; Marschner, 1995).

A literatura contém muitas referências ao 'antagonismo' entre Mg e Ca de um lado e Mg e K do outro. O aumento na concentração de um nutriente no meio implica na diminuição da absorção do outro; o efeito pode ser tão severo que o excesso de absorção de um destes pode causar deficiência ou falta do outro. O magnésio corresponde a 2,7% do peso molecular das clorofilas; representa cerca de 10% do teor total de Mg da folha; o Mg ativa mais enzimas do que qualquer outro nutriente e é cofator de quase todas as enzimas fosforilativas, formando uma ponte entre o pirofosfato do ATP ou do ADP e a molécula da enzima; além de ser carregador de P (Marschner, 1995; Mengel e Kirkby, 1987).

A forma de S predominantemente absorvida da solução do solo pelas raízes é altamente oxidada – o sulfato. As funções que o S desempenha na vida da planta podem ser classificadas em dois grandes grupos: estruturais e metabólicas. Os sintomas de carência de S aparecem em primeiro lugar nos órgãos mais novos, como as folhas mais novas. A falta de S provoca uma série muito grande de distúrbios metabólicos, como a diminuição na fotossíntese, e na atividade respiratória; queda na síntese de proteínas, com aparecimento de altas relações N solúvel/N protéico; redução no teor de gorduras; acúmulo de carboidratos solúveis, com elevação da relação C solúvel/C amido; diminuição na fixação livre e simbiótica do N₂ atmosférico (Marschner, 1995).

4.1.2 Efeitos de N e P em cultura de tecidos de plantas.

O meio nutritivo mais utilizado em cultura de tecidos é o 'MS' de Murashige e Skoog (1962), embora a concentração de nutrientes deste meio nutritivo deva ser melhor estudada devido a respostas diferentes obtidas por diversas espécies (Pierik, 1987; Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Tecidos originados de diferentes partes de uma planta podem possuir diferentes requerimentos para um desenvolvimento satisfatório (Murashige e Skoog, 1962). Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas em condições *in vivo* são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como a fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são

adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

O nitrogênio e o fósforo estão entre os seis macronutrientes (nitrogênio, fósforo, enxofre, cálcio, potássio e magnésio) requeridos em grandes quantidades, comparativamente, e por isso são chamados de macronutrientes. De acordo com recomendações da Associação Internacional de Fisiologia de Plantas, os elementos requeridos pelas plantas em concentrações maiores que $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ são referidos como macronutrientes, e aqueles requeridos em concentrações menores que $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ são micronutrientes (De Fossard, 1976).

Os macronutrientes são incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos, sendo que o nitrogênio e o enxofre podem ser adicionados, também, como componentes de suplementos orgânicos (aminoácidos, por exemplo) (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). É usual suprir o nitrogênio na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- , embora algumas plantas possam se desenvolver em soluções contendo N somente na forma de nitrato (George e Sherrigton, 1984). Os meios nutritivos de Gautheret (1942) e White (1943) possuem unicamente nitrato.

Para George e Sherrigton (1984), embora algumas plantas respondam satisfatoriamente à adição de apenas nitrato ao meio nutritivo e a maioria delas necessite de nitrogênio nítrico e amoniacal, sendo necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ para o ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*, o total de N requerido é de 168 a 840 mg.l^{-1} , e a quantidade de NH_4^+ varia de 108 a 360 mg.l^{-1} e NO_3^- de 372 a 2.480 mg.l^{-1} .

O efeito das diferentes formas inorgânicas do nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de tecidos de plantas é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, como cenoura, fumo, *Populos*, roseira e várias outras espécies (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). No entanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio.

A utilização do nitrato pelas células depende da atividade da enzima redutase do nitrato, que reduz o nitrato a nitrito, composto que em seguida se reduz em amônio através da atividade da redutase de nitrito (Ojima e Ohira, 1978). Segundo esses mesmos autores, altas concentrações de sacarose e de nitrato e a presença de amônio aumentam a atividade da redutase de nitrato e, conseqüentemente, o crescimento de células *in vitro*. Entretanto, quando o nitrato é a única fonte de nitrogênio, o nitrito pode ser acumulado no meio nutritivo e tornar-se tóxico, devido à baixa atividade da enzima redutase de nitrito.

Grewal, Ahuja e Atal (1980) verificaram que em *Eucalyptus citriodora*, ao serem reduzidas pela metade as concentrações de nitratos de amônio de potássio do meio 'MS', a taxa de multiplicação dobrou. Por outro lado, a redução na concentração de nitrogênio amoniacal tem sido utilizada como uma medida para combater a vitrificação das culturas, um dos principais problemas que ocorre na fase de multiplicação (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998).

A redução parcial ou total dos níveis de NH_4NO_3 do meio 'MS' reduziu o número de plantas vitrificadas de crisântemo (Ziv, Schwartz e Fleminger, 1987). Em *Heliconia* sp, o fornecimento de N total do meio 'MS' foi necessário na fase de multiplicação para estimular a produção de brotos (Nannetti, 1994). Entretanto, o crescimento de brotos não foi afetado pela redução de NH_4NO_3 do meio de cultura.

Caldas e Caldas (1976) recomendam a utilização de amônio de no máximo um terço do nitrogênio total; caso contrário, as células *in vitro* podem apresentar sintomas de toxidez, reduzindo o crescimento das plantas. De acordo com esses autores, a mesma concentração de amônio, que é inibitória quando a concentração de nitrato é baixa, permite um bom crescimento quando se aumenta a concentração de nitrato.

A adição de concentrações adequadas de íons de amônio e nitrato tem sido mais empregada para o controle do pH do meio do que pela exigência do vegetal por uma ou outra forma de nitrogênio. A absorção de nitrato requer um

pH ácido, mas torna o meio mais básico, enquanto a absorção de amônio torna o meio mais ácido pela excreção de H^+ com o abaixamento do pH, e a absorção de amônio é inibida. Portanto, nos meios que não são tamponados, a absorção eficiente de nitrogênio pode depender da presença de ambos os íons (George e Sherrigton, 1984). O íon NH_4^+ também é necessário para a formação da parede celular (Meyer e Abel, 1975), divisão de protoplastos e abaixamento do requerimento dos tecidos por citocinina (Poirier-Hamon, Rao e Harada, 1974).

O fósforo é absorvido pelas plantas na forma de íon $H_2PO_4^-$, e é nesta forma que é acrescentado aos meios de cultura de tecidos (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). No meio 'MS', o fosfato de potássio monobásico é usado na concentração de 1,25 mM. Este nível é considerado baixo para algumas culturas, sendo recomendada a suplementação com um nível igual de fosfato de sódio monobásico (Murashige, 1974).

Santiago e colaboradores (1999) estudaram os efeitos de variações e combinações de doses de $N(NH_4NO_3)$ (0; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{2}$; 1 e 2) e de $P(KH_2PO_4)$ ($\frac{1}{2}$; 1 e 2) do meio de cultura de 'MS' sobre o crescimento de plântulas de pimenta longa em condições de cultivo *in vitro*. Após 75 dias de cultivo, eles observaram que a redução do nitrogênio amoniacal do meio 'MS' não afetou expressivamente o peso da matéria fresca e seca da pimenta longa, quando associado à dosagem normal e duplicada de fósforo. A suspensão do nitrogênio amoniacal do meio 'MS', mantendo-se apenas o nitrato (KNO_3), proporcionou um maior crescimento em biomassa fresca e seca de plântulas de pimenta longa *in vitro*. O aumento da relação NO_3^-/NH_4^+ proporcionou um aumento considerável na produção de matéria seca total.

Cameiro (1997) estudou, em condições de cultivo *in vitro*, a influência de doses de nitrogênio e de fósforo no crescimento de explantes primários da bananeira Maçã. Verificou que a supressão do nitrogênio amoniacal do meio 'MS', mantendo-se apenas o nitrato, não foi suficiente para proporcionar um

maior crescimento em termos de peso da matéria fresca de brotos de bananeira Maçã. Também a redução do nitrogênio amoniacal do meio nutritivo 'MS' não afetou grandemente o peso da matéria fresca de brotos após 28 dias de cultivo, em dosagem normal e duplicada de fósforo.

Hasegawa, Yabe e Morita (1995) relatam que o crescimento de plântulas de "Japanese" "butterbur" (*Petasites japonicus*) *in vitro* não foi reduzido pela redução do conteúdo de P do meio nutritivo, mas ele foi atrasado em meio com omissão de K ou contendo 0,5 mg.l⁻¹ de ABA. O crescimento foi também reduzido em meio contendo 100 mg.l⁻¹ de daminozide, mas este tratamento também resultou em clorose foliar. A ausência de N no meio e a presença de 0,5 mg.l⁻¹ de ABA foram mais efetivas na redução de crescimento de plântulas do que como tratamentos isolados.

4.2 Cultura de tecidos e metabólitos secundários

Tailang, Kharya e Dixit (1997) relatam que calos de células de *Glycyrrhiza glabra* L. crescidos em meio modificado de 'MS' foram expostos a várias concentrações de etil metano sulfonato (EMS). EMS na concentração de 0,2 a 0,3% favoreceu a produção do ácido glicerrético, embora suprimindo o crescimento de células.

Li *et al.* (1995) relatam que a indução de calos foi induzida de tecidos excisados do caule, gema axilar, folha, cotilédone e eixo da plúmula de *Barberis pruniosa* em meio nutritivo de 'B5' ou 'MS'. O meio nutritivo 'B5' deu melhor resultado que 'MS'. A combinação de 0,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D e 0,2 mg.l⁻¹ de Kin foi mais efetiva para a indução de calos, embora 0,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg.l⁻¹ de Kin tenham sido melhores para crescimento de calos e síntese de alcalóide. As análises fitoquímicas de extratos alcoólicos de calos, caule e folhas indicaram que os calos têm capacidade para sintetizar berberine. O teor de berberine de calos foi 1,81% ,

levemente mais alto do que no caule de plantas intactas (1,58%). A taxa de crescimento de calos e o conteúdo de berberine foi mais alto após 27 dias de cultura.

Furmanowa e colaboradores (1997) relatam os efeitos de condições de cultura e componentes do meio sobre a taxa de crescimento de calos e a produção de 'taxanes' em calos de *Taxus media* cv. Hatfieldii. Para indução e manutenção de calos, um meio nutritivo 'B5' e um meio nutritivo de White-Rangaswamy ('WR') com diferentes modificações foram usados. Em meio 'WR' contendo 10 μM de picloram, o fator crescimento de calos aumentou para 5,8 vezes na base de peso de matéria fresca. O picloram aumentou somente o crescimento do calo, mas não a produção de 'taxane'. Em meio 'WR' com 100 μM de ácido metil jasmônico, o conteúdo de paclitaxel aumentou de 2,37 para 90 $\mu\text{g.g}^{-1}$ e o conteúdo de cephalomannine aumentou de 5,14 para 29,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em termos de peso de matéria seca, enquanto o crescimento das culturas cessou.

Silva e Goleniowski (1994) relatam que a adição de inibidores do metabolismo primário de terpenos (KCN, cloramfenicol, ciclohexamida e ácido ferúlico), em cultura de calos de *Ambrosia tenuifolia*, inibiu completamente a produção de lactona sesquiterpeno. Fontes de nitrogênio (adenina, asparagina, arginina e leucina) promoveram a biossíntese de lactona sesquiterpeno. A adição de possíveis precursores de lactona sesquiterpeno (coronopilin ou ácido peruvínico) aumentou o conteúdo de lactona sesquiterpeno dos calos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Avaliação das exigências nutricionais do timbó.

Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Departamento de Agricultura da

Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais, no período de março de 1998 a novembro de 1999.

5.1.1 Efeitos da omissão de macronutrientes no crescimento e desenvolvimento de *Derris urucu*.

5.1.1.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.

O semeio foi realizado em 16/03/98, em caixa plástica de 40 x 30 x 10 cm contendo vermiculita como substrato. Após 45 dias da semeadura, as plântulas oriundas de exemplares do clone 37 de *D. urucu* do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL foram transferidas para outra caixa plástica, contendo 7,5 L de solução nutritiva de Bolle-Jones (1954) (Quadro 3), na qual permaneceram por 45 dias, numa seqüência de concentrações de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $1/1$ a cada 15 dias. A solução nutritiva foi trocada semanalmente e seu pH ajustado para $5,5 \pm 0,1$ usando-se NaOH a 0,5 N. Durante o condicionamento das plântulas em caixas plásticas e o desenvolvimento propriamente dito do experimento em vasos plásticos, o arejamento da solução nutritiva foi fornecido por bombas de aquário, marca Brasil, modelo Tropical II, especialmente adaptadas para este trabalho. Em seguida, as plantas em número de 2 foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 3 L de solução nutritiva de cada tratamento (Quadro 3). Os níveis das soluções nutritivas eram verificadas diariamente, e quando havia necessidade, completava-se o volume para 3 L pela adição de água destilada. O experimento teve a duração de 40 dias, sendo feitas avaliações aos 20 e 40 dias após o início da imposição dos tratamentos, utilizando as seguintes variáveis de resposta: comprimento do caule (CC) em cm, número de folhas (NF), descrição de sintomas de deficiências (SD) (a evolução dos sintomas de deficiências minerais dos macronutrientes foi caracterizada desde o estágio inicial até tomarem-se bem definitivos) e matéria

seca da raiz, caule e folha (MSR, MSC e MSF, respectivamente), sendo esta última realizada apenas ao final da coleta de dados.

5.1.1.2 Delineamento experimental e análise estatística.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 7 tratamentos (C = completo e -N, -P, -K, -Ca, -Mg e -S) e 4 repetições, cada uma constituída por 1 vaso contendo 2 plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para as variáveis de respostas em questão. Quando significativas, as médias foram comparadas através do teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

QUADRO 3 – Composição química das soluções nutritivas estoques, em molar (M) e dos tratamentos, em mL.l⁻¹, utilizadas no experimento (Bolle-Jones, 1954). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Solução Estoque	Concentração (M)	Tratamentos (mL.l ⁻¹)						
		Completa	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S
NaH ₂ PO ₄	M	1	1	-	1	1	1	1
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	M	2	-	2	2	-	2	2
KNO ₃	M	1	-	1	-	1	3	1
K ₂ SO ₄	M	2	2	2	-	2	3	1
MgSO ₄	0,5M	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	M	1,5	-	1,5	2	2,5	2	-
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,01M	-	200	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	M	-	1	-	-	-	1	1
Mg(NO ₃) ₂	0,5M	-	-	-	-	-	-	2,5
NaNO ₃	M	-	-	1	-	-	-	-
Sol.A*	-	1	1	1	1	1	1	1
Sol.Fe-EDTA**	-	1	1	1	1	1	1	1

Fonte: Bolle-Jones (1954)

* Composição química da solução A: 412 mg de H₃BO₃; 1750 mg de MnSO₄; 250 mg de CuSO₄.5H₂O; 43,1 mg MoO₃; 287 mg de ZnSO₄.7H₂O, por litro de solução.

** Composição química da solução de Fe-EDTA: 26,1 g de Na₂-EDTA; 89,2 mL de NaOH N e 24 g de FeSO₄.7H₂O, por litro de solução.

5.2 Efeitos de variações das concentrações dos sais de N e de P do meio 'MS' durante a fase de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de plântulas de *Derris urucu* germinadas *in vitro*.

5.2.1. Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.

Os calos foram induzidos usando os dois melhores tratamentos de indução de calos obtidos na etapa de cultura de calos deste trabalho: L₄ - explante foliar de 1 cm² inoculado em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D e R₄ - explante radicial de 1 cm de comprimento inoculado em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS', sacarose 3%, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem e mantidos em sala de crescimento a 26,0±1,0 °C, umidade relativa do ar 70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 28 dias. Após este período, procedeu-se a etapa de manutenção dos calos, na qual três fragmentos de calos, com cerca de 1 cm de diâmetro, oriundos dos tratamentos de indução, foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL, contendo 30 mL do meio nutritivo 'MS', com 10 variações na composição dos sais de N e P (Quadro 4), suplementados com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, sacarose 3%, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem e mantidos em sala de crescimento a 26,0±1,0 °C, umidade relativa do ar 70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 28 dias, e em seguida subcultivados por mais 28 dias.

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) e teor de compostos rotenóides (% Rot) aos 28 e 56 dias. A quantificação de compostos rotenóides foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), usando extratos metanólicos oriundos de

amostras duplicadas de 10 mg de calos secos e triturados por amostra por tratamento. Durante a extração, adicionaram-se 10 mL de metanol a aproximadamente 10 mg da amostra contida em frasco com tampa. Em seguida, procedeu-se a agitação em banho de ultrason durante 5 minutos e a filtração a vácuo. A quantificação foi realizada em um cromatógrafo Marca SHIMADZU, Modelo LC – 9A, equipado com coluna PEGASIL ODS. Durante a operação, a fase móvel usou metanol/água (70/30), vazão de 1 mL.min⁻¹, injeção de 20 µL da amostra e detecção após 20 minutos, em detector SHIMADZU, Modelo SPD – 6AV U.V. – VIS SPECTROPHOTOMETRIC a 280 nm.

5.2.2 Delineamento experimental e análise estatística.

Os explantes (calos) oriundos de cada tratamento de indução foram considerados, na etapa de manutenção de calos, como um experimento isolado. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 2 (10 variações de N e P e 2 subculturas), com 3 repetições, cada uma constituída por 1 frasco de 250 mL contendo 30 mL do meio nutritivo 'MS', com as devidas variações dos sais de N e P e 3 fragmentos de calos. Os dados obtidos na etapa de manutenção de calos foram submetidos à análise de variância para as variáveis de respostas em questão, e de acordo com os resultados das análises, os dados foram novamente processados e as médias comparadas através do teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

QUADRO 4 – Tratamentos usados na fase de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de *Derris urucu*, com ênfase nas variações das concentrações dos sais de N e de P do meio nutritivo ‘MS’, suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA e 2,0 mg.l⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento	N e P (concentração relativa do meio nutritivo de ‘MS’)		
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃ ⁻	P-KH ₂ PO ₄
1	½	0	½
2	0	½	½
3	½	½	½
4	1	1	½
5	2	2	½
6	½	0	1
7	0	½	1
8	½	½	1
9	1	1	1
10	2	2	1

5.3 Crescimento e nutrição mineral de plântulas de *Derris urucu*.

5.3.1 Material vegetal, tratamentos e condições de cultivo.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, no período de setembro a novembro de 1999. Foram usadas plântulas de *D. urucu* oriundas de sementes de exemplares do clone 37 do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, com 15 dias de idade, oriundas de germinação *in vitro*. As sementes foram germinadas em meio nutritivo ‘MS’ contendo a metade da concentração dos sais, 3% de sacarose, sem regulador de crescimento, pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem e mantidas em sala de crescimento a 26,0±1,0°C, umidade relativa do ar de 70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 µmol.m⁻².s⁻¹, durante 15 dias. Após este período, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio de 200 x

25 cm, contendo 15 mL de cada meio nutritivo dos tratamentos de nutrição mineral (Quadro 5). Os meios nutritivos continham 3% de sacarose e 0,55% de agar, pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem e as plântulas foram mantidas em condições semelhantes a anterior, durante 45 dias.

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de respostas: altura da planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR), número de folhas (NF), pesos das matérias fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, respectivamente (MFPA, MFSR, MSPA e MSSR), e porcentagem de compostos rotenóides no sistema radicular (% ROT), determinados por CLAE após 30 e 45 dias da inoculação das plântulas nos meios nutritivos de nutrição mineral.

5.3.2 Delineamento experimental e análise estatística.

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8×2 (8 formulações de meios nutritivos e 2 épocas de coleta de material vegetal), com 3 repetições, cada uma contendo 4 tubos de ensaio com 15 mL dos meios nutritivos de nutrição mineral. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para as variáveis de respostas em questão, e de acordo com os resultados das análises, os dados foram novamente processados e as médias comparadas através do teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

QUADRO 5 – Tratamentos usados no experimento de crescimento e nutrição mineral de plântulas de *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento	Composição dos tratamentos ¹
T1	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ / 2 + 0,0 mg.l ⁻¹ de N-NH ₄ + P-KH ₂ PO ₄ / 2.
T2	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l ⁻¹ de N-NO ₃ + N-NH ₄ / 2 + P-KH ₂ PO ₄ / 2.
T3	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ / 2 + N-NH ₄ / 2 + P-KH ₂ PO ₄ / 2.
T4	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ + N-NH ₄ + P-KH ₂ PO ₄ / 2.
T1A	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ / 2 + 0,0 mg.l ⁻¹ de N-NH ₄ + P-KH ₂ PO ₄ .
T2A	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l ⁻¹ de N-NO ₃ + N-NH ₄ / 2 + P-KH ₂ PO ₄ .
T3A	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ / 2 + N-NH ₄ / 2 + P-KH ₂ PO ₄ .
T4A	'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO ₃ + N-NH ₄ + P-KH ₂ PO ₄ .

¹ Soluções D, E e F já definidas no item 5.3 do Capítulo 4.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Efeitos da omissão de macronutrientes no crescimento e desenvolvimento de *Derris urucu* *in vivo*.

Os resultados das análises de variância são apresentados nas Tabelas 31 e 32. Para comprimento do caule (CC) e número de folhas (NF), verificaram-se efeitos significativos diferenciados para fatores e suas interações nestas variáveis de respostas, indicando que as deficiências dos macronutrientes, as épocas de avaliação e sua interação tiveram influência determinante nestas variáveis de respostas (Tabela 31), enquanto a produção de matérias secas nos diferentes

órgãos de plantas de *D. urucu* também mostrou efeitos significativos (Tabela 32).

TABELA 31 – Resumo das análises de variâncias para comprimento do caule (CC) e número de folhas (NF) de plantas de timbó cultivadas em solução nutritiva de Bolle-Jones (1954) completa e com omissão de macronutrientes, durante 40 dias após a administração dos tratamentos. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio	
		CC	NF
Nutrientes (N)	6	186,5299 **	12,4761 **
Avaliação (A)	1	170,1028 **	46,4464 **
N*A	6	42,2274 **	5,9880 **
Resíduo	42	10,1073	1,0416
Média	-	17,5428	8,0178
CV (%)	-	18,1230	12,7290

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 32 – Resumo das análises de variâncias para pesos das matérias secas da raiz, caule, folha e total (MSR, MSC, MSF e MST, respectivamente, em g/planta) de plantas de timbó cultivadas em solução nutritiva de Bolle-Jones (1954) completa e com omissão de macronutrientes, durante 40 dias após a administração dos tratamentos. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância			
		MSR	MSC	MSF	MST
Tratamento	6	5,2092**	1,4655**	12,0605**	45,5455**
Resíduo	21	0,0866	0,1195	0,2222	0,6383
Média	-	1,8210	1,2112	3,0379	6,0702
CV (%)	-	16,165	28,540	15,518	13,162

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

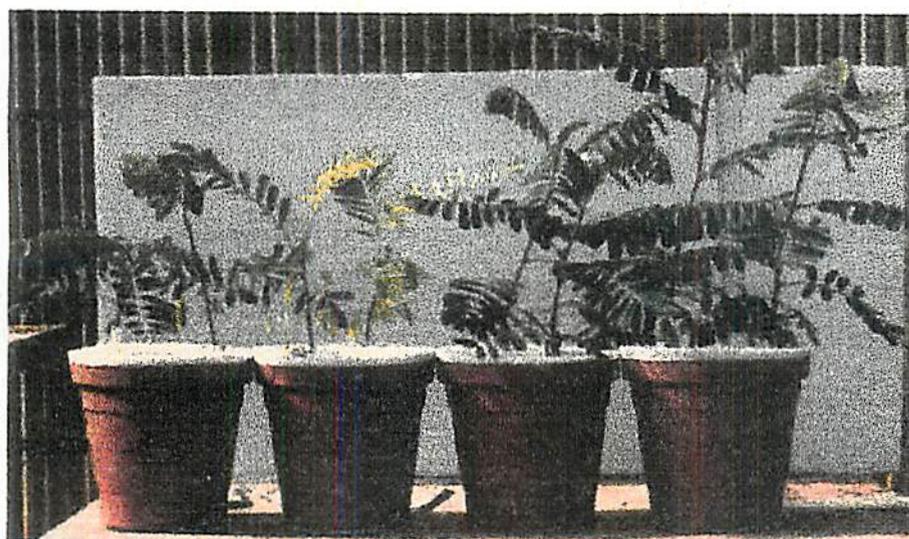
Pela Tabela 33, observa-se que os valores das médias do comprimento do caule aos 20 e 40 dias de cultivo indicaram que houve uma redução de crescimento da parte aérea das plantas deficientes em N, P, Ca, Mg e S. Plantas

deficientes em K não foram afetadas significativamente. Quanto ao número de folhas, aos 20 dias detectou-se que plantas deficientes em K não foram afetadas, ocorrendo o mesmo aos 40 dias para as plantas deficientes em Ca, Mg e S. Entre os 20 e 40 dias de cultivo, observou-se uma redução no número de folhas nos tratamentos deficientes em N, P e K, devido à senescência precoce de folhas induzidas por estes tratamentos.

Estes resultados são em parte corroborados por Moore (1945) para o comprimento da brotação de um clone de *Derris elliptica*, segundo o qual os efeitos mais severos nessa variável de resposta foram detectados nos tratamentos com omissões de N, P e Ca. As deficiências de N, P, K e Mg reduziram o crescimento vegetativo de estévia, segundo Utumi *et al.* (1999). As deficiências de macronutrientes afetaram o crescimento e o desenvolvimento de *D. urucu* (Tabelas 33 e 34) e seus sintomas visuais foram os comentados observados na maioria das plantas (Figuras 33, 34 e 35 e Quadro 6), conforme salientam Malavolta, Vitti e Oliveira. (1997).



FIGURA 33 – Aspecto geral das plantas de *Derris urucu* com deficiências de macronutrientes. UFLA, Lavras - MG, 2000.



-Ca -N -S Completo

FIGURA 34 – Aspecto geral das plantas de *Derris urucu* com deficiências de macronutrientes (-Ca, -N e -S, em comparação com o tratamento completo). UFLA, Lavras - MG, 2000.



-K -Mg -P Completo

FIGURA 35 – Aspecto geral das plantas de *Derris urucu* com deficiências de macronutrientes (-K, -Mg e -P, em comparação com o tratamento completo). UFLA, Lavras - MG, 2000.

O crescimento de plantas sob deficiência de macronutrientes induzida pela omissão dos nutrientes em solução nutritiva tem sido avaliado para diversas espécies. Em geral, a deficiência de macronutrientes influencia diferentemente o crescimento da planta, conforme citam Frazão (1985) para *Cordia goeldiana* Huber; Haag, Câmpora e Forti (1990) para *Cyamopsis tetragonoloba* L. (Taub.) cv. Brooks; Moore (1945) para *Derris elliptica* e Viégas *et al.* (1998) para *Quassia amara*.

A Tabela 34 apresenta os valores das médias de MSR, MSC, MSF e MST. Pode-se observar, para estas variáveis, que apenas o tratamento com omissão de S não sofreu influência quando comparado com o tratamento completo. Na raiz, os tratamentos com omissões de Ca, N, P, Mg e K tiveram as suas produções de matérias secas reduzidas quando comparados com o tratamento completo. Por outro lado, na folha e no caule, as maiores reduções de crescimento, em termos de matérias secas, foram detectadas nos tratamentos

com omissões de N, Ca e P. Em geral, as deficiências de macronutrientes em *D. urucu* na redução da produção de matéria seca obedeceu à seguinte ordem decrescente Ca, N, P, K e Mg. O decréscimo da produção de matéria seca sob deficiência de nutrientes minerais tem sido relatado para diversas espécies (Moore, 1945; Viégas *et al.*, 1998; Utumi *et al.* 1999). As reduções de crescimento apresentadas pelas plantas sob deficiência de nutrientes estão relacionado às alterações que estes nutrientes provocam no metabolismo geral das plantas. De acordo com Marschner (1995), as alterações de crescimento dependem da espécie, estágio de desenvolvimento e o órgão da planta, desta forma, o conteúdo de N requerido para o ótimo crescimento varia de 2 a 5% do peso da matéria seca da planta. Quando o suprimento é sub-ótimo, o crescimento é retardado; o N que está mobilizado nas folhas adultas é translocado para as mais novas. Ocorrem os sintomas típicos de deficiências de N, tais como o aumento na senescência de folhas mais velhas.

TABELA 33 – Valores médios para comprimento do caule, em cm (CC) e número de folhas (NF) de plantas de timbó cultivadas em solução nutritiva de Bolle-Jones (1954) completa e com omissão de macronutrientes, durante 20 e 40 dias após a administração dos tratamentos¹. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Solução nutritiva	Épocas de Avaliação (dias)			
	20		40	
	CC	NF	CC	NF
Completa	18,8750 ab	10,00 ab	30,0000 a	8,50 ab
-N	11,7000 c	7,75 c	11,7500 d	4,00 d
-P	17,0000 abc	8,75 abc	17,5000cd	5,00 cd
-K	20,6000 a	10,25 a	25,1250 ab	7,00 bc
-Mg	14,4249 abc	8,50 abc	22,6250 bc	8,00 ab
-Ca	15,4250 d	9,25 abc	15,4250 cd	9,25 a
-S	12,5750 d	8,00 bc	12,5750 d	8,00 ab

¹ Letras distintas na vertical indicam diferenças significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 34 – Valores médios para pesos das matérias secas da raiz, caule, folha e total (MSR, MSC, MSF e MST, respectivamente, em g/planta) de plantas de timbó cultivadas em solução nutritiva de Bolle-Jones (1954) completa e com omissão de macronutrientes, durante 40 dias após a administração dos tratamentos¹. UFLA, Lavras - MG. 2000.

Solução nutritiva	Variáveis de Resposta			
	MSR	MSC	MSF	MST
Completa	3,3017 a	2,1568 a	5,2730 a	10,7315 a
-N	1,3307 b	0,5212 d	0,9768 d	2,8288 de
-P	1,4230 b	0,8178.cd	2,0024 d	4,2432 cd
-K	1,4873 b	1,2122 bcd	3,0890 c	5,7884 bc
-Mg	1,4519 b	1,3611 bc	3,9328 bc	6,7458 b
-Ca	0,3000 c	0,6345cd	1,1294 d	2,0639 e
-S	3,4524 a	1,775 lab	4,8626 ab	10,0901 a

¹ Letras distintas na vertical indicam diferenças significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

De acordo com Viégas *et al.* (1998), o nitrogênio foi um dos elementos que mais limitou o crescimento de plantas de quina (*Quassi amara*), resultados também constatados em outras espécies de plantas da Amazônia, como o cubiu (Weber *et al.*, 1981), o feijó (Frazão, 1985), o urucu (Haag, Dechen e Rosolen, 1988), a juta (Viégas *et al.*, 1992) e a malva (Fabasi, 1996). A omissão de cálcio também teve efeito na limitação de crescimento de plantas de quina (Viégas *et al.*, 1998); resultados semelhantes também foram relatados por Fabasi (1996) com malva e Matos (1998) com mogno.

QUADRO 6 – Descrição sistematizada dos sintomas de deficiências de macronutrientes em plantas de *Derris urucu* aos 20 e 40 dias após a indução dos tratamentos. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Solução nutritiva	Sintomas das deficiências	
	20 Dias	40 Dias
Completa	Sem sintoma visual de deficiência de macronutrientes	Sem sintoma visual de deficiência de macronutrientes
-N	Clorose das folhas dos Terços médio e inferior da planta.	Clorose generalizada, folhas do terço inferior da planta em estado de senescência; abscisão de folhas senescentes e encurtamento dos internódios.
-P	Clorose incipiente e necrose marginal em folhas do terço médio da planta.	Clorose generalizada e necrose marginal das folhas mais velhas.
-K	Clorose em folhas dos terços médio e inferior da planta.	Clorose generalizada em folhas mais velhas da planta.
-Mg	Clorose e necrose apical em folhas do terço inferior da planta.	Clorose e necrose apical em folhas do terço inferior e pontuações necróticas das folhas dos terços superior e médio da planta.
-Ca	Clorose e necrose apical em folhas dos terços superior e médio da planta.	Clorose generalizada e necrose apical em folhas dos terços superior e médio da planta; murchamento das folhas e textura endurecida dos folíolos; perda de dominância apical.
-S	Clorose incipiente em folhas dos terços superior e médio da planta	Clorose incipiente em folhas dos terços superior e médio da planta.

6.2 Efeitos de variações das concentrações dos sais de N e de P do meio nutritivo 'MS' durante a fase de manutenção de calos, oriundos de explantes foliar e radicial de plântulas de *Derris urucu* germinadas in vitro.

Os resultados das análises de variâncias dos dados são apresentados nas Tabelas 35 e 36. Verificaram-se efeitos significativos diferenciados para fatores

e suas interações nestas variáveis de respostas, indicando que os meios de cultura (MC), as épocas de avaliação (EA) e sua interação tiveram influências determinantes nestas variáveis de respostas.

TABELA 35 – Resumo das análises de variâncias para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D em explante foliar de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em 10 diferentes meios de manutenção formulados com variações nas concentrações dos sais de N e P do meio básico de ‘MS’, suplementados com ANA e BAP (2,0 + 2,0 mg.l⁻¹). UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância	
		MFCALO	MSCALO
Meio de cultura (M)	9	76,9323**	0,0633**
Épocas de avaliação (EA)	1	437,7879**	0,7964**
M x EA	9	29,9110**	0,0332**
Resíduo	40	1,2478	0,0023
Média	-	6,7941	0,3100
CV (%)	-	16,4410	15,4750

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 36 – Resumo das análises de variâncias para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP em explante radicial de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em 10 diferentes meios de manutenção formulados com variações nas concentrações dos sais de N e P do meio básico de ‘MS’, suplementados com ANA e BAP (2,0 + 2,0 mg.l⁻¹). UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância	
		MFCALO	MSCALO
Meio de cultura (M)	9	47,0403**	0,0803**
Épocas de avaliação (EA)	1	222,7211**	0,4784**
M x EA	9	18,6858**	0,0319**
Resíduo	40	0,7277	0,0014
Média	-	3,4731	0,1840
CV (%)	-	24,5620	20,5410

** = significativo a 0,01 de probabilidade pelo teste F.

Pela Tabela 37, observam-se os valores das médias dos pesos da matéria fresca de calos de *D. urucu* oriundos de explante foliar, aos 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, em dez meios nutritivos de manutenção, após terem sido induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D. Pode-se notar que aos 28 dias de cultivo nos meios de manutenção, o melhor resultado desta variável de resposta foi obtido pelo tratamento 9, porém este não diferiu estatisticamente dos tratamentos 4, 5 e 8, enquanto aos 56 dias, os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 4, 5, 9 e 10 (Figura 36). Para os valores das médias da matéria seca de calos aos 28 dias de cultivo *in vitro*, nos meios de manutenção, não se verificaram efeitos significativos, enquanto aos 56 dias, os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 9 e 10, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 4, 5, 6 e 8. De modo geral, independentemente dos tratamentos, houve um aumento no crescimento de calos nos meio de manutenção, avaliados em termos de matérias fresca e seca de calos, durante 28 e 56 dias de cultivo. O crescimento de calos, em termos de matéria fresca de calos oriundos de explante foliar, foi reduzido pelas reduções nas concentrações e formas de N e da concentração de P dos sais do meio nutritivo 'MS'. Na presença da ½ de N-NH₄⁺ ou ½ de N-NO₃⁻ ou ½ de N-NH₄⁺ + ½ de N-NO₃⁻, em combinação com a metade ou toda a fonte de P dos sais do meio nutritivo 'MS', ocorreu uma redução significativa de crescimento de calos medidos em termos de matéria fresca de calos. O dobro da concentração dos sais de N do meio nutritivo 'MS', independentemente da concentração de P usada, não afetou o crescimento. Ficou comprovado que a redução da concentração dos sais de 'MS' afetou o crescimento de calos de *D. urucu*.

TABELA 37 – Médias para comparar a interação M*EA para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D em explante foliar de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em 10 diferentes meios de manutenção formulados com variações nas concentrações dos sais de N e P do meio básico de 'MS', suplementados com ANA e BAP (2,0 + 2,0 mg.l⁻¹)¹. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento ² (N-NH ₄ ⁺ +N-NO ₃ ⁻ +P-KH ₂ PO ₄)	Variáveis de respostas			
	MFCALO (g)		MSCALO (g)	
	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias
1 (1/2+0+1/2)	2,9359bc	3,5921cd	0,1751a	0,2634c
2 (0+1/2+1/2)	2,6000bc	1,4526d	0,1638a	0,1243d
3 (1/2+1/2+1/2)	3,3352abc	9,5986b	0,1730a	0,4511b
4 (1+1+1/2)	4,9093ab	14,7608a	0,1843a	0,5254ab
5 (2+2+1/2)	5,5690ab	15,8646a	0,2300a	0,5820ab
6 (1/2+0+1)	3,8952abc	6,3663c	0,2021a	0,4699ab
7 (0+1/2+1)	1,5548c	1,9135d	0,1359a	0,1689cd
8 (1/2+1/2+1)	5,1887ab	11,3367b	0,2273a	0,4858ab
9 (1+1+1)	6,3916a	15,5399a	0,2523a	0,5964a
10 (2+2+1)	4,5496abc	14,5282a	0,2043a	0,5853a

¹ Letras distintas na vertical indicam diferenças estatísticas significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Referentes às concentrações dos sais de N e P do meio nutritivo 'MS'.

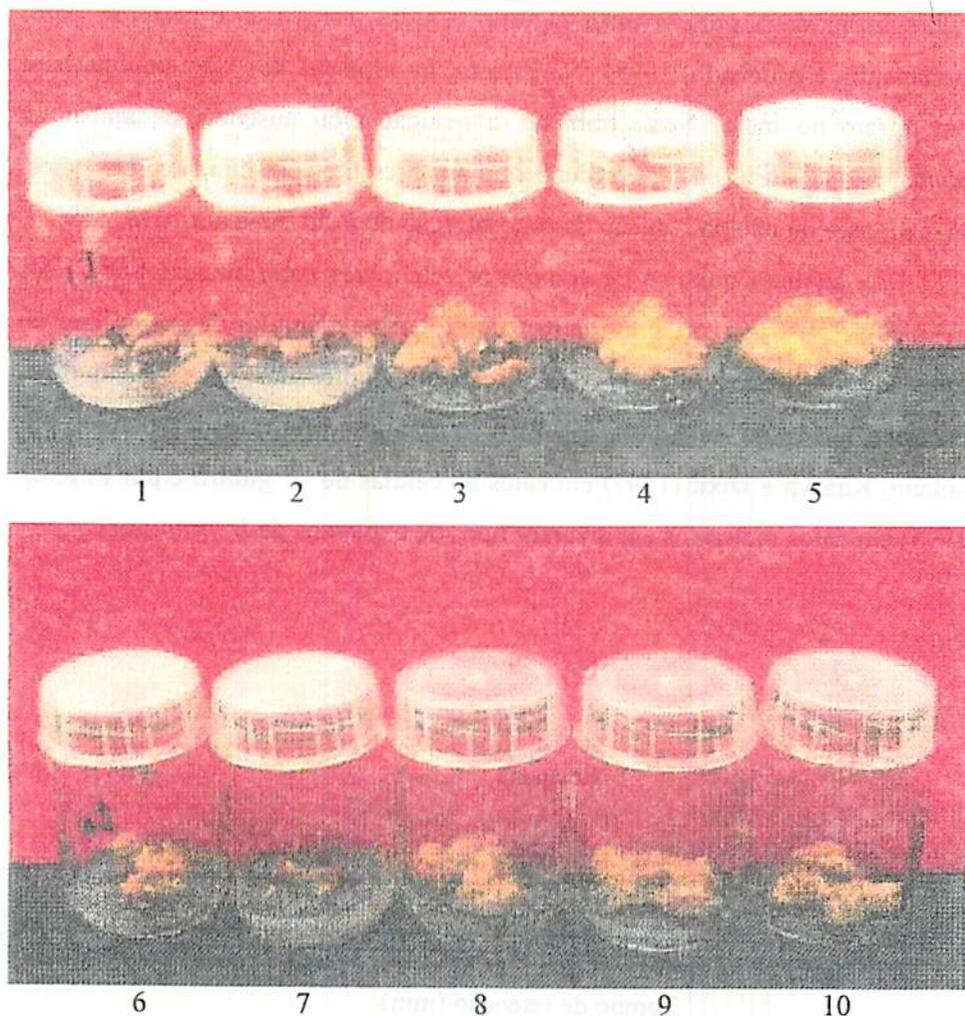


FIGURA 36 – Aspectos gerais de calos de *Derris urucu* oriundos de explante foliar, durante a fase de manutenção de calos (tratamentos: 1 a 10). UFLA, Lavras - MG, 2000.

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos vegetais é marcante; o nitrato, como única fonte de N, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo também a

melhor forma de N para diversas culturas (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998; Grattapaglia e Machado, 1998). No entanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio. Neste trabalho, a redução e/ou ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento de calos, independente ou não na redução da concentração do P do meio nutritivo 'MS'.

As análises química de compostos rotenóides determinadas por CLAE em calos de *D. urucu*, oriundos de explante foliar de plântulas de exemplares do clone 37 germinadas *in vitro*, não detectaram a presença destes compostos, conforme mostrado na Figura 37. Estes resultados diferiram dos obtidos por Tailang, Kharya e Dixit (1997) em calos de células de *G. glabra* e por Li *et al.* (1995) em calos induzidos em diversos tipos de explantes de *B. pruniosa*.

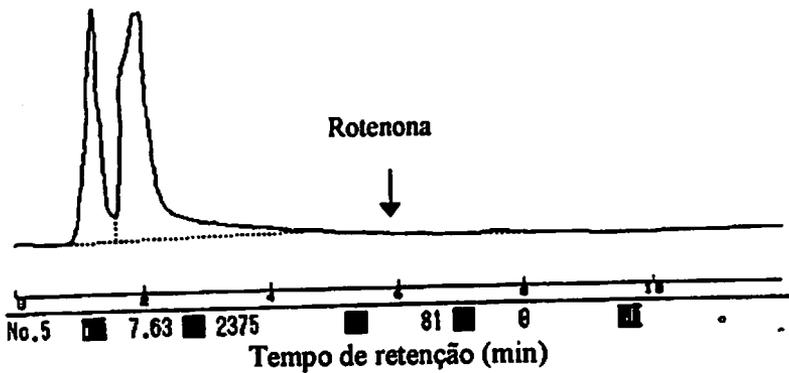


FIGURA 37 – Cromatograma ilustrativo de amostra de tratamentos em calos oriundos de explante foliar. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Compostos secundários produzidos pela planta mãe, na maioria dos casos, não são encontrados em calos. Apenas a regeneração da raiz, dos brotos foliares e da própria planta restauram a produção destes compostos (Kawaguchi *et al.*, 1993). Em particular, o calo funciona como meristema e a não produção dos compostos secundários está relacionada com a alta atividade metabólica direcionada pela mitose. A diferenciação destas células, assim como a

desaceleração da atividade mitótica, progressivamente, permite o acúmulo dos compostos secundários.

Na Tabela 38 observam-se os valores das médias dos pesos da matéria fresca de calos de timbó oriundos de explante radicial, aos 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, em dez meios nutritivos de manutenção, após terem sido induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP. Após 28 dias de cultivo nos meios de manutenção, verificou-se que os melhores resultados desta variável de resposta foram obtidas pelos tratamentos 4 e 9, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 1, 5, 8 e 10, enquanto aos 56 dias de cultivo, o melhor resultado foi proporcionado pelo tratamento 4 (Figura 38). Para os valores das médias da matéria seca de calos aos 28 dias, verificou-se que os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 3, 4 e 9, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 1, 5, 8 e 10, enquanto aos 56 dias, o melhor resultado foi obtido pelo tratamento 4, porém este não diferiu estatisticamente do tratamento 3 (Tabela 38). Em geral, os efeitos nas reduções nas concentrações e formas dos sais de N do meio nutritivo 'MS' para calos oriundos de explante radicial de *D. urucu* seguiram a mesma tendência dos obtidos para explante foliar; contudo, detectou-se uma maior exigência da nutrição nítrica do que da amoniacal no crescimento de calos oriundos de explante radicial, medida em termos de matérias fresca e seca de calos, além de haver uma atenuação da deficiência de N na presença da metade da concentração de P no meio de manutenção de calos.

TABELA 38 – Médias para comparar a interação M*EA para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP em explante radicial de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em 10 diferentes meios de manutenção formulados com variações nas concentrações dos sais de N e P do meio básico de 'MS', suplementados com ANA e BAP (2,0 + 2,0 mg.l⁻¹). UFLA, Lavras, MG. 2000. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento ² (N-NH ₄ ⁺ +N-NO ₃ ⁻ +P-KH ₂ PO ₄)	Variáveis de respostas			
	MFCALO (g)		MSCALO (g)	
	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias
1 (1/2+0+1/2)	1,3414ab	1,4941de	0,0992ab	0,1492c
2 (0+1/2+1/2)	0,2382b	0,2118e	0,0272b	0,0238d
3 (1/2+1/2+1/2)	2,3279ab	7,7974b	0,1452a	0,4306ab
4 (1+1+1/2)	3,6347a	13,7185a	0,1681a	0,5306a
5 (2+2+1/2)	1,3698ab	3,7167cd	0,1007ab	0,1570c
6 (1/2+0+1)	0,2707b	2,7152d	0,0199b	0,1570c
7 (0+1/2+1)	0,3344b	0,3533e	0,0394b	0,8387d
8 (1/2+1/2+1)	1,4624ab	5,1842c	0,1225ab	0,4214b
9 (1+1+1)	3,1303a	9,5539b	0,1498a	0,4044b
10 (2+2+1)	1,3549ab	9,2527b	0,0756ab	0,4206b

¹ Letras distintas na vertical indicam diferenças significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Referentes às concentrações dos sais de N e P do meio nutritivo 'MS'.

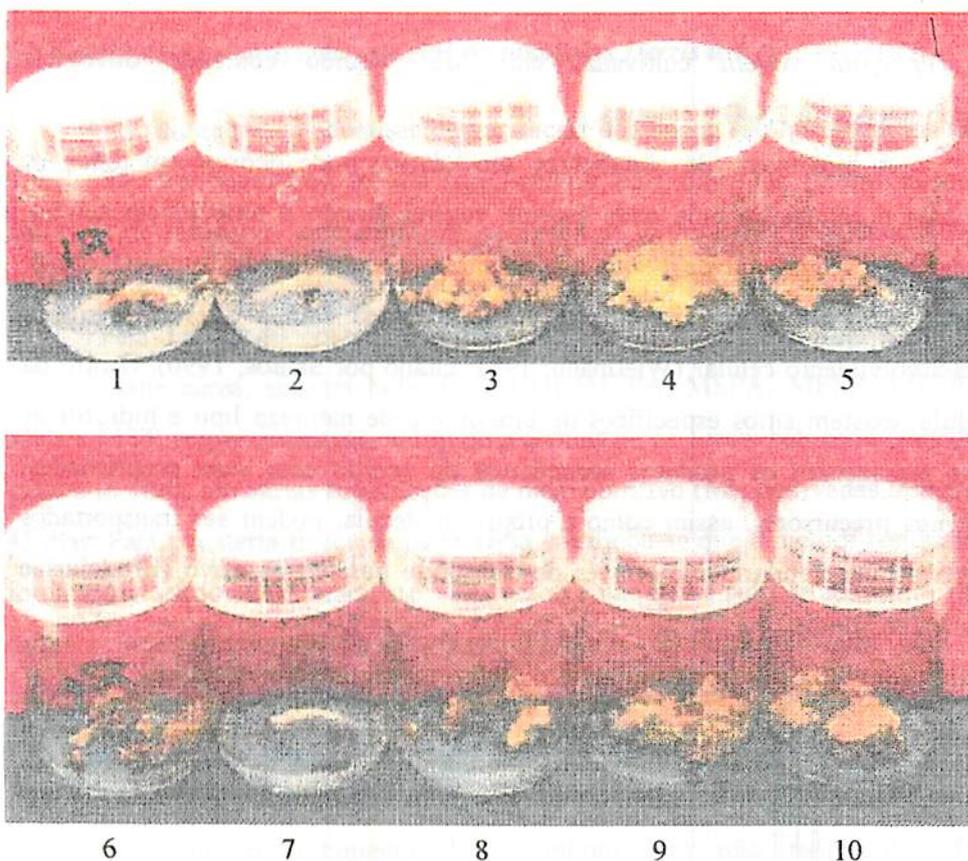


FIGURA 38 – Aspectos gerais de calos de *Derris urucu* oriundos de explante radicial, durante a fase de manutenção de calos (Tratamentos: 1 a 10). UFLA, Lavras - MG, 2000.

As análises química de compostos rotenóides determinados por CLAE mostraram que os calos de *D. urucu* oriundos de explante radicial de plântulas germinadas *in vitro* indicaram a presença destas substâncias neste tipo de material. Estes compostos foram detectados nos tratamentos 5, 6 e 8 após 45 dias de cultivo *in vitro* (Figura 39), com teores que oscilaram entre 0,015 e 0,060%. A presença de compostos rotenóides em cultura de raiz tem sido relatada para *D. elliptica* (Ellis, 1988, citado por Crombie e Whiting, 1998). Kudakesseril e Staba (1988) relatam a utilização de culturas de calos e de suspensão de células para determinar a quantidade de rotenóides em *D. elliptica*

TABELA 39 – Resumo das análises de variâncias para matérias fresca e seca de parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente) de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados Médios e Significância ¹					
		MFPA	MSPA	MFSR	MSSR	MFT	MST
M	7	0,0338**	0,0010**	0,0071*	0,0001**	0,0464*	0,0010**
EA	1	0,1317**	0,0026**	0,0284**	0,0004**	0,2748**	0,0049**
M*EA	7	0,0054 ^{NS}	0,0001 ^{NS}	0,0020 ^{NS}	0,00001 ^{NS}	0,0124 ^{NS}	0,0001 ^{NS}
Resíduo	32	0,0102	0,0002	0,0026	0,00002	0,0162	0,0003
Média	-	0,6164	0,0890	0,2628	0,0263	0,8801	0,1153
CV (%)	-	16,4210	17,4870	19,5110	17,8820	14,4450	14,3490

¹ Dados não transformados.

^{NS}, * e ** = não significativo e significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 40 – Valores médios para matérias fresca e seca de parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente, em g) de plântulas de *Derris urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 45 dias. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento ²	Variáveis de respostas ¹					
	MFPA	MSPA	MFSR	MSSR	MFT	MST
T1	0,5335b	0,0733b	0,2706ab	0,0299ab	0,8036ab	0,1032ab
T2	0,6111ab	0,0743b	0,2317ab	0,0226b	0,8428ab	0,0970b
T3	0,5786ab	0,0905ab	0,3005ab	0,0315a	0,8791ab	0,1220ab
T4	0,5289b	0,0937ab	0,2539ab	0,0259ab	0,7912b	0,1100ab
T1A	0,7175ab	0,1037a	0,3216a	0,0289ab	1,0394*	0,1325a
T2A	0,6205ab	0,0887ab	0,2317ab	0,0264ab	0,8738ab	0,1146ab
T3A	0,7311a	0,1093a	0,2535ab	0,0239ab	0,9838ab	0,1331a
T4A	0,6098ab	0,0881ab	0,2173b	0,0217b	0,8271ab	0,1100ab

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

² Tratamentos: T1 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T2 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T3 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄/2; T4 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄; T1A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄; T2A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄; T3A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄; e T4A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄.

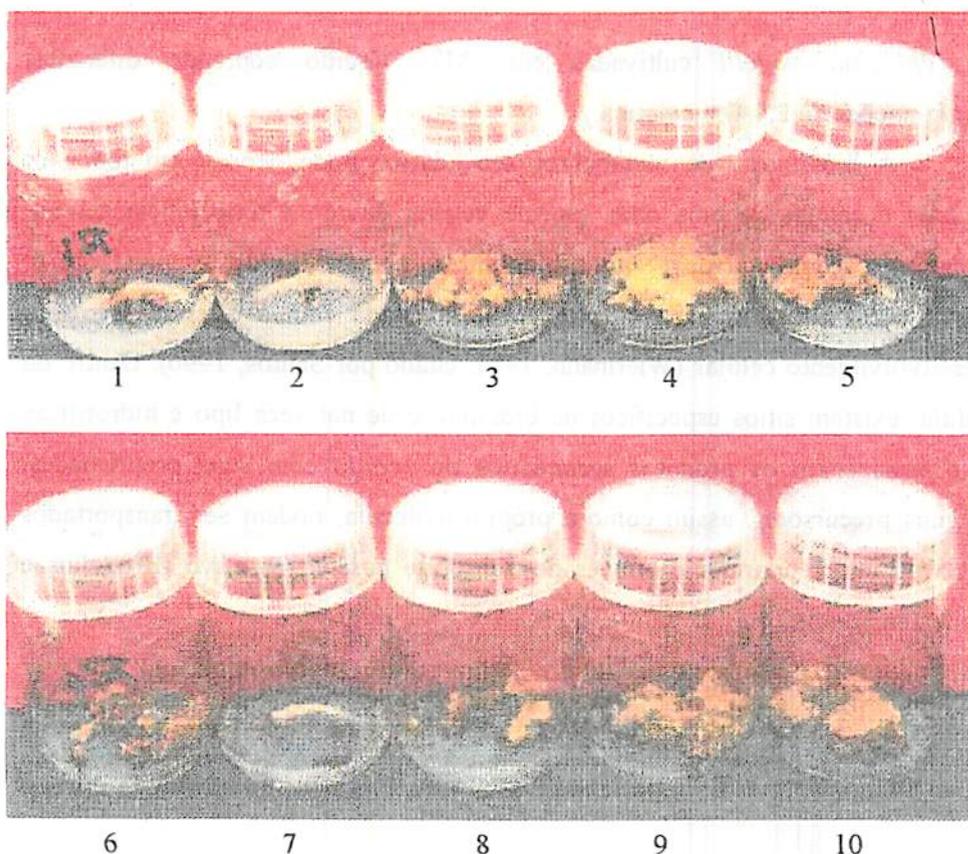


FIGURA 38 – Aspectos gerais de calos de *Derris urucu* oriundos de explante radicial, durante a fase de manutenção de calos (Tratamentos: 1 a 10). UFLA, Lavras - MG, 2000.

As análises química de compostos rotenóides determinados por CLAE mostraram que os calos de *D. urucu* oriundos de explante radicial de plântulas germinadas *in vitro* indicaram a presença destas substâncias neste tipo de material. Estes compostos foram detectados nos tratamentos 5, 6 e 8 após 45 dias de cultivo *in vitro* (Figura 39), com teores que oscilaram entre 0,015 e 0,060%. A presença de compostos rotenóides em cultura de raiz tem sido relatada para *D. elliptica* (Ellis, 1988, citado por Crombie e Whiting, 1998). Kudakesseril e Staba (1988) relatam a utilização de culturas de calos e de suspensão de células para determinar a quantidade de rotenóides em *D. elliptica*

e *Tephrosia vogelli* cultivadas em 'MS' líquido contendo diferentes combinações de 2,4-D e cinetina.

A biossíntese de metabólitos secundários pode ocorrer em todos os tecidos e células de uma dada espécie vegetal devido à totipotência celular. Entretanto, como via de regra, a biossíntese é restrita a determinado órgão, tecido e/ou célula especializada e está relacionada com a diferenciação e o desenvolvimento celular (Wiermann, 1981, citado por Santos, 1996). Dentro da célula, existem sítios específicos de biossíntese de natureza lipo e hidrofílicas que armazenam os produtos secundários de acordo com suas propriedades. Alguns precursores, assim como a própria molécula, podem ser transportados intra ou intercelularmente através de transporte passivo ou ativo (Brodelius e Pedersen, 1993).

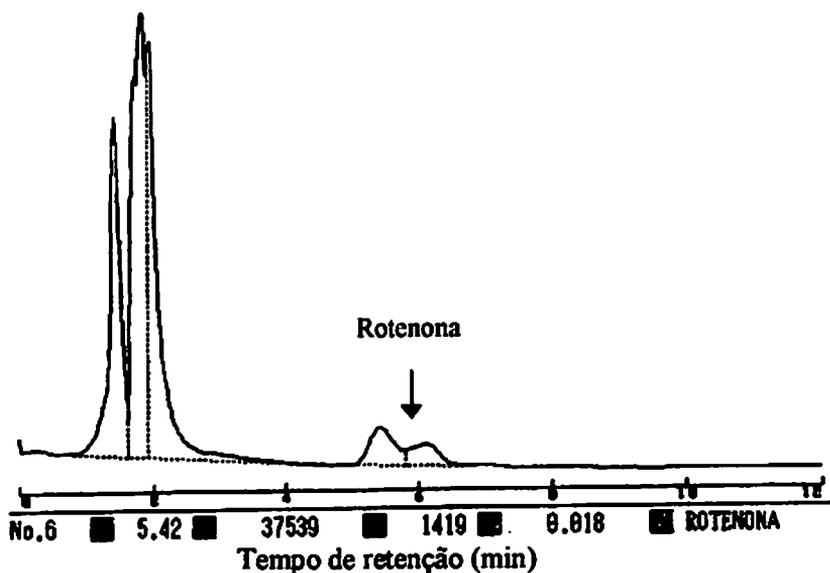


FIGURA 39 – Cromatograma ilustrativo de amostra de tratamentos em calos oriundos de explante radicial. UFLA, Lavras - MG, 2000.

6.3 Crescimento e nutrição mineral de plântulas *Derris urucu*.

Os resultados das análises de variâncias dos dados são apresentados na Tabela 39. Verificaram-se efeitos significativos para todos os fatores nestas variáveis de respostas, indicando que os meios de cultura (M) e as épocas de avaliação (EA) tiveram influências determinantes nestas variáveis de respostas.

Pela Tabela 40 observam-se os valores médios para matérias fresca e seca da parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente, em g) de plântulas de *D. urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 45 dias. Para a matéria fresca da parte aérea, verificou-se que o melhor resultado foi proporcionado pelo tratamento T3A, embora não tenha sido estatisticamente diferente dos tratamentos T2, T3, T1A, T2A e T4A. Por outro lado, para a matéria seca da parte aérea, os melhores resultados foram obtidos com os tratamentos T1A e T3A; no entanto, estes não diferiram dos tratamentos T3, T4, T2A e T4A. Para a matéria fresca do sistema radicular, o melhor desempenho foi obtido com o tratamento T1A, embora este não tenha diferido estatisticamente dos tratamentos T2, T3, T4, T2A e T3A. Para a matéria seca do sistema radicular, o tratamento T3 foi superior aos demais tratamentos, embora não tenha sido diferente estatisticamente dos tratamentos T1, T4, T1A, T2A e T3A. Para a matéria fresca total, o melhor resultado foi obtido pelo tratamento T1A, embora não tenha diferido estatisticamente dos tratamentos T1, T2, T3, T2A e T3A, e para a matéria seca total, os melhores resultados foram obtidos pelos tratamentos T1A e T3A, embora não tenha sido estatisticamente diferente dos tratamentos T1, T3, T2A e T4A. De modo geral, os melhores resultados para estas variáveis de respostas foram proporcionados pelos tratamentos T1A e T3A (Tabela 40).

TABELA 39 – Resumo das análises de variâncias para matérias fresca e seca de parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente) de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Fonte de variação	de G.L	Quadrados Médios e Significância ¹					
		MFPA	MSPA	MFSR	MSSR	MFT	MST
M	7	0,0338**	0,0010**	0,0071*	0,0001**	0,0464*	0,0010**
EA	1	0,1317**	0,0026**	0,0284**	0,0004**	0,2748**	0,0049**
M*EA	7	0,0054 ^{NS}	0,0001 ^{NS}	0,0020 ^{NS}	0,00001 ^{NS}	0,0124 ^{NS}	0,0001 ^{NS}
Resíduo	32	0,0102	0,0002	0,0026	0,00002	0,0162	0,0003
Média	-	0,6164	0,0890	0,2628	0,0263	0,8801	0,1153
CV (%)	-	16,4210	17,4870	19,5110	17,8820	14,4450	14,3490

¹ Dados não transformados.

^{NS}, * e ** = não significativo e significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F.

TABELA 40 – Valores médios para matérias fresca e seca de parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente, em g) de plântulas de *Derris urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 45 dias. UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento ²	Variáveis de respostas ¹					
	MFPA	MSPA	MFSR	MSSR	MFT	MST
T1	0,5335b	0,0733b	0,2706ab	0,0299ab	0,8036ab	0,1032ab
T2	0,6111ab	0,0743b	0,2317ab	0,0226b	0,8428ab	0,0970b
T3	0,5786ab	0,0905ab	0,3005ab	0,0315a	0,8791ab	0,1220ab
T4	0,5289b	0,0937ab	0,2539ab	0,0259ab	0,7912b	0,1100ab
T1A	0,7175ab	0,1037a	0,3216a	0,0289ab	1,0394 ^a	0,1325a
T2A	0,6205ab	0,0887ab	0,2317ab	0,0264ab	0,8738ab	0,1146ab
T3A	0,7311a	0,1093a	0,2535ab	0,0239ab	0,9838ab	0,1331a
T4A	0,6098ab	0,0881ab	0,2173b	0,0217b	0,8271ab	0,1100ab

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

² Tratamentos: T1 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T2 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T3 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄/2; T4 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T1A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄; T2A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄; T3A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄ e T4A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄.

A Tabela 41 apresenta os valores das médias para pesos das matérias fresca e seca de parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente) de plântulas de *D. urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). Observa-se que todas as variáveis de respostas foram superiores aos 45 dias de cultivo, em relação ao tratamento com 30 dias.

Os resultados das análises de variâncias dos dados referentes a altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR) e número de folhas (NF), em plântulas de *D. urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante e 45 dias (EA), são apresentados na Tabela 42. Verificaram-se efeitos significativos para todos os fatores nestas variáveis de respostas, indicando que os meios de cultura (M) e as épocas de avaliação (EA) tiveram influências determinantes nestas variáveis de respostas.

TABELA 41 – Valores médios para matérias fresca e seca da parte aérea, sistema radicular e total (MFPA, MSPA, MFSR, MSSR, MFT e MST, respectivamente, em g) de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG, 2000.

EA, em dias	Variáveis de respostas ¹					
	MFPA	MSPA	MFSR	MSSR	MFT	MST
30	0,5640b	0,0816b	0,2385b	0,0236b	0,8044b	0,1052b
45	0,6687 ^a	0,0963 ^a	0,2871a	0,0291a	0,9557 ^a	0,1253a

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

TABELA 42 – Resumo das análises de variâncias para altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR) e número de folhas (NF) de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG. 2000.

Fonte de variação	G.L.	Quadrado Médio e Significância		
		AP	CSR	NF
M	7	0,2663**	0,0447**	0,0496**
EA	1	0,2996*	0,3085**	0,3708**
M*EA	7	0,0244 ^{NS}	0,0226 ^{NS}	0,0297*
Resíduo	32	0,0459	0,0106	0,0116
Média	-	2,5199	2,3509	2,7775
CV (%)	-	8,4990	4,3690	3,8790

¹Dados transformados segundo raiz ($x + 1$)

^{NS}, * e ** = não significativo e significativo a 0,05 e 0,01 de probabilidade pelo teste F.

Pela Tabela 43 observam-se os valores médios para altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR), número de folhas (NF) e porcentagem de rotenona [R (%)] em plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 45 dias (EA). Para AP, verificou-se que o melhor resultado foi proporcionado pelo tratamento T3A, embora não tenha sido estatisticamente diferente do tratamento 8. Por outro lado, para CSR, os melhores resultados foram obtidos com os tratamentos T1A, T2A e T3A; no entanto, estes não diferiram dos tratamentos T1, T3, T4 e T4A. Para NF, o melhor desempenho foi obtido com o tratamento T3A, embora este não tenha diferido estatisticamente dos tratamentos T1A, T2A e T4A.

TABELA 43 – Valores médios para altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR), número de folhas (NF) e porcentagem de rotenona [R (%)] em plântulas de *Derris urucu* sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG, 2000.

Tratamento ³	Variáveis de respostas ¹			
	AP	CSR	NF	R (%) ²
T1	4,3980bc	4,4456ab	6,4738b	0,020 / -
T2	4,0683c	3,7910b	6,4043b	0,025 / 0,035
T3	5,0077abc	4,4627ab	6,2809b	0,015 / 0,007
T4	4,3833bc	4,4665ab	6,1470b	0,025 / 0,004
T1A	5,8864abc	5,0613a	7,0294ab	0,004 / 0,006
T2A	6,3007ab	4,9664a	6,8933ab	0,018 / 0,014
T3A	6,9429a	4,7590a	7,7256a	0,010 / 0,017
T4A	6,1229ab	4,3133ab	6,8207ab	0,020 / 0,006

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Valores obtidos aos 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*.

³ Tratamentos: T1 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T2 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T3 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄/2; T4 = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄/2; T1A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NH₄ + P-KH₂PO₄; T2A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + 0,0 mg.l⁻¹ de N-NO₃ + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄; T3A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃/2 + N-NH₄/2 + P-KH₂PO₄ e T4A = 'MS' com metade da concentração dos sais das soluções D, E e F + N-NO₃ + N-NH₄ + P-KH₂PO₄.

A Tabela 44 apresenta os valores das médias para altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR), número de folhas (NF) e porcentagem de rotenona [(%R)] de plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). Observa-se, em geral, que aos 45 dias de cultivo, todas as variáveis de respostas tiveram resultados superiores às do tratamento com 30 dias de cultivo. Podem ser observados, na Tabela 44 e Figura 40, os resultados dos teores de rotenona apresentados pelos tratamentos, evidenciando respostas de biossíntese de compostos rotenóides.

As análises químicas dos compostos rotenóides obtidos por CLAE mostraram a presença destes compostos (Figura 40) no sistema radicular de plântulas de *D. urucu*; estes teores variaram entre 0,004 a 0,025% aos 30 dias e entre 0,004 a 0,035% aos 45 dias, detectando-se, em média, maiores teores de compostos rotenóides aos 30 dias. Em geral, as variações nos teores de NO_3^- ou NH_4^+ , na presença da metade do P e aos 30 dias de cultivo *in vitro*, favoreceram a biossíntese de compostos rotenóides em *D. urucu*.

TABELA 44 – Valores médios para altura de planta (AP), comprimento do sistema radicular (CSR), número de folhas (NF) e porcentagem de rotenona [R (%)] em plântulas de timbó sob condições de cultivo *in vitro*, em várias formulações de meio nutritivo (M), cultivadas durante 30 e 45 dias (EA). UFLA, Lavras - MG. 2000.

EA, em dias	Variáveis de respostas ¹			
	AP (cm)	CSR (cm)	NF	R (%)
30	4,9580b	4,1562b	6,2341b	0,017
45	5,7544a	4,9101a	7,2106a	0,013

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

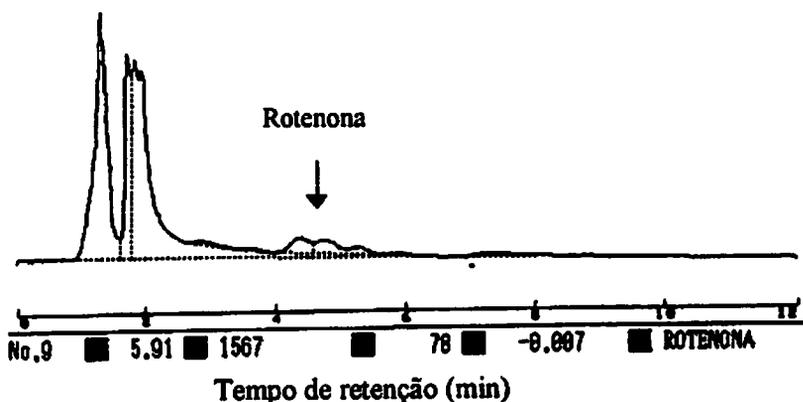


FIGURA 40 – Cromatograma ilustrativo de amostra dos tratamentos em plântulas de *Derris urucu*. UFLA, Lavras - MG, 2000.

7 CONCLUSÕES

A omissão de K da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetou o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 20 e 40 dias de cultivo.

As omissões de Ca, Mg e S da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetaram significativamente o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 40 dias de cultivo.

A matéria seca da raiz foi reduzida significativamente em todos os tratamentos, com exceção do deficiente em S.

No caule e na folha, as maiores reduções de matérias secas foram detectadas nos tratamentos com omissões de N, Ca e P.

A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento do calos, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo 'MS'.

Calos oriundos de explante radicial apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides.

Os efeitos de várias formulações de sais sobre o crescimento e a nutrição mineral de plântulas de *D. urucu*, durante 45 dias de cultivo *in vitro*, apresentaram respostas diferenciadas.

A biossíntese de compostos rotenóides foi detectada no sistema radicular de plântulas de *D. urucu*, independentemente da concentração dos sais, e os teores destes compostos variaram entre 0,017 e 0,013% aos 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse trabalho, tornou-se possível estudar as influências e os efeitos de fatores relacionados às técnicas de cultura de tecidos vegetais, com ênfase na determinação de protocolos eficientes para a indução de calos e para a propagação *in vitro* de espécies de timbós. Também houve o objetivo de quantificar a produção de compostos rotenóides oriundos do cultivo *in vitro* de calos induzidos e formados em explantes foliar e radicial e em plântulas germinadas *in vitro*, ambos submetidos a meios de cultura formulados com variações de concentrações dos sais de N e de P do meio nutritivo 'MS'. Na literatura relacionada com a presente pesquisa, há escassez de informações pertinentes aos timbós; sendo assim, houve necessidade de desenvolver vários ensaios preliminares para adequar técnicas de cultura *in vitro* e *in vivo*.

Foram conduzidos 16 experimentos: 15 em condições de laboratório de cultura de tecidos vegetais e um em casa de vegetação, além de vários ensaios preliminares. Duas espécies de timbós foram usadas como fonte de explantes: *Derris urucu* de exemplares do clone 37 e *D. nicou* de exemplares do clone 495. No laboratório, as condições de cultivo da sala de crescimento apresentavam irradiância de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, temperatura e umidade relativa do ar de $26\pm 1^\circ\text{C}$ e $70\pm 5\%$, respectivamente, e fotoperíodo de 16 h.

Neste trabalho usaram-se sementes e estacas lenhosas de *D. urucu* do clone 37 e estacas lenhosas de *D. nicou* do clone 495, oriundas do banco de germoplasma da EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, em Belém, Pará. As sementes foram colocadas para germinar em vermiculita, em condições de casa-de-vegetação, e apresentaram um bom índice de germinação e de desenvolvimento de plantas, enquanto as estacas dos clones de timbós apresentaram um baixo índice de pegamento, nas mesmas condições de cultivo, após nove meses de plantio em saco plástico contendo solo de barranco como

substrato. Desta forma, vários ensaios preliminares foram desenvolvidos visando o estabelecimento de cultura asséptica, no entanto, os explantes foliar, radicial ou nodal de plantas de *D. urucu* e *D. nicou*, provenientes de casa de vegetação e inoculados em meios de cultura formulados para indução e formação de calos e/ou para micropropagação, em condições de cultivo *in vitro*, apresentaram altos índices de oxidação, contaminação fúngica e degradação de clorofila no explante foliar. Várias alternativas no processo de desinfestação foram tentadas para solucionar estes problemas, porém quase não se logrou êxito neste processo. Desta forma, com o objetivo de obter explantes jovens e assépticos para os estudos referentes a este trabalho, optou-se pela germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas em condições de cultivo *in vitro*.

No estudo sobre germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas, verificou-se que as sementes de *D. urucu* iniciaram a germinação a partir do terceiro dia de cultivo; no sexto dia atingiram 50% e aos doze dias alcançaram 85% de germinação em meio nutritivo 'MS' formulado com diferentes concentrações dos sais dos macro e micronutrientes deste meio básico. O número de sementes germinadas de *D. urucu* não foi afetado pelas variações das concentrações dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS'. A melhor resposta de crescimento de plântulas de *D. urucu*, em condições de cultivo *in vitro*, foi proporcionada pela formulação constituída com 50% dos sais dos macro e micronutrientes do meio nutritivo 'MS', após 35 dias de cultivo.

A indução e formação de calos em diversos tipos de explantes e várias formulações de meios de cultura, suplementadas com substâncias reguladoras de crescimento, evidenciaram as melhores respostas para segmento foliar oriundo de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*, proporcionaram a melhor resposta à indução de calos, em meio nutritivo 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de 2,4-D, após 28 ou 35 dias de cultivo; e para segmentos radiciais oriundos de

plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*, as melhores respostas foram obtidas em meio nutritivo de 'MS' suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP ou 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, após 35 dias de cultivo. O melhor meio de manutenção de calos oriundos de explantes foliar e radicial de *D. urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro* foi proporcionado pelo meio nutritivo 'MS' suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP. A produção máxima de crescimento de calos foi obtida aos 24 dias de cultivo, independentemente do tipo de explante.

O estudo de micropropagação e de aclimação de plântulas de timbó resultou em segmentos nodais de *D. urucu* e de *D. nicou* que apresentaram, naturalmente, uma capacidade de desenvolvimento de gemas axilares em meio nutritivo 'MS' suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, sem regulador de crescimento. Segmentos nodais de *D. urucu* contendo duas gemas axilares inoculados em meio nutritivo 'MS' suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, na ausência de regulador de crescimento, apresentaram um desenvolvimento superior em termos de número e tamanho de brotações e taxa de multiplicação, quando comparados ao segmento nodal com uma gema axilar e a explante contendo ápice caulinar. Brotações oriundas de segmentos nodais com duas gemas axilares foram enraizadas em meio nutritivo 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em AIB a 2.000 ppm, com pH ajustado para 4,5 ou 5,7, e em 'MS'/2 + 2% de sacarose + 0,55% de ágar + imersão por 30 segundos em ANA a 2.000 ppm, com pH ajustado para 5,7. *D. urucu* não apresentou uma proliferação de brotos, ou seja, múltiplos brotos em roseta. As concentrações de citocininas usadas não foram eficientes para promover a proliferação de brotos em timbós. Estas espécies apresentaram uma tendência de multiplicação através de segmentos nodais. As plântulas enraizadas foram transplantadas para substrato plantmax, aclimatadas em casa-de-vegetação e apresentaram uma taxa de sobrevivência de 90%.

O estudo de nutrição mineral, crescimento e quantificação de compostos rotenóides em timbó evidenciou os seguintes aspectos: A omissão de K da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetou o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 20 e 40 dias de cultivo. As omissões de Ca, Mg e S da solução nutritiva de Bolle-Jones não afetaram significativamente o crescimento da parte aérea de *D. urucu* após 40 dias de cultivo. A matéria seca da raiz foi reduzida significativamente em todos os tratamentos, com exceção do deficiente em S. No caule e na folha, as maiores reduções de matérias secas foram detectadas nos tratamentos com omissões de N, Ca e P. A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N resultou em reduções marcantes de crescimento do calos, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo 'MS'. Calos oriundos de explante radicial apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides, cujos teores oscilaram entre 0,015 e 0,060%. Os efeitos de várias formulações sobre o crescimento e a nutrição mineral de plântulas de *D. urucu*, durante 45 dias de cultivo *in vitro*, apresentaram respostas diferenciadas. A biossíntese de compostos rotenóides foi detectada no sistema radicular de plântulas de *D. urucu*, independentemente dos tratamentos usados, e os teores destes compostos variaram entre 0,017 e 0,013% aos 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente.

Dentre os resultados obtidos neste trabalho, destacam-se a indução, a formação e a manutenção de calos oriundos de explantes radiciais de timbó, que são claramente utilizáveis para a produção de calos em larga escala, considerando que os princípios ativos desta cultura encontram-se nas raízes e que o processo de indução e formação de calos em explantes radiciais de 1 cm de comprimento leva 30 dias para produzir 1,6513 a 1,6924 g de biomassa fresca por tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura. Considera-se, ainda, que após duas subculturas em meio de manutenção de calos, a cada 24 dias, em frasco de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio cultura, há possibilidade de

se produzir aproximadamente 14 g de biomassa fresca por frasco. Desta forma, considerando estes parâmetros, estima-se uma produtividade de 2.128 Kg de biomassa fresca de calos de raízes de timbós por ano, com a utilização de 10.000 frascos sendo cultivados em uma sala de crescimento de 15 m². Portanto, neste tipo de cultura de calos, estima-se uma produção de compostos rotenóides da ordem de 0,65 a 32,8 Kg em função do potencial de produtividade dos clones de timbós.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, a escassez de informações agronômicas e biotecnológicas e a possibilidade da maior utilização dos princípios ativos dos timbós como inseticida e piscicida natural, sugere-se que novas linhas de pesquisas sejam desenvolvidas nesta cultura. Estas podem estar relacionadas à cultura de tecidos vegetais de plantas de casa-de-vegetação e de campo, visando a cultura em suspensão de células oriundas de explantes radiciais, considerando que os princípios ativos dos timbós encontram-se nas raízes; estudo de nutrição mineral de calos oriundos de explantes radiciais em termos da melhor relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ e a sua relação com os compostos rotenóides; e a continuidade do processo de micropropagação, com ênfase na clonagem *in vitro* de plantas elites de timbós.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLLE-JONES, E.W. Nutrition of (*Hevea brasiliensis*) II. Effect of nutrient deficiencies on growth, chlorophyll, rubber and contents of Tjirandji seedlings. *Journal of Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, v.14, p.209, 1954.
- BRODELIUS, P.; PEDERSEN, H. *Biotechnology*. 11: 30, 1993.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p.87-132.
- CALDAS, R.A.; CALDAS, L.S. Nitrate, ammonium and Kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.37, n.8, p.111-116, Feb. 1976.
- CARNEIRO, I.F. Adequação de técnicas de cultura *in vitro* na obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar Maçã. Goiânia: UFG, 1997. 106p. (Tese - Doutorado em Agronomia)
- CROMBIE, L.; WHITING, A.D. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry*, Oxford, v.49, n.6, p.1479-1507, June 1998.
- De FOSSARD, A. *Tissue culture for plant propagators*. Armidale: Univerity of New England, 1976. 240p.
- FABASI, J.A.V. Carências de macronutrientes em plantas de malva (*Urena lobata*), variedade Br - 01. Belém: FCAP, 1996. 90p. (Dissertação de Mestrado).
- FRAZÃO, D.A.C. Sintomatologia das carências de macronutrientes em casa de vegetação e recrutamento de nutrientes pelo freijó (*Cordia goeldiana huber*) aos 2, 3, 4 e 8 anos de idade implantado em latossolo amarelo distrófico, Belterra, Pará. Piracicaba: ESALQ, 1985. 194p. (Tese - Doutorado em Agronomia).

- FURMANOWA, M.; GLOWNIAK, K.; SYKLOWSKA, B.K.; ZGORKA, G.; JOZEFczyk, A. Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus media* var. *Hatfieldii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Netherlands, v.49, n.1, p.75-79, 1997.
- GAUTHERET, R.J. *Manual technique de culture des tissus vegetaux*. Paris: Masson Cie, 1942. 334p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Tissue culture media: plant propagation by tissue culture*. Eastern Press, 1984. 709p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p.183-260.
- GREWAL, S.; AHUJA, A.; ATAL, C.K. In vitro proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Indian Journal of Biology*, New Pali, v.18, p.775-777, 1980.
- HAAG, H.P.; CÂMPORA, P.; FORTI, L.H.S.P. Crescimento e deficiência de macronutrientes, boro e zinco em plantas de guar. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros"*, Piracicaba, v.47,pt.1, p.251-260, 1990.
- HAAG, H.P.; DECHEN, A.R.; ROSOLEN, D.L. Carência de macronutrientes e de boro em plantas de urucu. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.45, n.2, p.423-431, 1988.
- HASEGAWA, T.; YABE, K.; MORITA, M. Production system of micropropagated nursery by tissue culture in Japanese butterbur. III. In vitro preservation of cultered plants on modified MS medium and MS medium containing growth regulator. *Research Bulletin of the Aichi Ken Agricultural Research Center*. v.27, p.159-166, 1995.
- KAWAGUCHI, K.; ASAKA, I.; HIROTANI, M.; FURUYA, T.; KATSUKI, S. Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli. *Phytochemistry*, Oxford, v.34, n.5, p.1317-1321, May 1993.

- KUDAKASSERIL, G.J.; STABA, E.J. Insecticidal phytochemicals. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. (eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants: phytochemicals in plant cell cultures*. San Diego: Academic Press, 1988. v.5, Cap.31, p.537-552.
- LI, Q.R.; YANG, J.Y.; CAO, A.F.; ZHAO, M.; LI, Q.R.; YANG, J.Y.; CAO, A.F.; ZHAO, M. Callus culture of *Barberis pruinosa* e berberine content in callus. *Acta Botanica Yunnanica*, Yunnan, v.17, n.3, p.325-330, 1995.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. *Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. New York: Academic Press, 1995. 889p.
- MATOS, A.O. *Sintomas de macro e micronutrientes em plantas de mogno*. 1998. No prelo.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. *Principles of plant nutrition*. Bern: International Potash Institute, 1987. 687p.
- MOORE, R.H. *Mineral deficiencies in *Derris elliptica**. San José: Federal Experiment Station in Puerto Rico/USDA, 1945. 26p. (Bulletin, 43).
- MURASHIGE, T., *Plant propagation through tissue culture*. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- NANNETTI, D.C. *Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: THORPE, T.A., ed. *Frontiers of plant tissue culture 1978*. Calgary: University of Calgary, 1978. p.265-275. 1978.
- PIERIK, R.L.M. *In vitro culture of higher plants*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.

- POIRIER-HAMON, S.; RAO, P.S.; HARADA, H. Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of *Antirrhinum majus* (snapdragon): growth and organization of embryoides. **Journal Experimental Botany**, London, v.25, n.87, p.752-760, Aug. 1974.
- RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. **Fitoterapia**. v.68, n.4, p.349-354, 1997.
- SANTIAGO, E.J.A. de; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; CARVALHO, J.G. de; et al. Growth of the pepper (*Pipiper hispidinervium* DC.) submitted to different levels of N and P in vitro. In **Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v.35, n.3, p.50-A, Mar. 1999.
- SANTOS, A.S. Indução da produção e acúmulo de coccineonas (isoflavonóides) em cultura de tecidos de *Boerhaavia coccinea* P. Miller. Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 1996. 156p. (Dissertação – Mestrado em Química Orgânica).
- SILVA, G.L.; GOLENIOWSKI, M.E. Stimulants and inhibitors of psilostachyinolide production in callus culture. **Journal of Natural Products**, v.57, n.2, p.225-229, 1994.
- TAILANG, M.K.; KHARYA, M.D.; DIXIT, V.K. Mutation induced bioproduction of glycyrrhetic acid from callus culture of *Glycyrrhiza glabra* L. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, New Delhi, v.59, n.1, p.22-25, 1997.
- UTUMI, M.M.; MONNERAT, P.H.; PEREIRA, P.R.G.; FONTES, P.C.R.; GODINHO, V. de P.C. Deficiências de macronutrientes em estêvia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1039-1043, Jan. 1999.
- VIÉGAS, I. de J.M.; CARVALHO, J.G. de; CONCEIÇÃO, H.E. O. da ; SANTIAGO, E.J.A. de. Sintomas de macronutrientes em plantas de jaborandi. In: **Congresso Brasileiro de Nutrição Mineral de Plantas**, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...Rio de Janeiro**.

VIÉGAS, I. de J.M.; CARVALHO, J.G. de; ROCHA NETO, O.G. da; SANTIAGO, E.J.A. de. **Carência de macronutrientes em plantas de quina**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1998. 31p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 192).

VIÉGAS, I. de J.M.; HAAG, H.P.; SILVA, J.F.; MONTEIRO, F.A. **Carências de macronutrientes e de boro em plantas de juta (*Corchorus capsularis* L.) variedade Roxa**. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1992. 24p. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de Pesquisa, 138).

WEBER, H.; SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P.; DECHEN, A.R. **Nutrição mineral de hortaliças: XXXVII Deficiências de macronutrientes em cubiu (*Solanum tojiro* Humb. Bonpl.)**. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, v.37, n.2, p.481-506, 1981.

WHITE, P.R. **A handbook of tissue culture**. New York: Ronald Press, 1943. 524p.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. **Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implication for hardening**. *Plant Science*, Berkeley, v.52, n.2, p. 127-134, 1987.