



**DIVERGÊNCIA GENÉTICA E EFEITO DO
NITROGÊNIO TOTAL NO CRESCIMENTO
IN VITRO DE IPECA [*Psychotria ipecacuanha*
(Brot.) Stokes]**

PATRÍCIA SCHOBER GONÇALVES LIMA

2002

PATRÍCIA SCHOBER GONÇALVES LIMA

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA E EFEITO DO NITROGÊNIO TOTAL NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE IPECA [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.)
Stokes]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

MINAS GERAIS-BRASIL
2002

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

Lima, Patrícia Schober Gonçalves

Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento *in vitro* de
ipeca [*Psychotria ipecacuanha* (Brot) Stokes] / Patrícia Schober Gonçalves Lima.

--Lavras: UFLA, 2002.

83 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Ipeca. 2. *Psychotria ipecacuanha*. 3. Planta medicinal. 4. Nitrogênio. 5.
Divergência genética. 6. Marcador RAPD. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD- 583.5204133
- 633.88352

PATRÍCIA SCHOBER GONÇALVES LIMA

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA E EFEITO DO NITROGÊNIO TOTAL NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE IPECA [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.)
Stokes]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Programa de
Agronomia, área de concentração em Genética e
Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de
"Mestre".

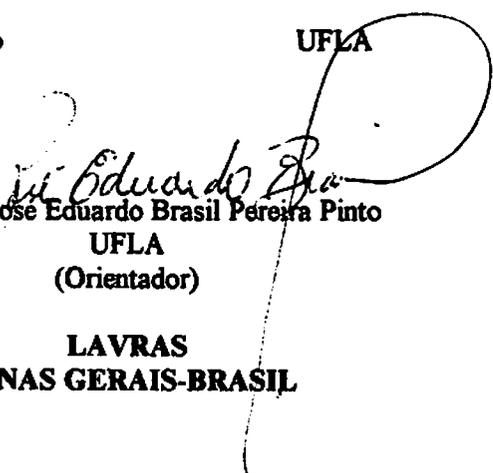
APROVADA em 12 de julho de 2002

Prof. Dr. João Bosco dos Santos

UFLA

Profa. Dr. Dulcinéia Carvalho

UFLA


Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS-BRASIL**

**À minha família, em especial aos
meus pais Carlos e Rosalia**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e tudo o que esta tem me proporcionado.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade e amizade demonstrados durante todo o curso, e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor João Bosco dos Santos, que exercendo o papel de co-orientador, foi de inestimável importância para realização deste trabalho. Agradeço também pelos ensinamentos, dedicação e disponibilidade e amizade demonstrados durante todo o curso.

Ao Dr. Osmar Alves Lameira – Embrapa- Amazônia Oriental pela colaboração e fornecimento do material vegetal para realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do curso de Genética e Melhoramento de Plantas: Magno, César, Elaine, Lisete, Samuel e João Cândido, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Geraldo Eugênio de França, que antes mesmo do início do mestrado sempre me incentivou, pelo apoio e amizade.

Ao Lamartine, que foi de grande importância e ajuda durante a condução deste trabalho, e também pela amizade.

À Virgínia Maria Tenório Sabino Donato pelo apoio e amizade de sempre.

Aos amigos Fabiano, Odair, João Luis, Francislei e Marcelo, pela ajuda em estatística e também pela amizade.

Ao André, pela presença, amizade, carinho e companheirismo durante todo o período que passamos juntos.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular-DBI/UFLA: Nelcimar, Gilvan, Izabella, Juliano, Taislene, Marcos, Marinei, pela colaboração e amizade.

Aos amigos do curso de Genética e Melhoramento de Plantas, em especial ao Fábio, Máira, Maurício e Elisa.

À Érika pela grande ajuda na realização da parte experimental de cultura de tecidos.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Tecidos – DAG/ UFLA : Fabiano, Ricardo, Evaldo pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, pelos auxílios prestados.

Aos funcionários da Biblioteca da UFLA, pelo atendimento e correções das referências bibliográficas.

Ao Núcleo de Estudos em Genética (GEN), pelo apoio e oportunidades oferecidas.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I.....	01
1 Introdução.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 A Planta.....	03
2.1.1 Condições atuais.....	03
2.1.2 Origem e distribuição natural.....	07
2.1.3 Descrição botânica.....	08
2.1.4 Sinonímia.....	10
2.1.5 Propagação.....	10
2.1.6 Uso farmacológico.....	11
2.1.7 Composição química das raízes.....	12
2.1.8 Emetina.....	12
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> e plantas medicinais.....	13
2.2.1 Micropropagação.....	15
2.2.2 Meios de cultivo.....	15
2.2.2.1 Nitrogênio.....	18
2.2.3 Reguladores de crescimento.....	21
2.3 Marcadores genéticos.....	24
2.3.1 Marcadores RAPD.....	26
2.3.2 Avaliação da diversidade genética por meio de marcadores RAPD.....	28
2.3.3 Coeficientes de similaridade usados em estudos com marcadores RAPD.....	30
2.3.4 Análises de agrupamentos.....	31
3 Referências bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 2: Divergência genética de acessos de ipeca, <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes., baseada em marcadores RAPD	42
1 Resumo.....	42
2 Abstract.....	43
3 Introdução.....	43
4 Material e métodos.....	44
5 Resultados e discussão.....	49
6 Conclusões.....	57
7 Referências bibliográficas.....	57

CAPÍTULO 3: Estabelecimento da concentração de nitrogênio total no meio de cultura para micropropagação de ipeca, <i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes.....	59
1 Resumo.....	59
2 Abstract.....	60
3 Introdução.....	60
4 Material e métodos.....	62
5 Resultados e discussão.....	64
6 Conclusões.....	73
7 Referências bibliográficas.....	74
ANEXOS.....	76

RESUMO

LIMA, Patrícia Schober Gonçalves. **Divergência genética e efeito do nitrogênio total no crescimento *in vitro* de ipeca [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes].** Lavras: UFLA, 2002. 83p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de Plantas)*

A ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) é reconhecida mundialmente como planta medicinal. São produzidos em suas raízes dois alcalóides de grande valor farmacológico: A emetina e a cefalina, utilizados no tratamento da amebíase e disenteria. Sendo nativa da Mata Atlântica, e estando ameaçada por ter sofrido intenso extrativismo nos dois séculos passados, e ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas no presente é uma espécie passível de se adequar a um sistema de cultivo economicamente viável. Uma eficiente avaliação da variabilidade disponível é uma das principais ferramentas para a definição de uma estratégia de conservação e utilização do germoplasma. O objetivo deste trabalho foi analisar a divergência genética entre 46 acessos de ipeca provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Foi utilizado o marcador RAPD e obtiveram-se 102 bandas polimórficas. As similaridades genéticas foram estimadas por meio do coeficiente de Nei-Li e foram agrupadas por meio do método UPGMA. A análise do dendograma mostrou que houve a formação de alguns grupos com acessos geneticamente iguais entre si. Ainda assim, a maioria dos acessos mostrou-se geneticamente diferente. Foi verificado também através de um teste de correlação entre as distâncias geográficas e distâncias genéticas, que a divergência genética para os 46 acessos de ipeca não está correlacionada à distribuição geográfica dos mesmos. Visando também o estabelecimento adequado da concentração de nitrogênio total em meio de cultura para o cultivo *in vitro* de ipeca, foram testadas 6 variações (0; 7.5; 15; 30; 45 e 60mM) da concentração de nitrogênio da solução original do meio MS. Verificou-se que a aplicação de 60mM de nitrogênio na presença de 2mg/L de BAP possui um efeito positivo na produção de matéria seca e na formação de um maior número de brotações por explante.

Comitê orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto -UFLA (Orientador), João Bosco dos Santos (Co-orientador)

ABSTRACT

LIMA, Patrícia Schober Gonçalves. **Genetic divergence and total nitrogen effect in *in vitro* growth of ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.).** Lavras: UFLA, 83p.(Dissertation - Master in Agronomy/Genetic and Plant Breeding).

The ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) is recognized as medicinal plant. In their roots are produced the emetin and cephaelin, two important alkaloids of pharmacological value for amoeba and dysentery treatments. This is a native endangered specie of Mata Atlântica Forest because their intense extraction and their reduced natural incident area at the present; the ipecac is specie subject to a viable economic cultivation system. An efficient assessment for available variability is one of mainly tools for a conservation strategy definition and germoplasm use. The purpose of this research is analyzing the genetic divergence among 46 accesses of ipecac originating from ipecac germplasm bank of Embrapa- Oriental Amazonian. The clustering analyses of similarities were making by NTSYS-pc 2.0 program, using Nei – Li coefficient. The dendogram analyses showed that occurred some clusters formation by accesses genetically equal among themselves. In spite of this, the majority of the accesses are genetically different. Looking for the establishment of an appropriate culture media for ipecac micropropagation, was tested 6 variations (0.0; 7.5; 15.0; 30.0; 45.0 and 60.0 mM) of total nitrogen concentrations of original media MS solution supplemented or not, with 2mg/L of BAP. It was checked that the 60mM nitrogen doses with BAP had a positive effect on the mass production and greatest shoot number per explants.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), João Bosco dos Santos – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Muitas plantas produzem compostos orgânicos economicamente importantes. Estes compostos resultam do metabolismo secundário e desempenham papel essencial na vida da planta; além disto muitos deles, pelas suas ações farmacológicas ou propriedades químicas que apresentam, são utilizados como medicamentos ou precursores (SERRA, 1999).

Segundo GARCIA et al.(1996), existe uma grande carência em estudos sobre conservação de germoplasma de espécies vegetais nativas de ecossistemas tropicais, principalmente aquelas de porte herbáceo. Um grande número de espécies de plantas medicinal e aromático brasileiras está sob impacto de coletas silvestres que podem levar ao seu desaparecimento local ou extinção.

A ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) é reconhecida mundialmente como planta medicinal. São produzidos em suas raízes dois alcalóides de grande valor farmacológico: A emetina e a cefalina, que apresentam efeito emético considerável e expectorante em doses atenuadas, utilizados no tratamento da amebíase e disenteria correspondente (SOUZA et al., 1991). É uma espécie modelo no estudo de sistemas economicamente aproveitáveis da biodiversidade em áreas florestais que estão sob alta pressão econômica. Sendo nativa da Mata Atlântica e estando ameaçada por ter sofrido intenso extrativismo nos dois séculos passados e também, por ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas no presente, é uma espécie passível de se adequar a um sistema de cultivo economicamente viável, a exemplo do que ocorreu na Índia.

A abordagem dos estudos de espécies medicinais importantes como a ipeca deve se dar de forma multidisciplinar, buscando distinguir quais são os componentes genéticos e os ambientais responsáveis pela variação entre

indivíduos e entre populações. Qualquer novo sistema de produção vegetal, visando a extração de produtos naturais, deve considerar aspectos genético-fisiológicos inerentes ao metabolismo próprio da espécie. A produtividade de um determinado composto pode não estar correlacionada com os índices usualmente empregados para determinar as épocas de colheita em culturas tradicionais. SEIDL (1994), comenta que os tratos culturais rotineiramente empregados para culturas convencionais devem ser reavaliados quando se objetiva a produção de metabólitos secundários.

Desta forma, o estudo da estrutura genética e da diversidade da espécie faz-se necessário para o delineamento de estratégias visando a conservação das populações em seu próprio habitat, com as perspectivas de manutenção da diversidade (CASTELLEN, 2000). Esta é essencial para futuros estudos de genética e aproveitamento racional da variabilidade no melhoramento, tornando a exploração da espécie mais eficiente.

O uso de marcadores surge como ferramenta para auxiliar na identificação da variabilidade genética, e pode contribuir para os trabalhos de preservação em bancos de germoplasma e no auxílio a programas de melhoramento genético. Dentre os diversos marcadores moleculares a técnica de RAPD tem se destacado entre outras metodologias devido à maior simplicidade e menor custo.

Além disto, o emprego de técnicas adequadas visando o cultivo agrônômico ou extrativismo sustentado de espécies medicinais poderia colaborar para a redução da coleta comercial. A tecnologia do cultivo *in vitro* constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal.

Deste modo, este trabalho busca aliar as tecnologias de cultivo *in vitro* e marcadores moleculares no auxílio à conservação e cultivo sustentado da ipeca, através da caracterização molecular de 46 acessos da espécie, provenientes do

banco de germoplasma da Embrapa-Amazônia Oriental-CPATU. E também, do estabelecimento de um meio de cultivo *in vitro* adequado para a planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Planta

2.1.1 Condições Atuais

A espécie *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (figura 1), conhecida vulgarmente como ipeca, é uma planta medicinal de grande importância devido à produção de dois alcalóides em suas raízes, a emetina, e a cefalina muito utilizados pela indústria farmacêutica.



FIGURA 1. Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. LAVRAS, UFLA, 2002.

A ipeca, originária do Brasil, tem distribuição disjunta nas florestas tropicais nos países da América Central e América do Sul. Por se tratar de uma planta que só prospera sob determinadas condições ecológicas, tipicamente tropicais, é extremamente difícil cultivá-la fora de seu habitat natural (WILSON, 1930).

As primeiras tentativas de se cultivar a ipeca se deram na Malásia, Ceilão e Índia, com plantas de origem brasileira propagadas no Royal Botanical Garden de Kew, em Londres, no início do século XIX (PINTO 1972).

O cultivo a nível comercial teve êxito na Índia e Malásia; no comércio mundial as plantas cultivadas nestes dois países são conhecidas por ipecacuanha de Johore (COSTA, 1978).

ASSIS & GIULIETTI (1999), destacam a existência de dois tipos de ipeca ou ipecacuanha: a Brasileira, originária do Brasil e cuja espécie é a *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, e a ipecacuanha de Cartagena, originária da Colômbia e Venezuela, pertencente à espécie *Cephaelis acuminata* Karsten, segundo GATTONI (1960). Porém, TORRES (1972), citado por ASSIS & GIULIETTI (1999) referem-se a ipecacuanha da Colômbia com o nome de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.

As raízes das plantas cultivadas no Índia e na Malásia possuem menor concentração dos alcalóides de interesse. Já as raízes das plantas obtidas no Brasil apresentam as maiores concentrações destes alcalóides, seguidas das plantas provenientes da Colômbia (ADDOR, 1945; ASSIS & GIULIETTI, 1999).

Desta forma, YOSHIMATSU, AOI & SHIMOMURA, 1993, relatam que o suprimento de ipeca no mercado tem, como fonte principal, o extrativismo de plantas em estado silvestre. As plantas cultivadas na Índia e Malásia representam apenas uma modesta quantidade do total comercializado.

Durante as três últimas décadas, o extrativismo tem sido intensamente explorado no Brasil, tornando-se uma das principais fontes de renda em muitas cidades do interior do país, especialmente em estados como o Mato Grosso, Rondônia, Espírito Santo e Minas Gerais (SKORUPA & ASSIS, 1998). Em 1960, o Brasil chegou a exportar mais de 80 toneladas de raízes secas de ipeca, encontrando mercado principalmente na Europa. A exportação, no entanto, sofreu um decréscimo substancial devido a um extrativismo desordenado, associado ainda à devastação de florestas em virtude da expansão de cidades, rodovias e áreas cultivadas que resultaram em uma destruição gradativa do habitat natural da espécie. Entre 1980 a 1993 as exportações não excederam a quantidade de 7,5 toneladas/ano.

A exploração deste produto, a nível mundial, sempre dependeu da coleta extrativista em florestas tropicais, exceto na Índia e Malásia, onde o cultivo estabeleceu-se com um certo sucesso. A produção mundial, segundo SKORUPA & ASSIS (1998) é estimada em 100 toneladas anuais, sendo o oeste de Bengala, a Índia, o Brasil e a Nicarágua os maiores produtores.

A maior parte da produção é exportada sob a forma de planta seca ou de extrato obtido a partir das raízes, tendo como principais mercados à Alemanha, Espanha, França, Japão, Malásia, Portugal e Países Baixos (COSTA, 1995).

GATTONI (1960), citado por PINTO (1972), estima em 30 a 40 gramas de raiz seca, a produção de uma planta bem cultivada durante 3 anos, com raiz de 15 a 20 cm de profundidade, e com a média de 8 a 10 ramificações ou rizomas.

Segundo informações obtidas por PINTO (1972), o rendimento por planta, aos dois anos de idade, obtido em canteiros com cobertura de palha

cultivados em Cárceres - MS, no Posto Agropecuário do Ministério da Agricultura, foi de 37 gramas de raiz, com um teor de alcalóides de 2,11%.

Rendimentos de até 6,5 toneladas de raízes/ha podem ser alcançados em culturas com quatro anos de idade, devidamente adubadas e sob bons tratamentos culturais (PINTO, 1972). COSTA (1995), citando dados da CACEX de 1990, relata que o quilo da raiz seca da planta custava R\$ 16,48; enquanto que o quilo do extrato custava R\$ 242,87 em 1988. Em 1995, o custo do quilo da raiz no mercado interno estava em torno de US\$ 29,67.

Apesar do seu evidente potencial econômico, pouco se tem feito para se cultivar a ipeca no Brasil (SKORUPA & ASSIS, 1998). Os trabalhos realizados com a ipeca são, em sua grande maioria, relacionados a estudos químicos e farmacológicos (PINTO, 1972; SKORUPA & ASSIS, 1998; ASSIS & GIULIETTI, 1999).

Quanto a estudos relacionados ao caráter agrônomo, destacam-se trabalhos sobre enraizamento de estacas associados a aplicações de hormônios e adubações com micronutrientes.

Devido às suas características de planta essencialmente de sombra, alguns trabalhos relacionados à consorciação de ipeca com outras culturas de grande porte, como o cacau e a seringueira, trariam grande colaboração para o aumento de rentabilidade do agricultor por unidade de área cultivada (PINTO, 1972). No entanto estas informações ainda são escassas e rudimentares (SKORUPA & ASSIS, 1998).

Existem grandes lacunas na investigação da espécie, principalmente no que diz respeito à taxonomia, morfologia e conservação.

Estudos relacionados ao potencial da variabilidade genética em populações naturais, e a influência de fatores ambientais sobre a produtividade dos metabólitos de interesse são inexistentes. Ainda assim, o interesse pelo princípio ativo da planta, tem resultado em vários trabalhos relacionados a

micropropagação e produção dos metabólitos secundários *in vitro* no Brasil. LAMEIRA, COSTA & PINTO (1994), obtiveram sucesso na propagação *in vitro* da espécie. No entanto, são poucas as iniciativas que apontem para conservação da variabilidade genética da espécie, SKORUPA & ASSIS (1998). E tal situação, segundo ASSIS & GIULIETTI (1999), é muito preocupante uma vez que as populações naturais localizadas por trabalhos de prospecção encontram-se em áreas sob grande impacto ambiental, seja na Mata Atlântica, seja no sul da Amazônia. As populações são descontínuas e, geralmente, constituídas por poucos indivíduos.

Com relação à conservação da espécie, estão sendo mantidas coleções *in vivo* da planta em Belém do Pará, na área de sub-bosque do CPATU/EMBRAPA. Esta mesma coleção foi duplicada e está sendo mantida em Linhares no Espírito Santo, na reserva florestal Floresta Rio Doce (SKORUPA & ASSIS, 1998), e em Brasília, em casas de vegetação no CENARGEN/EMBRAPA, visando a manutenção e produção desse recurso natural.

2.1.2 Origem e distribuição natural

A ipeca é uma planta medicinal do sub-bosque de florestas tropicais úmidas, com distribuição disjunta no Brasil, Colômbia e América Central (ASSIS & GIULIETTI, 1999).

Pelos nomes ipeca, poaia e ipecacuanha são designadas várias espécies herbáceas, que possuem como característica comum à formação em suas raízes de dois alcalóides de grande valor farmacológico: a emetina e a cefalina. Estas espécies, nativas das regiões sombrias e úmidas das florestas tropicais, ocorrem em vários países da América Central, assim como no Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia e Guianas.

No entanto, a verdadeira ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae) tem como seu centro de origem o Brasil (PINTO, 1972)).

No Brasil, a ipeca encontra-se distribuída geograficamente no sul da Amazônia, nos estados de Rondônia e Mato Grosso, e ao longo da Mata Atlântica no nordeste (Pernambuco e na Bahia) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná).

2.1.3 Descrição botânica

A ipeca é um subarbusto pertencente à família das Rubiaceae, e que, de acordo com a descrição realizada por ASSIS & GIULIETTI (1999), apresenta comumente 50 cm de altura (figuras 1 e 2).

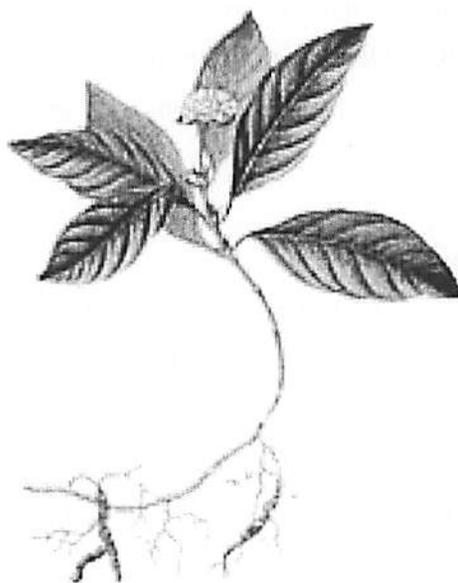


FIGURA 2. Detalhe das raízes de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes), onde estão contidos os princípios ativos. Adaptado de Costa, (1978). LAVRAS, UFLA, 2002.

Seus ramos aéreos, emitidos a partir dos nós em seu rizoma, são cilíndricos, tendo de 0,6 - 1,9 cm de diâmetro, e os entrenós de 0,2 a 7,0 cm de comprimento. Estes se apresentam prostrados ou eretos. As folhas são persistentes na parte superior dos ramos, ovais, elípticas e oblongas, 3,5 - 18,3 x 1,1 - 9,4 cm, ápice arredondado, agudo ou acuminado. Quanto à presença de acúmen, verifica-se que as populações do Brasil apresentam normalmente folhas sem acúmen ou com acúmen pequeno, medindo entre 0,1 - 0,3 cm nas plantas da Mata Atlântica, e 0,1 - 0,5 cm nas plantas da Floresta Amazônica.

A morfologia foliar, segundo o trabalho de ASSIS & GIULIETTI (1999), mostrou-se bastante variada, mas não se observou nenhuma correlação entre os padrões de morfologia foliar encontrados e a distribuição geográfica destes materiais.

A inflorescência terminal é envolvida por brácteas ovais, agudas e lobadas de coloração esverdeada, apresentam pedúnculo ereto ou deflexo com 1,2 a 3,5 cm de comprimento. As flores são hermafroditas sésses e estão presentes em um número de 12 a 150 por inflorescência. Apresenta-se nas cores creme ou branca, raramente vináceas. O ovário é bicarpelar, bilocular com 1 óvulo em cada lóculo. O fruto é do tipo baga, elíptico com 1,0 x 0,7 cm, apresentando epicarpo vermelho a vináceo. Contém duas sementes, retorcidas e de testa dura (ASSIS & GIULIETTI, 1999).

O rizoma cilíndrico, com desenvolvimento paralelo à superfície do solo emite a partir de seus nós, além dos ramos aéreos, as raízes. As raízes aneladas apresentam de 0,6 a 1,7 cm de diâmetro e chegam a 24 cm de comprimento, são amareladas ou esbranquiçadas quando frescas e acinzentadas quando secas. As raízes são fibrosas, possuindo cheiro fraco quando frescas e um sabor amargo e nauseante (COSTA, 1995).

Quanto ao número cromossômico, $n = 11$, KIEHM (1986) comenta que o número básico de cromossomos para *Psychotria* L é $x = 11$, e ainda para

Psychotria bissulcata, espécie originária da Índia, n = 11. Esses números, segundo ASSIS & GIULIETTI (1999) são concordantes com o número cromossômico encontrado para *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes no Brasil.

2.1.4 Sinonímia

A ipeca verdadeira apresenta a seguinte sinonímia científica: *Evea ipecacuanha* Standley, *Cephaelis ipecacuanha* Rich., *Cephaelis emética* Pers., *Uragoga ipecacuanha* Baill., *Callicoca ipecacuanha* Brot., *Psychotria emética* Vell., *Psychotria ipecacuanha* Mull. Arg. e *Ipecacuanha officinalis* Arr. Cam.

Vulgarmente é conhecida pelos nomes: ipeca, ipecacuanha anelada, ipecacuanha preta, poaia do mato, poaia cinzenta, poaia legítima, ipeca preta, ipeca do Mato Grosso, ipeca de Cuiabá, poaia do Brasil, raiz do Brasil, poaia das boticas, entre outros (COSTA, 1978).

2.1.5 Propagação

A ipeca pode ser propagada tanto de forma sexuada, por sementes, como de forma assexuada, através de fragmentos de raiz. Os trabalhos de cultivo realizados principalmente nas antigas colônias inglesas do Oriente forneceram informações importantes sobre os meios de propagação da espécie (PINTO, 1972).

Segundo PINTO (1972) a propagação por sementes não é muito utilizada em virtude da baixa e demorada germinação que se inicia de 3 a seis meses após o plantio. IKEDA et al (1988), relata que as plantas provenientes de sementes florescem após dois anos de cultivo.

A sua reprodução por fragmentos de raiz ainda não está totalmente dominada. Embora existam trabalhos relacionados a aplicações de hormônios e

adubações que favoreçam o pegamento dos fragmentos de raiz, (GATTONI (1960); KALYANASUNDARAN (1968)).

Outra alternativa para propagação da espécie está na cultura de tecidos, área na qual vários estudos estão sendo realizados no sentido de preservação dos recursos vegetais e produção em escala comercial de plantas de difícil propagação (RAO & LEI, 1982, citado por YOSHMATSU, AOI & SHIMOMURA, 1993). Em 1988, IKEDA *et al.* estabeleceram a propagação da ipeca a partir de segmentos nodais. E no Brasil, tem-se alcançado sucesso na propagação *in vitro* da espécie (LAMEIRA, COSTA & PINTO, 1994).

Além disto, a exigência da planta a determinadas condições ambientais e ecológicas faz dela uma planta de difícil cultivo. Sendo necessário um local sombreado coberto de árvores frondosas que lhe forneçam abrigo e abundante material vegetal em decomposição (COSTA, 1995).

A colheita da ipeca deve ser feita quando a planta atinge seu pleno desenvolvimento, o que ocorre em condições normais aos 3 ou 4 anos. Sendo possível, no entanto, antecipar este período para 1 ano sob regime de irrigação artificial (PINTO, 1972). A colheita realiza-se durante o ano todo, mas em particular na época da floração (COSTA, 1978).

2.1.6 Uso farmacológico

O uso farmacológico da ipeca está ligado à presença de dois alcalóides em suas raízes: a emetina, e a cefalina que conferem à planta um poder emético e amebicida (ASSIS & GIULIETTI, 1999). O emprego particular da ipeca é como emético, propriedade que se deve mais à cefalina que à emetina. Esta atividade resulta da excitação provocada no esôfago e estômago e transmitida ao bolbo provoca o vômito (COSTA, 1978).

Em doses reduzidas aplica-se como expectorante nas bronquites, asma, etc. para facilitar a eliminação das mucosidades dos brônquios.

A emetina exerce ação tóxica para vários microrganismos, em particular sobre a *Entamoeba histolytica*, o que torna o uso da ipeca e da emetina adequado nas disenterias amebianas (COSTA, 1978).

Os alcalóides produzidos nas raízes da ipeca ainda possuem propriedades irritantes para pele e mucosas, podendo provocar eritemas, pústulas, conjuntivite e crises de tosse e espirros. E ainda serem empregados na cura do alcoolismo.

COSTA (1978) recomenda doses diárias de 0,010 a 0,20 g como expectorante; 1 a 25 g como vomitivo e 4 a 8 g na disenteria.

2.1.7 Composição química das raízes

De acordo com COSTA (1978), diversas substâncias são encontradas nas raízes da ipeca: amido, açúcares, corpos gordos, resinas, saponósidos e um heterósido cristalino, o ipecósido; ácido málico e cítrico e um tanino, o ácido ipecacuânhico. Finalmente, os alcalóides que justificam as propriedades terapêuticas da planta: emetina, cefalina, psicotrina, o-metilpsicotrina, emetamina, e proto-emetina ou alcalóide A. Dentre os alcalóides citados, a emetina e a cefalina são os mais importantes.

Os alcalóides correspondem de 2 a 3% do peso seco das raízes, e estão localizados principalmente no parênquima cortical (2,5%), e em quantidades reduzidas na zona lenhosa (COSTA, 1978).

2.1.8 Emetina

O princípio ativo emetina faz parte do grupo dos isoquinolínicos dos alcalóides, originados a partir da condensação de moléculas do aminoácido tirosina (CLAUS & TYLER, 1968, citados por COSTA, 1995). A tirosina é um composto aromático sintetizado a partir do ácido chiquímico (CROCOMO, 1985).

YOSHIMATSU, AOI & SHIMOMURA (1993), observaram que a concentração de alcalóides presente nas raízes varia em função da época do ano, e da região onde se encontra a planta. Comparando a produção de alcalóides produzidos em um mesmo clone cultivado em duas regiões diferentes do Japão, Tanegashima e Tsukuba, verificaram que a concentração total de alcalóides nas raízes aumentou nos períodos de junho a dezembro em Tanegashima, enquanto que em Tsukuba decresceu apenas entre os meses de setembro e outubro.

A estrutura molecular dos compostos ácido chiquímico, tirosina, e emetina são mostrados na figura 3.

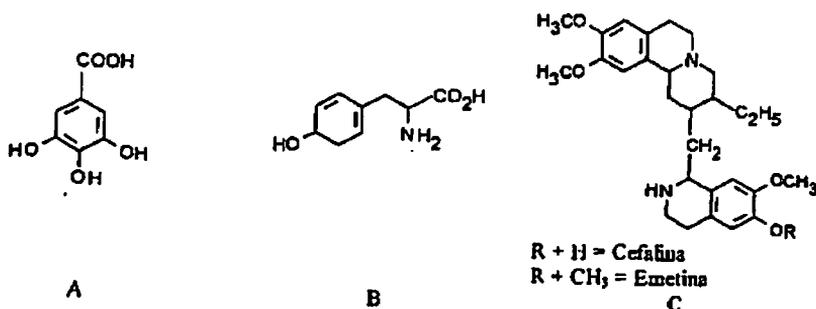


FIGURA 3. Estruturas químicas de (A) Ácido chiquímico, (B) Tirosina, e (C) Emetina. Adaptado de Costa, (1978).LAVRAS, UFLA, 2002.

2.2 Cultivo *in vitro* e plantas medicinais

O interesse pelas plantas medicinais vem sendo restabelecido nos últimos anos em função do resgate das diversas formas de medicina alternativa que tem como base à utilização de compostos provenientes de plantas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Além disso, tanto pesquisadores envolvidos no campo da biotecnologia, como as indústrias farmacêuticas que dependem de inúmeros compostos produzidos por plantas, tem voltado sua

atenção para o estudo das plantas medicinais. (ROUT, SAMANTARAY & DAS 2000).

Embora as plantas medicinais estejam distribuídas por diferentes ecossistemas do mundo inteiro, países como o Brasil, em função da sua condição tropical e maior diversidade biológica, abrigam uma grande riqueza de plantas medicinais. Principalmente nas regiões de floresta e cerrado. No entanto, o processo de devastação tem sido responsável pela perda desta variedade de espécies medicinais assim, muitas destas espécies encontram-se em vias de extinção. Companhias farmacêuticas dependem largamente de matérias primas provenientes de plantas que estão desaparecendo rapidamente devido à inexistência de formas de cultivo adequadas e da sua forma extrativista de obtenção.

Existe ainda o fato de que, muitas vezes, a parte da planta utilizada na sua propagação seja ela semente, ou qualquer outra parte da planta, no caso de propagação vegetativa, é justamente a parte que confere à planta algum valor medicinal. E isto, dificulta a sua propagação. É o caso da espécie *Holostemma annulare* (Roxb) K. Schum. que floresce apenas uma vez ao ano e apresenta baixa frutificação e para qual, é impraticável o uso de segmentos de raiz para sua propagação, devido aos altos preços alcançados no mercado e ao grande valor desses segmentos de raiz para medicina ayurvedica praticada na Índia (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

A cultura de tecidos de plantas é um método alternativo de propagação a nível comercial (GEORGE & SHERRINGTON, 1984) e pode ser utilizado na produção de mudas de um grande número de espécies medicinais. Além da rápida propagação, a cultura de tecidos vegetais também pode ser aplicada para conservação *in situ* de espécies raras e endêmicas de plantas de valor medicinal, o que é citado por vários autores.

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos para plantas medicinais está basicamente relacionada a micropropagação que se divide em três categorias. A mais utilizada delas gera plantas inteiras a partir do cultivo de gemas apicais ou axilares em meio de cultura sob condições assépticas. A segunda categoria baseia-se também no processo de organogênese indireta, na qual brotos adventícios são formados a partir de folhas, raízes ou segmento de caule. A terceira e última categoria é baseada no processo de organogênese direta, em que são originadas a partir de calos. Este sistema é teoricamente mais eficiente quando se estabelece uma forma de obtenção (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

2.2.1 Micropropagação

A micropropagação de várias espécies vegetais, incluindo várias espécies medicinais, pode ser encontrada descrita por vários autores em inúmeros trabalhos realizados nas últimas duas décadas. Do ponto de vista prático, a propagação, a partir de meristemas, não apresenta grandes dificuldades técnicas, e garante a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta matriz. Através de micropropagação de plantas medicinais tem-se alcançado uma rápida proliferação de mudas a partir do cultivo de gemas apicais e axilares.

Inúmeros fatores influenciam no sucesso da propagação *in vitro*, havendo peculiaridades inerentes às diversas espécies. Desta forma, seria imprudente generalizar uma metodologia para o processo.

2.2.2 Meios de cultivo

Na cultura *in vitro*, células, tecidos ou órgãos são isolados do organismo e cultivados em condições assépticas, num meio de cultura cuja composição física e química é perfeitamente conhecida. Estas culturas são tratadas

adequadamente através de um balanço nutricional e hormonal, estabelecendo-se condições ambientais bem controladas.

A composição variável da mistura dos componentes do meio determina o êxito da iniciação e do desenvolvimento da organogênese até a obtenção de microplantulas (CAMBRONY & SNOECK, 1983).

Embora existam várias formulações de meio de cultura utilizadas para o cultivo *in vitro* de plantas medicinais, a mais comum é a formulação descrita por MURASHIGE & SKOOG (1962) (Meio MS), sendo citada em inúmeros trabalhos e freqüentemente com algumas modificações. Entre outras formulações de sais utilizadas como meio básico para o cultivo *in vitro* de plantas medicinais estão o meio de Gamborg (B5), o meio WPM, e o meio NN para promover embriogênese somática em *Carica pubescens* Lenné et Kock, (JORDAN & VELOZO, 1995). A maior diferença destes meios está na quantia e forma de nitrogênio, e nas quantidades relativas de alguns macroelementos.

A porcentagem de regeneração e multiplicação de brotos é particularmente alta para o meio MS quando comparado a vários outros meios de cultura. GAO et al. (1999), ao compararem o efeito de quatro meios de cultura diferentes (MS-Murashige & Skoog; B₅ - Gamborg et al.; SH - Schenk and Hildebrandt; e 67-V - meio 67-V) para multiplicação de *Fritillaria unibracteata*, verificaram que a taxa de multiplicação na presença do meio MS foi significativamente alta em relação aos demais meios de cultura.

A obtenção de uma alta taxa de multiplicação também depende do subcultivo dos brotos regenerados *in vitro*. No caso de cultivos prolongados, os nutrientes do meio de cultura vão se exaurindo gradativamente, e ao mesmo tempo, a umidade no interior dos frascos também decresce, permitindo o ressecamento do meio de cultura. O subcultivo também reduz os efeitos da competição entre os brotos em desenvolvimento pelos nutrientes do meio. ROUT et al. (1999) demonstraram um aumento significativo na taxa de

multiplicação dos brotos no subcultivarem plântulas de *Plumbago zeylanica* em intervalos de 4 semanas.

Um meio nutritivo consiste basicamente dos macro e micro nutrientes, vitaminas, fitorreguladores e um de carboidrato como fonte de carbono, sendo que outros suplementos orgânicos podem vir a ser utilizados.

Os macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S são necessários par todas as espécies de plantas, no entanto, a concentração de cada um destes elementos pode variar bastante em função da espécie. Embora as células vegetais em cultivo possam crescer na presença de nitratos apenas, o pH do meio (5,0 - 6,0) fica normalmente mais estável quando estão presentes no meio de cultura tanto íons de nitrato como de amônia, suprindo a fonte de nitrogênio, desta forma os resultados serão melhores. Os micronutrientes são exigidos pelas células vegetais em pequenas quantidades e incluem o Fe, Mn, Zn, B, Cu, Cl, Mo e Ni.

O ferro normalmente é adicionado na forma de quelato, permitindo assim que não haja a sua precipitação e uma melhor absorção.

Quanto às fontes de carbono, são vários os carboidratos que se prestam a este fim. No entanto, a sacarose aparece como a principal fonte de carboidratos utilizada para o cultivo *in vitro* de plantas medicinais. As concentrações de sacarose no meio de cultura variam normalmente de 2 a 3%. Para induzir a formação de calos a partir de hipocótilos e segmentos de raiz de *Withania somnifera*, RANI & GROVER (1999), utilizaram 1% de sacarose em meio básico MS.

Além de servirem como fonte de carbono, os carboidratos têm um papel importante na regulação osmótica, mantendo o potencial osmótico do meio o que permite a condução dos nutrientes para as células e tecidos em desenvolvimento.

Plantas inteiras estão aptas a sintetizar as vitaminas necessárias ao seu desenvolvimento. No entanto, a adição de vitaminas específicas ao meio de

cultura, incluindo a tiamina (B₁), o ácido nicotínico (B₃), piridoxina (B₆) e mio-inositol normalmente é necessária. Embora as células em cultivo sejam capazes de sintetizar todos os aminoácidos requeridos ao seu desenvolvimento, a adição de L-glutamina, L-cisteína, L-prolina e L-tirosina ou uma outra fonte de aminoácidos como a caseína hidrolisada ao meio de cultura pode vir a incrementar o crescimento celular. Dentre os agentes que promovem a geleificação do meio, o agar é sem dúvida, o mais utilizado. Dentre outros agentes geleificantes podem ser citados o gelrite e a agarose (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

2.2.2.1 Nitrogênio

Depois da sacarose, os minerais constituem o grupo mais importante de nutrientes para o desenvolvimento *in vitro* (NANNETTI, 1994). Estes minerais presentes no meio de cultura estão divididos em dois grupos: os macroelementos, dentre os quais está incluído o nitrogênio; e os microelementos. Embora o meio básico normalmente utilizado na fase de multiplicação seja o MS, vários trabalhos têm mostrado que para determinadas espécies, pode haver problemas de toxidez ou outros problemas fisiológicos em função da riqueza deste meio em sais (SATO, 1994). GEORGE & SHERRINGTON (1984), ressaltaram que os macronutrientes do meio MS podem servir de base para formulação de outros meios, soluções mais diluídas podem ser mais adequadas em algumas circunstâncias. SATO (1994), estudou o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio sobre a propagação de três diferentes clones de gérbera de vaso, e concluiu que a concentração de 60mM de N (MS completo), inibe a regeneração dos brotos. Enquanto que a utilização de concentrações diluídas favorece a indução dos brotos. No entanto, para cada um dos clones existe uma diluição diferente da concentração de N do meio MS que apresenta melhores resultados.

Todos os componentes de um meio de cultura podem afetar a morfogênese *in vitro* todavia recentemente, as atenções têm se voltado para o nitrogênio e, em especial, ao nitrogênio reduzido (AMMIRATO,1985). O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). A suplementação do meio quanto as fontes nitrogenadas na maioria das vezes é através de íons NH_4^+ e NO_3^- . A maioria das plantas preferem NO_3^- ao NH_4^+ e, em alguns casos o oposto, para tanto é necessário encontrar o balanço certo de NO_3^- : NH_4^+ para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SATO,1994).

O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de cultura de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo também a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, tais como cenoura, fumo, roseira e várias outras espécies (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999). No entanto, há espécies que não crescem bem com nitrato no meio. Quando o nitrato é a única fonte de nitrogênio, o nitrito pode ser acumulado no meio e tornar-se tóxico devido a baixa atividade da enzima redutase de nitrito.

A utilização do nitrato pelas células depende da atividade da enzima redutase de nitrato, que reduz nitrato a nitrito, e em seguida, a amônia, por meio da atividade da redutase de nitrito. A redutase de nitrato mostra atividade *in vitro* (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

Quando o nitrogênio é fornecido somente na forma de sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez. BESPALHOK, VIEIRA & HASHIMOTO (1992) estudaram a influência da concentração de nitrato de amônia na indução de brotos em *Stevia rebaudiana* e constataram que a concentração de nitrato de amônia do MS é tóxica. Obteve maior indução de brotações usando $\frac{1}{4}$ de nitrato de amônia no meio MS.

Tanto o incremento de matéria seca, como os processos de crescimento celulares estão intimamente relacionados à absorção e conversão de nitrogênio em matéria orgânica. TADESSE, LOMMEN & STRUIK (2000), ao estudarem o efeito da ação de diferentes concentrações de nitrogênio em diferentes cultivares de batata, verificaram que baixas doses de nitrogênio promoveram um incremento inicial da área foliar das plântulas formadas, mas ocasionaram efeitos relativamente negativos no aumento da área foliar das plantas durante a aclimação. WITJAKSONO et al. (2000), concluíram que para abacate uma concentração de nitrogênio total de 40 mM em meio MS é ideal para promover o desenvolvimento dos explantes.

Uma combinação das duas formas de nitrogênio, amônio e nitrato, estimulam o crescimento de muitas espécies de plantas *in vitro*, de modo que a toxidez do amônio não é absoluta. Segundo CALDAS & CALDAS (1976), a mesma concentração de amônia que é inibitória quando a concentração de nitrato é baixa, permite um bom crescimento quando se aumenta a concentração de nitrato. A razão entre as concentrações parece ser fator determinante do crescimento, sendo que a de amônio deve ser, no máximo, um terço da do nitrogênio total.

A toxidez do amônio às células diminui ou desaparece quando ele é usado como única fonte de nitrogênio na forma de sal de um ácido orgânico (GAMBORG & SHYLUK, 1970).

Em cenoura, além do efeito estimulante do amônio sobre o crescimento, foi observada também que para embriogênese somática ocorre uma dependência do nitrogênio nesta forma (HALPERIN & WETHERLL, 1965). A importância de íons de amônio para o desenvolvimento de plântulas de orquídea também é enfatizada por vários autores (NANNETTI, 1994). O íon NH_4^+ *in vitro* é essencial para o desenvolvimento de protocórmios em orquídeas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

O fornecimento de nitrogênio reduzido pode abaixar o requerimento de citocininas. SARGENT & KING (1974), determinaram que células de soja são dependentes de citocinina quando cultivadas em meio contendo nitrogênio na forma NO_3^- , mas independem de citocinina quando o íon NH_4^+ estiver presente.

O nitrito é uma outra forma de nitrogênio inorgânico testada para o cultivo *in vitro*. No entanto, embora tenha sido estudada para poucas culturas, parece ser tóxica de um modo geral (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

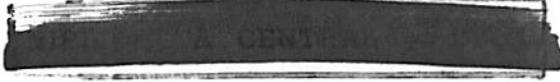
As formas orgânicas de nitrogênio utilizadas em cultura de tecidos incluem misturas complexas de compostos nitrogenados como caseína hidrolisada e extrato de levedura (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

2.2.3 Reguladores de crescimento

Um meio mínimo sem a adição de hormônios raramente serve de veículo para suportar um crescimento de tecidos normais. Substâncias estimulantes de crescimento podem ser supridas na forma de complementos naturais como a água de coco que contém auxinas, citocininas, giberilinas e açúcares-álcool como o mioinositol (KRIKORIAN, KELLY & SMITH, 1987).

O tipo e concentração dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura direcionam o desenvolvimento do explante e determinam o sucesso do cultivo. Os processos de enraizamento, brotação, ou diferenciação a partir de calos estão intimamente ligados à concentração relativa entre as auxinas e citocininas presentes no meio de cultura (ROUT et al, 1999). Um alto valor para relação auxinas: citocininas favorece um crescimento acelerado e a formação de calos indiferenciados (MURASHIGE, 1962).

O grupo das auxinas é amplamente empregado na micropropagação, promovendo crescimento de calos e regulando a morfogênese, especialmente em associação com citocininas (GUEVARA, 1987). Possui capacidade de induzir o alongamento das células, e a ação sobre o crescimento celular dá-se pelo



estímulo do crescimento de brotos ou folhas, dependendo das concentrações utilizadas (FORNI, 1993). Segundo MURASHIGE (1974), as auxinas diferem significativamente em estabilidade, eficácia e influência sobre a organogênese. Dentre as auxinas, as mais comumente empregadas são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido 3- indoleacético (AIA), o ácidoindolbutírico (AIB), e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Um levantamento realizado por HU & WANG (1983), revela que apenas 40% dos meios de isolamento para o início de um cultivo *in vitro*, contém auxina em sua constituição. E desses meios, 51% utilizaram ANA; 27% AIB; 22% AIA; e 6% 2,4-D.

As giberelinas auxiliam o alongamento de brotos, mas, geralmente, não favorecem o processo de organogênese. Sua inclusão é pouco freqüente em vista de um suprimento endógeno suficiente (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999). Foi levantado que 17% dos meios de isolamento continham giberelinas em sua composição, já na fase de multiplicação apenas 12% dos meios continham giberelinas, segundo HU & WANG (1983).

As citocininas formam um outro grupo de reguladores de crescimento muito importante para o cultivo *in vitro*. Na fase de estabelecimento de um processo de micropropagação, este grupo de reguladores de crescimento não só é favorável como necessário para o desenvolvimento do explante. A citocinina no meio de cultura é indispensável para o desenvolvimento de gemas neoformadas (FORNI, 1993). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que em geral, apresenta melhores resultados.

A maioria dos explantes *in vitro*, ao contrário do que ocorre com as giberelinas, não sintetiza citocininas suficientes para permitir um crescimento contínuo. Segundo HU & WANG (1983), que estudaram cerca de 100 espécies em fase inicial de estabelecimento *in vitro*, constataram que o BAP é utilizado em 68% dos meios, a cinetina 23%, o 2-ip e a zeatina em 9% dos meios.

O uso de citocininas estimula o desenvolvimento da parte aérea, mas em altas concentrações as citocininas podem ser prejudiciais, na fase de multiplicação pode causar toxidez, caracterizada por entufamento e falta de alongamento dos brotos formados, encurtamento dos entrenós, engrossamento dos caules e vitrificação generalizada (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999).

A presença das citocininas é um fator essencial para multiplicação de várias plantas medicinais. Dentre as citocininas, a 6-benziladenina (BA), também chamada de benzilaminopurina (BAP), é uma das mais empregadas para estimular a formação de brotos. SUDAH *et al.* (1998) verificaram que o BA aplicado isoladamente ao meio MS estimulou a formação de brotos a partir de meristemas apicais e axilares de *Holostema annulare*. No entanto, para obter o mesmo resultado para segmentos nodais, foi necessário suplementar o meio com ácido α -naftalenoacético (NAA), que favoreceu o alongamento dos brotos gerados, tanto a partir de meristemas, como de segmentos nodais. Para espécie *Phythomorpha umbellata*, segmentos foliares inoculados em meio suplementado apenas com BA ou NAA não apresentaram resposta. Quando inoculados em meio contando com uma combinação destes dois reguladores, os segmentos foliares apresentaram proliferação de brotos (PEREIRA *et al.*, 2000).

ECHEVERRIGARAY *et al* (2000) mostrou que para segmentos foliares de *Anthemis nobilis* também é necessária à combinação dos reguladores BA e NAA. Das várias combinações destes dois reguladores, os meios MS suplementados com 1.0 mM a 4,5 mM de BA e 1,0 mM de NAA favoreceram efetivamente a formação de múltiplos brotos. No entanto, uma concentração de 18,0 mM de BA ocasionou o problema de vitrificação dos explantes. O fenômeno da vitrificação associada a altas concentrações de BA, também foram relatadas por SUDHERSAN (1998) em *Enicostemma axillare*; e por Pereira *et al.* (2000) em *Pothomorphe umbellata*. Segundo KEVERS, COUMANS & COUMANS-GILLES (1984) as citocininas, assim como o nitrogênio, podem

estar relacionadas ao processo de vitrificação, principalmente quando usadas em excesso.

O ácido giberélico (GA_3) numa concentração de $0,2 \text{ mg l}^{-1}$, associado a 10 g l^{-1} de sacarose em meio MS/4 suplementado com $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de BA, além de promover o alongamento dos brotos, suprimiu o processo de vitrificação em segmentos foliares de *Pothomorphe umbellata* (PEREIRA *et al.* 2000). Além do GA_3 , a suplementação do meio MS com $1,1 \text{ mM}$ l de ácido 1-indole-3 acético (AIA) também promoveu um aumento no alongamento dos brotos de *Maytenus ilicifolia*, obtidos a partir de gemas axilares (PEREIRA *et al.*, 2000). Outras citocininas podem ser utilizadas para promover a proliferação de brotos. Sendo normalmente necessária a inclusão de baixas concentrações de auxinas para otimizar a taxa de formação e alongamento destes brotos. REDDY, GOPALAND & SITA (1998), trabalhando com a espécie *Gymnema sylvestre* conseguiram o número máximo de brotos por explantes quando suplementaram o meio MS com 5 mg/l de BAP e $0,2 \text{ mg/l}$ de NAA.

2.3 Marcadores Genéticos

Os descritores morfológicos foram a principal ferramenta usada por naturalistas para identificação, descrição e classificação dos seres vivos (MÜHLEN, MARTINS & ANDO, 2000). Até meados dos anos 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Entretanto, pelo fato dos marcadores morfológicos ocorrerem em número reduzido, a sua utilização nem sempre oferece vantagem (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). Além disto, os marcadores morfológicos podem estar fortemente sujeitos à influência das condições ambientais. Os efeitos ambientais mascaram os efeitos genotípicos, fornecendo uma medida imprecisa do genótipo da planta.

Além dos marcadores morfológicos, outros tipos de marcadores também permitem o estudo comparativo de genótipos. Sendo inclusive, mais eficientes em função das limitações apresentadas pelos marcadores morfológicos e por isso, muito mais utilizados. Com o desenvolvimento dos marcadores isoenzimáticos, seguidos do advento das técnicas modernas de biologia molecular, que possibilitaram o surgimento de métodos variados para detecção de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, o número de marcadores genéticos disponíveis aumentou significativamente. Ganhando potencialidade de aplicação para todas as espécies vegetais (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

De acordo com DUARTE (1998), nas últimas décadas a técnica de eletroforese de proteínas foi bastante utilizada no estudo da variação genética tanto de plantas como de animais. No entanto, apesar da sua eficiência se comparado a marcadores morfológicos, o nível de polimorfismo para marcadores isoenzimáticos é baixo para várias espécies e por isso foram gradualmente substituídos por marcadores moleculares.

Com o conhecimento de enzimas de restrição foi possível o desenvolvimento da classe dos marcadores moleculares, que atualmente, agrupa diversas técnicas que podem fornecer um número ilimitado de marcadores altamente polimórficos para qualquer organismo vivo. Segundo WILLIAMS et al. (1990), esta classe de marcadores oferece a vantagem de identificar um grande número de polimorfismo, de não apresentar efeito pleiotrópico, não ser influenciada pelo ambiente, e poder ser analisado em qualquer estágio de desenvolvimento do organismo.

A princípio, os marcadores moleculares permitiram a análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA (Restriction Fragments Length Polymorphism – RFLP) (GRODZICKER *et al.*, 1974; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Segundo FERREIRA &

GRATTAPAGLIA (1998), o RFLP constituiu uma das técnicas de marcadores moleculares mais utilizadas em genética e melhoramento de plantas. Tendo como característica básica à comparação de fragmentos de DNA baseada na homologia de seqüência. Este método consiste, resumidamente, em se cortar o DNA em sítios específicos utilizando para isto enzimas de restrição, são produzidos desta forma milhares de fragmentos sendo alguns destes identificados por sondas complementares. Apesar da confiabilidade do método e de sua ampla utilização, o marcador RFLP apresenta desvantagens como o requerimento de grandes quantidades de DNA e principalmente de ser uma técnica trabalhosa que demanda muito tempo para análise, FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998).

Com o desenvolvimento de marcadores baseados em PCR (Polimerase Chain Reaction), o que se deu no final da década de 80 devido aos esforços de Kary Mullis (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988), a biologia molecular sofreu grandes avanços. A técnica de PCR consiste na amplificação, *in vitro*, de fragmentos de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de seqüência conhecida e complementares as extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA alvo em ciclos repetidos. A reação de PCR é realizada em um termociclador, que fornece as temperaturas e respectivos tempos adequados para os processos de desnaturação da molécula de DNA, separação das fitas complementares, anelamento dos *primers*, e a extensão do DNA, o que ocorre a cada ciclo de replicação. Estes ciclos são repetidos de 25 a 40 vezes, o que permite a iniciação do processo com quantidades mínimas de DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2.3.1 Marcadores RAPD

A técnica de RAPD, baseada em amplificação de fragmentos de DNA por PCR, foi inicialmente descrita de forma independente por dois grupos de

pesquisadores (WILLIAMS *et al.*, 1990 e WELSH & MC CLELLAND, 1990) recebendo denominações diferentes: RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), e APPCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), (MÜHLEN, MARTINS & ANDO, 2000).

As versões são diferentes nos detalhes técnicos mas iguais nos seus fundamentos. A técnica é bastante simples e leva pouco tempo para ser realizada. Consiste na utilização de iniciadores de síntese inespecíficos em uma reação de PCR, para que ao acaso dentro de cada genoma uma ou mais seqüências desconhecidas e completamente aleatórias sejam amplificadas (JEZOVSEK, 1995). Os fragmentos amplificados são separados, segundo o seu tamanho e carga, por meio de eletroforese em meio semi-sólido (normalmente gel de agarose) e visualizados após o gel ter sido corado, na maior parte das vezes com brometo de etídeo, com auxílio de luz ultravioleta.

Os *primers* utilizados possuem composição arbitrária, e podem ter homologia total ou parcial com uma ou mais regiões no genoma. O seu pareamento com o DNA molde direciona a ação da DNA polimerase para o trecho contíguo à região de homologia. A grande maioria dos *primers* usada é de 10 nucleotídeos e os que tem produzido polimorfismo em plantas, possuem de 50 a 80% de guanina mais citosina (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 2001).

Uma das vantagens da técnica de RAPD, é o fato de não ser necessário o conhecimento prévio da seqüência a ser estudada. Os marcadores RAPD são fundamentados na variação natural existente na seqüência do DNA, e tem sido bastante utilizado no estudo de diversidade genética (CASTELLEN, 2000).

Os marcadores RAPD se comportam como marcadores genéticos dominantes. O conceito de dominância neste caso refere-se apenas a forma de interpretação do gel analisado. Enquanto um genótipo homozigoto (aa) é identificado pela ausência de banda, os genótipos homozigoto dominante (AA) e o heterozigoto (Aa) são identificados pela presença de bandas, não sendo

possível distinguir um do outro. Isto porque, um indivíduo diplóide homozigoto para aquele loco RAPD possui dois “alelos” RAPD idênticos (AA) a partir dos quais a amplificação ocorre. Já o indivíduo com este mesmo loco RAPD em heterozigose (Aa) possui um “alelo” (A) que é amplificado resultando também na presença de banda (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Um ponto importante nesta classe de marcadores é a alteração dos resultados em função das condições do PCR. WILLIAMS *et al* (1990) realizaram um estudo detalhado a respeito dos fatores que ocasionam estas alterações. Dentre estes fatores destacam-se a concentração de $MgCl_2$, de DNA molde e de nucleotídeos na solução; temperatura de anelamento; tipo de termociclador; composição e comprimento dos *primers* (MÜHLEN, MARTINS & ANDO, 2000). A observação de certos limites para estes fatores pode auxiliar na uniformização de condições que contribuam para repetibilidade dos dados.

2.3.2 Avaliação da diversidade genética por meio de marcadores RAPD

Uma das maiores dificuldades para conservação e manejo racional das espécies vegetais tropicais, é a carência de informação sobre os níveis e a organização da variabilidade genética em populações naturais e bancos de germoplasma, já que a estrutura genética de uma população determina sua capacidade de resposta à seleção tanto natural como artificial (BAWA & ASHTON, 1991). Desta forma, a caracterização da variabilidade genética é uma dos primeiros passos para que se possa organizar um programa de conservação ou melhoramento de qualquer espécie vegetal (NEGI, SINGH & LAKSHMIKUMARAN, 2000).

A avaliação da diversidade genética por marcadores moleculares apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos, pois, além de identificarem grande polimorfismo, não apresentam interação entre caracteres, podendo ainda, ser avaliados em qualquer estágio de desenvolvimento

(WILLIAMS *et al.*, 1990). Dentre os diferentes tipos de marcadores moleculares, o marcador RAPD que utiliza um *primer* de seqüência arbitrária para amplificar simultaneamente fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, apresenta características que o tornaram muito utilizado na investigação de diversidade genética (MOREIRA, 1999). Dentre estas características estão simplicidade, acessibilidade, baixo custo e a ampla disponibilidade de *primes*.

XAVIER (2001), mostrou em seu estudo de avaliação da divergência genética em clones de eucalipto que os marcadores RAPD foram eficientes, detectando 85,6 % de polimorfismo e permitindo o agrupamento dos clones com diferentes níveis de divergência em cinco grupos diferentes. HOSOKAWA *et al* (2000), mostraram a eficiência dos marcadores RAPD na distinção de três espécies medicinais dentro do gênero *Swteilaria*. O dendograma apresentado mostrou de 61 a 77 % de similaridade entre as espécies .

Segundo CASTELLEN (2000), quando o objetivo do estudo é avaliar a diferenciação entre acessos, populações e subespécies a utilização de isoenzimas ou RAPD gera resultados bem próximos. Isso foi verificado no estudo de HEUN *et al* (1994), que analisaram a diferenciação de acessos de *Avena sterelise* obtiveram resultados similares entre isoenzimas e RAPD. O mesmo ocorreu para a espécie *Allium sativum* no trabalho realizado por MAAB & KLASS (1995).

O que se tem notado, é que ultimamente vários estudos para detecção de variabilidade genética têm sido realizados através de metodologias variadas como as isoenzimas, o RFLP e o RAPD. Em geral, o resultado das análises por isoenzimas e RFLP tem mostrado alta repetibilidade, mas, em contrapartida, tem revelado baixos níveis de polimorfismo. Já para o método RAPD, ocorre o contrário: alto nível de polimorfismo e baixa repetibilidade dos resultados (HOSOKAWA *et al.*, 2000). A técnica de RAPD, no entanto, apresenta uma

série de vantagens em relação aos demais métodos que tornam o seu uso bastante viável. Dentre estas vantagens estão a rapidez, baixo custo e o requerimento de pouco material vegetal. O marcador RAPD tem sido utilizado para diversos gêneros e espécies possuidoras de propriedades medicinais.

2.3.3 Coeficientes de similaridade usados em estudos com marcadores RAPD

A visualização dos relacionamentos entre dois indivíduos é possibilitada por várias técnicas de análise multivariada, que tem o coeficiente de similaridade/ dissimilaridade como ponto de partida (DUARTE, 1998). É grande o número de coeficientes de similaridade que tem sido propostos (KRZANOWSKI, 1988).

Os coeficientes de similaridade mais simples são aqueles relacionados a variáveis dicotômicas, onde cada variável possui apenas dois valores. Marcadores do tipo RAPD são binários, estando incluídos nesta categoria de variável. Para estes marcadores, as quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas baseadas na presença (1) ou ausência (0) de um marcador para cada genótipo conforme a tabela 1.

TABELA 1: Presença (1) e/ou ausência (0) de bandas em cada par (ij) de linhagens. UFLA, Lavras, 2002.

Linhagem j	Linhagem i	
	1	0
1	a (1,1)	b (0,1)
0	c (1,0)	D (0,0)

A partir dos padrões de coincidência ou não coincidência das variáveis na comparação de dois genótipos, vários coeficientes de similaridade tem sido propostos (DUARTE, 1998). Neste trabalho será utilizado o coeficiente de Sorensen-Dice, também conhecido por coeficiente de Nei e Li (MUMM & DUDLEY, 1995). Segundo JACKSON, SOMERS & HARVEY (1989), os resultados das análises de agrupamento e a ordenação podem ser influenciados de acordo com o coeficiente que é empregado. Considerando isto, DUARTE (1998) estudou oito coeficientes de similaridade, nas subseqüentes análises de agrupamento e ordenação de 27 cultivares de feijão analisados por marcadores RAPD, e concluiu que dentre os coeficientes estudados o de Sorensen-Dice, ou coeficiente de Dice, é o mais adequado para o estudo de divergência genética utilizando marcadores RAPD.

2.3.4 Análise de agrupamentos

Para se ter informações relativas a cada par de tratamentos, considerando n indivíduos, são estimadas $n(n-1)/2$ medidas de similaridade/dissimilaridade. Quando n é um número elevado torna-se muito difícil o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual das estimativas.

A análise de agrupamento tem como objetivo propor uma estrutura classificatória a partir de métodos aglomerativos, permitindo assim separar um grupo original de observações em vários subgrupos de forma que haja homogeneidade dentro e heterogeneidade entre grupos (CRUZ, 1990).

Dois etapas são envolvidas no processo de agrupamento. De acordo com CRUZ (1990), são as etapas de estimativa de uma medida de dissimilaridade entre indivíduos a serem agrupados; e a adoção de uma técnica de agrupamento visando a formação de grupos.

Os métodos hierárquicos são divididos em aglomerativos, procedentes de uma série de sucessivas fusões, e os divisíveis, procedentes de sucessivas divisões. Os processos aglomerativos dividem-se em dois métodos principais: O de otimização e o hierárquico. Para o método de otimização são formados subgrupos não vazios e mutuamente exclusivos entre si, sendo o proposto por Tocher o mais utilizado (RAO, 1952; DUARTE, 1998). Para o método hierárquico a estrutura classificatória formada, é representada através de um gráfico em forma de árvore denominado dendograma, que simplifica bastante os processos de classificação, comparação e discussão de agrupamentos biológicos (REGAZZI, 1998).

As delimitações dos grupos podem ser definidas por meio de exame visual do dendograma. Estabelecendo-se cortes em certos pontos do dendograma, definem-se os grupos e os seus respectivos números de indivíduos. Isto constitui uma das dificuldades de utilização do método hierárquico devido a arbitrariedade na escolha destes pontos de corte, que segundo CRUZ (1990), devem evidenciar pontos de alta mudança de nível.

Segundo DIAS (1998), em estudos de divergência com marcadores moleculares, um dos métodos mais utilizados na construção de dendogramas é o da média aritmética entre pares não ponderados, comumente referido como UPGMA (“Unweighted Pair-Group Means Arithmetics”), que foi o mais efetivo na representação de relacionamentos genéticos (MUMM e DUDLEY, 1994; DIAS, 1998). Também chamado método do grupo médio (“Group average method”) ou método da ligação média (“Average linkage method”) este é o tipo de agrupamento no qual a distância entre dois “clusters” é a média da distância entre os pares possíveis de indivíduos, um de um grupo e um de outro (KOTZ & JONHSON, 1985).

Existem diversos trabalhos na literatura que utilizaram métodos de agrupamento com a finalidade de estudar a divergência genética por meio de

marcadores binários. Como LASHERMES et al. (1996) com café; IRWIN *et al.* (1998) com *Colocasia scutellata*; NEGI, SINGH & LAKSHMIKUMARAM (2000) com a espécie medicinal *Withania somnifera*; BESSE *et al.* (1998) com cana-de-açúcar. Todos utilizando UPGMA.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOR, A.A. Considerações acerca da poaia. **Boletim do Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, v.34, p1-28, 1945.

AMMIRATO,P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A; SHARP, W.R.; AMMIRATO,P.V.;YAMADA,(c/eds.).**Handbook of plant cell culture**. New York: Mcmillan Publishing, 1985.v.1, p.83-123.

ASSIS, M.C. GIULIETTI, A. M.; Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha”- *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.22, n 2, p.205-216, ago. 1999.

BAWA, K.S.; ASHTON, P.S. Conservation of rare tree in tropical Rain Forests: a genetic perspective. In : FALK, D.D.& HOLSIGER, K.E. (eds.) **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 62-71.

BESPALHOK, J. C. Fº; VIEIRA, L. G. E., HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação in vitro de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.4, n.1, p. 159-161, jul., 1992.

BESSE, P.; TAYLOR, G.; CARROLL, B.; BERDING, N.; BURNER, D.; MC INTYRE, C.L.. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. **Genetica**, Dordrecht, v. 104, n.2, p.143-153, 1998.

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.2, p.111-116, 1976.

CAMBRONY, H.D. & SNOECK J., Hormones et regulateurs de croissance dans les cultures de caféiers et de cacaoyers. *Café, Cacao, Thé*. Paris, v27, n.2, p.113-119, avr./juí, 1983.

CASTELLEN, M. da S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia Leilocarpa* Engl.** Piracicaba: ESALQ/USP. 2000. 76p. (Dissertação de Mestrado).

COSTA, A. F. *Farmacognosia* Vol. II. Fundação Calouste-Gulbenkian, Lisboa, 1978.

COSTA, M. P. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard.) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação.** Lavras: UFLA. 1995. 61p.il. (Dissertação de Mestrado).

CROCOMO, O. J. Assimilação do nitrogênio pelas plantas. In: FERRI, M. G. *Fisiologia Vegetal*. 2. ed. São Paulo: E. P. U, 1985. v. 1, p. 181-212.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: ESALQ/ USP, 1990.188p (Tese de Doutorado).

DIAS, L.A. dos SANTOS. **Análises multidimensionais.** In: ALFENAS, A C. (ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins, fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.* Viçosa: UFV, 1998. p.405-473.

DUARTE, J. M.; **Estudo da divergência genética em raças de feijão por meio de marcadores RAPD.** Lavras: UFLA, 1998.78p.:il.(Dissertação de Mestrado).

ECHEVERRIGARAY, S.; FRACAR, F.; ANDRADE, L.B.; BIASIO, S.; ATTI-SERAFINI, L. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.60, p.1-4, 2000.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998. 220p.

FORNI, R. C. **Níveis de “MS”, BAP, número de gema do explante e período de repicagem na produção de brotos, folhas e matéria seca e, níveis de 2,4-D e cinetina para tamanho e fenótipo dos calos de *Coffea arábica* L. cv. Catuaí**

Vermelho CH 2077-2-5-44. Lavras: ESAL, 1993. (Dissertação de Mestrado em Fitotecnia).

GAMBORG, O L.; SHYLUK, J. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, Rockville, v.45, n.5, p.598-600, may, 1970.

GAO, S.L.; ZHU, D.N.; CAI, Z.H.; JIANG, Y.; XU, D. R. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant- *Fritillaria unibracteata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.59, n. 3, p.197-201, 1999.

GARCIA, E. S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B. et alii. **Fitoterápicos**. In: Workshop-Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. Campinas. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa "André Tosello", 17p. 1996.

GATTONI, L. A. A raiz da ipecacuanha. **A fazenda**, New York, v. 55, n.12, p16-18, 1960.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. In: **Plant Propagation by Tissue Culture**. Exetics Ltd., Eversley, England, p. 39-71, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. eds. **Cultura de Tecidos e Transformações Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPB, 1998.

GRODIZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Plainview, v.39, p. 439-446, 1974.

GUEVARA, A. E.. Reguladores de crescimento. In: **Curso de Cultura de Tejidos**, Turrialba, Costa Rica, p.58-79, 1987.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D. F. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. **Nature**, London, v. 205, n. 4970, p 519-520, Jan., 1965.

HEUN, M.; MURPH, J.P.; PHILIPS, T.D. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterelis* L. accessions. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v.87, n.6, p698-696, 1994.

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; KAWAHARA, K.; NAKAMURA, I.; SHIBATA, T. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. **Planta Medica**, New York, v.66, n.3, p.270-272, Apr., 2000.

HU, C.Y.; WANG, P.J.; Meristem, Shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. ed. **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, v.1, p.177-227, 1983.

IRWIN, S.V.; KAUFUSI, P.; BANKS, K.; de la PEÑA; CHO, J. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. **Euphytica**, Wageningen, v.99, n.3, p.183-189.1998.

IKEDA, K.; TESHIMA, D.; AOYAMA, T.; SATAKE, M.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n.4, p. 288- 29, June, 1988.

JACKSON, D. A.; SOMERS, K.M., HARVEY, H.H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? **The American Naturalist**, Chicago, v.133, n.3, p.436-453, Mar.1989.

JESOVSEK, G.K. **Utilização de marcadores moleculares na caracterização de espécies do Gênero *Cassia***. Jaboticabal: FCAVJ/UNESP, 1995. 67p.(Dissertação de Mestrado).

JORDAN, M.; VELOZO, J.; Improvement of somatic embryogenesis in highland- papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.44, n.3, p.189-193, mar., 1995.

KALYANASUNDARAM, S. Effect of boron and indole-butyric acid on rooting of ipecac root cuttings. **Madras Agriculture Journal**, Coimbatore, v.56, n. 12, p. 812-820, dec, 1968.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, n.1, p.69-74, Jan, 1984.

KIEHN, M. Kariostematic studies on Rubiaceae: chromosome counts from Sri Lanka. **Plant Systematic Evolution**, Vienna, v.154, n.3-4, p.213-223, 1986.

KOTZ, S.; JONSHON, N.L. UPGMA clustering method. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N.L. *Encyclopedia of statistical sciences*. New York: J. Wiley, 1985. v.9, p.423-524.

KRIKORIAN, A. D.; KELLY, K.; SMITH, D. L. hormones in tissue culture and micropropagation. In: Daris, p.j; ed. **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. New York, p.591-613, 1987.

KRZANOWSKI, W.J. **Principle of multivariate analysis. A user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988.563p.

LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P.; PINTO, J. E. B. P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p. 523-526, jun. 1994.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBERS, M. C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. **Euphytica**, Dordrecht, v.87, n.1, p59-64, 1996.

MAAB, H.L.; KLASS, M. Intraespecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isoenzymes and RAPD markers. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v.91, n.1, p89-81, july, 1995.

MÜHLEN, G. S; MARTINS, P.S.; ANDO, A.; Variabilidade genética em etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n.2, p. 319-328, abr./jun.2000.

MULLIS, K. & FALLONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase catalyzed chain Reaction. **Methods Enzimology**, San Diego, v.55, p. 335-350, 1987.

MUMM, R.H.; DUDLEY, J.W.; A classification of 148 U.S. maize inbreds : I. Clusters analysis based on RFLPs. **Crop Science**, Madison, v.34, n.4, p.842-851, july/aug.1994.

MURASHIGE, T. Plant propagation throught tissue cultures. **Annual Review 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. *Physiology Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NANNETTI, D.C.; **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p.:Il (Dissertação de Mestrado).

NEGI, M.S.; SINGH, A.; LAKSHMIKUMARAN, M. Genetic variation and relationship among and within *Withania* species as revealed by AFLP markers. *Genome*, Ottawa, v.43, n.6, p.975-980, dec., 2000.

PEREIRA, A M. S.; BERTONI, B.W.; APPEZZATO - da- GLÓRIA, B.; ARAUJO, A R.B.; JANUÁRIO, A H.; LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Photomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.60, n.1, p.47-53, 2000.

PINTO, C. M.D. **A ipecacuanha – Revisão bibliográfica.** Centro de Pesquisa do Cacau, 24p, 1972.

RAMALHO, M. A P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C.A. B. P. **Genética na Agropecuária.** Ed. UFLA, 2001. 2ed.

RANI, G.; GROVER, I.S. In vitro callus induction and regeneration studies in *Withania somnifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.57, n.1, p.23-27, 1999.

RAO, R. C. **Advanced statistical methods in biometric research.** New York: J. Wiley, 1952. 390p.

REDDY, S.P.; GOPAL, G. R.; SITA, G.L.; In vitro multiplication of *Gymnena sylvestre* R. Br. – An important medicinal plant. *Current Science*, Bangalore, v.75, n. 8, p. 843-844, Oct., 1998.

REGAZZI, A.J. Análise multivariada. In: ENCONTRO MINEIRO DE GENETICISTAS, 5, Viçosa, 1998. *Anais Viçosas: Sociedade Brasileira de Genética Regional*, 1988., p.55.

ROUT G.R.; DAS, P., Techniques of micropropagation *in vitro*. In: Bose, T.K.; MITRA, M.K.; SADHU, M.K; DAS, P. editors. **Propagation of Tropical and Sub-tropical Horticultural Crops**. Calcutta: Kalyani Publishers, p 105-116.1997.

ROUT, G.R.; SAMARANTAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 18, n.2, p. 91-120, Apr., 2000.

ROUT, G.R.; SAXENA, C.; SAMARANTAY, S.; DAS, P. Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. **Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 1, p. 1-4. May, 1999.

SAIKI, R.K.; GELFOND, D.H.; STOEFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, B.T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermo stable DNA Polymerase. **Science**, London, v.239, n. 4893, p.487-491, Jan, 1988.

SARGENT, P. A.; KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.52, n.7, p.1747 – 1755, 1974.

SATO, A. Y. **Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras: UFLA, 1994. 95p.(Dissertação).

SEIDL, P. The use of biodiversity for sustainable development: Investigation of bioactive products and their commercial applications. Nov. 25. 1993. Manaus, AM, Brazil (Proceeding of a Workshop), **Braz. Chem. Assoc.**, Rio de Janeiro. 1994.

SERRA, A.G.P. **Análises bioquímicas de calos e estudos da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. Lavras: UFLA, 1999. 72p. (Dissertação – Fisiologia Vegetal).

SKORUPA, L. A.; ASSIS, M.C.; Collecting and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. **Economic Botany**, New York, v.52, n.2, p209-210, Apr/ June, 1998.

SOUZA,M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A .; et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: EUFC. 416p. 1991.

SHUDA, C.G.; KRISHNAN, P.N.; PUSHANGADAN, P. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) k. Schum., a rare medicinal plant. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Largo, v.33, n.1, p.57-63, Jan. -Mar, 1998.

SUDHERSAN, C. Shoot bud regeneration from leaf explants of a medicinal plant: *Enicostemma axillare*. **Current Science**, Bangalore, v.79, n.12, p.1099-1100, June, 1998.

TADESSE , M.; LOMMEN; W. J. M.; STRUIK, PC Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.1, p.59-67, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. 2v. (864p.); il. 1998.

XAVIER, K. G. **Divergência genética em clones de *Eucalyptus* avaliados por marcadores RAPD, e variações nas propriedades da madeira**. Lavras: UFLA, 2001. 107 p. Il. (Dissertação de Mestrado).

WELSH, J.; Mc CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A .R.; LIVAK, K.J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov., 1990.

WILSON, J.R.S. A ipecacuanha – seus caracteres botânicos. **La Hacienda**, Kissimmee, v.25, n.1, p.25, Jan., 1930.

WITJKSONO, B., A. S.; ANGEL, M. C.; RICHARD, E. L.; PAMELA, A., M. avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Largo, v.35, n.2, p.238-244, may-june. 2000.

YOSHIMATSU, K.; SHIMOMURA, K. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. **Plant Cell Reports**, New York. V.9, n.10, p.567-570, Feb, 1991.

YOSHIMATSU, K.; AOI, K.; SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): Characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v.144, n.1, p 22-25, july, 1993.

CAPÍTULO 2

Divergência genética entre acessos de ipeca, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes., baseada em marcadores RAPD

1 RESUMO

Lima, Patrícia Schober Gonçalves. **Divergência genética entre acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) por meio de marcadores RAPD.** Lavras: UFLA, 2002. 83p. (Dissertação – mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de plantas).

O objetivo deste trabalho foi analisar a divergência genética entre 46 acessos de ipeca provenientes do Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental. A análise de agrupamento das similaridades foi feita através do método UPGMA gerando um dendograma por meio do programa NTSYS-pc 2.0, utilizando-se o coeficiente de Nei-Li. A similaridade máxima observada foi de 99% entre os acessos 695 e 838, e 695 e 595, sendo considerados geneticamente iguais entre si. E a menor similaridade encontrada foi de 24% entre os acessos 607 e 690. A análise do dendograma mostrou que houve a formação de alguns grupos formados por acessos geneticamente iguais entre si. Desta forma, os acessos 602, 837 e 719; os acessos 696, 808, 839, 695, 595, 838, 707 e 753; e os acessos 814 e 746 podem ser duplicatas. Ainda assim, a maioria dos acessos mostrou-se geneticamente diferente entre si. Foi verificado também através de um teste de correlação entre as distâncias geográficas e distâncias genéticas, que a divergência genética para os 46 acessos de ipeca não está correlacionada à distribuição geográfica dos mesmos. Os resultados obtidos forneceram informações úteis ao direcionamento de coleta de germoplasma e definição de uma estratégia de conservação e utilização do mesmo.

2 ABSTRACT

Lima, Patrícia Schober Gonçalves. **Genetic divergence among ipecac accesses (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) by RAPD markers.** Lavras: UFLA, 83p. (Dissertation – Plant Genetic and Breeding).

The purpose of this research was analyse the genetic divergence among 46 accesses of ipecac originating from ipecac germplasm bank of Embrapa-Amazonia Oriental. The clustering analyses of similarities were made by UPGMA method producing a dendogram by NTSYS-pc 2.0 program, using Nei – Li coefficient. The greatest similarity observed was 99% between 695 and 838, and 695 and 595 accesses, they are considered genetically equal amongst themselves. And the smaller one was 24% between 607 and 690 accesses. The dendogram analyses showed that occurred some clusters formation, indicating that the accesses 602, 837 and 719; the accesses 696, 808, 839, 695, 595, 838, 707 and 753; and the accesses 814 and 746 are equal amongst themselves, may be duplicates. In spite of this, the majority of the accesses are genetically different. It was checked through a correlation test between genetic and geographic distances, that the genetic divergence of 46 accesses is not correlated with the geographic distances of them. The obtained results gave useful informations to define a conservation strategy and germoplasm use.

3 INTRODUÇÃO

A ipeca, originária do Brasil, tem distribuição disjunta nas florestas tropicais dos países da América Central e América do Sul. Por se tratar de uma planta que só prospera sob determinadas condições ecológicas, tipicamente tropicais, é extremamente difícil cultivá-la fora de seu habitat natural (WILSON, 1930).

Ainda assim, trata-se de uma espécie passível de se adequar a um sistema de cultivo economicamente viável, a exemplo do que ocorreu na Índia.

[REDACTED]

No entanto, o intenso extrativismo das populações naturais, aliado à redução de suas áreas de ocorrência natural, torna iminente a realização de trabalhos que quantifiquem e analisem os níveis de variabilidade e estrutura genética de populações de espécies que, como no caso da ipeca, apresentem potencialidade econômica, mas ainda não têm definido um sistema de cultivo economicamente viável.

Os marcadores de DNA como o RAPD, pela sua simplicidade e capacidade de identificar polimorfismo genético, destacam-se como uma ferramenta importante para amostrar a diversidade genética de populações naturais ou cultivadas para fins de conservação (TINGEY, RAFALSKI e WILLIAMS, 1992; GRATAPAGLIA et al., 1992). Desta forma, este trabalho busca estimar a diversidade genética de 46 acessos de ipeca provenientes do banco de germoplasma da Embrapa-Amazônia Oriental-CPATU através da técnica de RAPD, a fim de auxiliar a sua conservação e cultivo sustentado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

Todo o trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Material genético

Foram utilizados neste trabalho 46 acessos de ipeca provenientes do banco de germoplasma da espécie localizado na unidade Embrapa-Amazônia Oriental/CPATU. A identificação dos acessos, assim como seu local de coleta, pode ser observado na tabela 3.

TABELA 3. Identificação e local de coleta dos acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes).LAVRAS, UFLA, 2002.

Local de coleta	U.F.	Acessos
Barra dos Bugres	MT	602,719, 690, 695.
Mirassol	MT	595.
Tangará da Serra	MT	700, 701, 702.
Pontes e Lacerda	MT	707,708.
V. B. S. Trindade *	MT	712,714.
Costa Marques	MT	612, 826, 827, 828, 829, 833, 834, 835, 836, 837, 838,839.
Rolim de Moura	RO	776, 801, 802, 803, 807, 808, 810, 811, 814, 815.
Salto do Céu	MT	571, 694.
Novo Horizonte	RO	845.
Rio Branco	MT	760.
Cacoal	RO	816,819.
Cerejeiras	RO	845.
Linhares	ES	760
Porciúncula	RJ	745, 746.
Caratinga	MG	751, 753.

* Vila Bela da Santíssima trindade

Em função da dificuldade de obtenção de folhas jovens dos acessos, foram utilizadas como fonte de extração de DNA, raízes primárias coletadas diretamente das plantas do banco de germoplasma. Assim que foram retiradas,

as raízes foram identificadas pelo número do acesso a que pertenciam e acondicionadas em sacos plásticos. Estes sacos plásticos foram acondicionados em caixa de isopor para o transporte de Belém até Lavras, seguido de acondicionamento em freezer – 80°C por um período de um mês e após foi feita a extração de DNA.

4.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita por meio do procedimento de macroextração com poucas modificações, isto é: foram utilizados cerca de dois gramas de raízes primárias, que foram lavadas em solução de PVP (polivinilpirrolidona) a 10% e, em seguida maceradas em 1000 µl de tampão de extração com CTAB a 65°C juntamente com 200µl de β-mercaptoetanol em um almofariz. O tampão de extração contém 2% de CTAB, 100 mM de TRIS (pH 8,0), 20mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% de PVP (polivinilpirrolidona). O material macerado foi colocado em tubos eppendorf de 1,5 ml ocupando um volume de aproximadamente um terço do tubo. Adicionou-se de 600 µL a 800 µL de CTAB a 65°C por eppendorf, deixando-os em banho-maria a 65°C por 60 minutos e mexendo-os a cada 5-10 minutos. Após retirar os tubos do banho-maria, adicionou-se a cada um deles 500mL de clorofórmio-álcool-isoamílico (CAI-24:1). Os eppendorfs foram agitados levemente durante 5-10 minutos, sendo em seguida centrifugados por 12 minutos a 12400rpm. O sobrenadante foi então coletado e colocado em novos tubos eppendorfs. Aos quais foi adicionado etanol absoluto gelado, até o enchimento completo do eppendorf. Homogeneizou-se lentamente. Os eppendorfs foram novamente centrifugados por 12 minutos a 12400rpm, descartando-se em seguida o etanol. Foram feitas lavagens rápidas com 300mL de etanol gelado: primeiramente a 75%, em seguida a 90% e, por último, com etanol a 100%. Os eppendorfs foram

colocados para secar invertidos sobre papel toalha; tomou-se o cuidado de não deixar que o DNA secasse demais. O DNA foi então ressuspendido em 100mL de TE, sendo deixado durante a noite fora da geladeira. Após este período, foi guardado em geladeira. Adicionou-se 1mL de RNase (1mg/ml), deixando-o em seguida por 30 minutos em estufa a 37°C ou 2 horas a temperatura ambiente. Após este processo o material foi quantificado, usando-se o fluorímetro Hoeffler Scientific TKO100 e diluído para a concentração de 10 ng/μl.

4.4 Reação RAPD

A reação de RAPD foi preparada em volume de 10 μl, de acordo com o procedimento utilizado por NIENHUIS et al. (1995) com modificações. Cada mistura de reação continha: 20 ng de DNA genômico, 100 μM de cada um dos desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 μM de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1,2 unidades da enzima Taq DNA polimerase, 50 mM de TRIS (pH 8,3), 20 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 5 μg. μl⁻¹ de BSA, 0,25% de Ficol 400, 10 mM de tartrazine e água pura, totalizando 10 μl.

As reações foram realizadas em tubos capilares de vidro, em um termociclador refrigerado a ar (Idaho Technology, Idaho Falls, Idaho). O termociclador foi programado para 40 ciclos, seguindo as seguintes condições: nos dois primeiros ciclos, 60 segundos para a desnaturação, a 91°C, 7 segundos para anelamento do primer a 42°C e 70 segundos para elongação a 72°C. Os 38 ciclos seguintes diferiram dos dois primeiros, apenas em relação ao tempo de desnaturação, que passou para 1 segundo.

Após a amplificação, os produtos da reação foram separados por eletroforese em gel de agarose, a 1,2% em tampão TBE (0,45 M Tris-Borato e 0,01 M EDTA), a 70 volts, durante 4 horas, corados com brometo de etídio a

uma concentração de 0,5 µg/ml, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne e fotografados com câmara digital.

Foram utilizados 28 primers decanucleotídeos adquiridos junto a Operon Technologies (Califórnia, EUA). As bandas polimórficas foram classificadas como fracas, médias ou intensas, baseando-se na resolução e grau de amplificação por meio de avaliação visual. Apenas as bandas consideradas médias ou intensas foram incluídas na análise.

4.5 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas

Durante a avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi tratada como um carácter único. Foi elaborada uma matriz de 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de 102 bandas polimórficas, presentes nos 46 acessos. A estimativa da similaridade genética (SG_{ij}), entre cada par de acessos, foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da seguinte expressão (ROHLF, 1992):

$$SG_{ij} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Sendo os significados de a, b e c apresentados na Tabela 1.

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (ROHLF, 1992).

Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a seguinte expressão modificada de SKROCH, TIVANG E NIENHUIS (1992):

$$\text{Erro padrão estimado: } (SSG) = \sqrt{SG_{ij} \times \frac{1 - SG_{ij}}{(1 - n)}}$$

Em que n é o número total das combinações a, b e c cada par de acessos.

A análise de agrupamento das similaridades foi feita através do método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendrograma, por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (ROHLF, 1992).

Os acessos geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os acessos são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade (S_{gm}). O S_{gm} foi estimado por meio do teste de t, no nível de 1% de probabilidade, utilizando-se a seguinte expressão.

$$S_{gm} = 1 - (t \times S \bar{s}_g)$$

Onde t é o valor tabelado de t com n-2 graus de liberdade e Ssg o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de RAPD

Para este estudo foram utilizados 29 iniciadores, que geraram pelo menos uma banda polimórfica em um total de 102 para os 46 acessos de ipeca estudados (Tabela 1).

TABELA 4. *Primers* que detectaram polimorfismo para ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes), com suas respectivas seqüência de bases e número de bandas polimórficas. LAVRAS, UFLA, 2002.

<i>Primer</i>	Bandas polimórficas	<i>Primer</i>	Bandas polimórficas
OPB-14	2	OPN-04	3
OPC-05	6	OPN-09	5
OPC-08	1	OPN-13	2
OPD-08	4	OPQ-20	4
OPD-11	2	OPU-20	3
OPD-20	1	OPX-12	4
OPE-07	5	OPX-17	2
OPF-16	2	OPW-09	3
OPH-20	2	OPW-10	2
OPI-03	6	OPW-15	5
OPK-15	3	OPY-04	1
OPL-10	4	OPY-05	4
OPL-11	9	OPAC-14	1
OPM-01	5	OPAC-19	11
Total			102

O número médio de bandas polimórficas por iniciador foi de 3,4; não foram encontrados na literatura dados a respeito deste número para a espécie. No entanto, em acessos silvestres de *Coffea arabica*, espécie pertencente a mesma família que a ipeca, foram selecionados 12 *primers* polimórficos que geraram de 1 a 15 bandas polimórficas (LASHERMES et al., 1999). Dentre os 29 *primers* selecionados para a ipeca, o número de bandas polimórficas por primer variou de 1 até 11.

Quanto ao número de bandas necessárias para avaliação de divergência genética, as 102 encontradas situam-se dentro do número recomendado por vários autores para diversas espécies. MOREIRA (1999) utilizou em seu estudo de variabilidade genética de um banco de germoplasma de aroeira (*Myracrodurum urundeuva*- Anacardiaceae) por meio de marcadores RAPD, 83 bandas polimórficas. Para diferenciação de três espécies do gênero *Scutellaria*, 92 bandas polimórficas de RAPD foram suficientes (HOSOKAWA et al., 1999). E para análise da variabilidade genética de etnovarietades de mandioca por meio de diferentes marcadores de DNA, foram utilizadas 87 bandas por meio de RAPD (MÜHLEN, MARTINS E ANDO, 2000).

5.2 Avaliação da similaridade genética

Com base nas 102 bandas polimórficas obtidas, foi construída uma matriz de similaridades genéticas por meio do coeficiente de similaridade de Nei e Li. Para avaliar a diversidade genética entre os 46 acessos de ipeca, foram levadas em consideração as regiões geográficas de coleta dos acessos. Assim, foram evidenciadas três regiões principais, sendo que a primeira incluiu todos os acessos provenientes do estado de Rondônia; a segunda incluiu os acessos provenientes do estado do Mato Grosso; e a terceira região, os acessos provenientes da região Sudeste do Brasil, incluindo os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais. O número de acessos coletados por região é de 20 para o estado de Rondônia, 21 para o estado do Mato Grosso, e apenas 5 para todos os estados da região Sudeste. Pelo fato do número de acessos coletados na região Sudeste ser muito pequeno, pode-se concluir que a amostra analisada não representa bem a região que apresenta extensão geográfica igual ou maior que as outras duas regiões de coleta.

Para uma melhor visualização da divergência genética entre as plantas, foi construído um dendograma apresentado na figura 4.

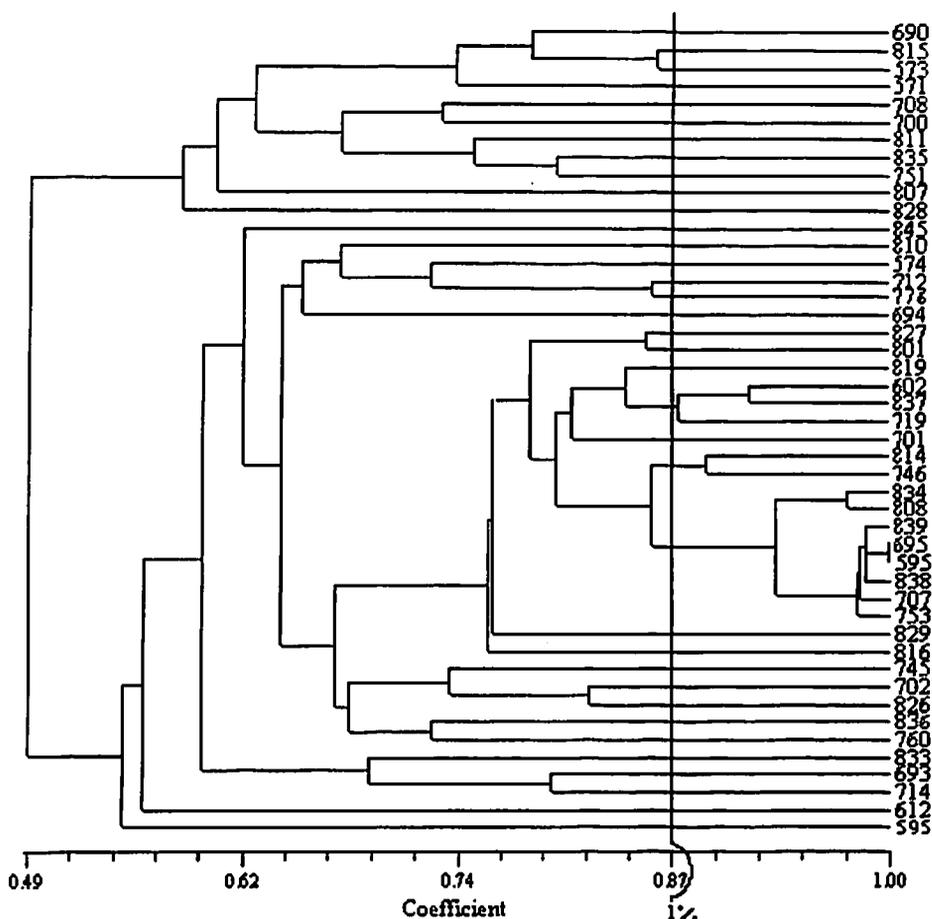


FIGURA 4. Dendrograma das distâncias genéticas entre os acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes), obtido pelo método UPGMA. LAVRAS, UFLA, 2002.

A linha de corte representa o valor máximo significativo de similaridade (sg_m), acima do qual os acessos são considerados semelhantes. Os resultados de similaridade sugerem que os acessos 602, 837 e 719 são geneticamente iguais, assim como os acessos 834, 808, 839, 695, 595, 838, 707 e 753, e os acessos 814 e 746, podendo ser duplicatas. Ainda assim, quase a totalidade dos acessos é

geneticamente diferente entre si. Entretanto, deve-se considerar que o parentesco avaliado pelo RAPD inclui regiões genômicas que não codificam.

A similaridade genética média foi de 62,33 %. A partir das similaridades genéticas obtidas, foram construídas duas tabelas contendo os 10 pares de acessos mais similares, e os 10 pares de acessos menos similares, sendo também evidenciadas nas tabelas, as regiões de origem destes acessos. A tabela 5 mostra o conjunto dos acessos mais similares entre si, enquanto que a tabela 6 mostra o conjunto dos acessos mais distantes.

De acordo com a tabela 5, a menor similaridade genética obtida foi de 24% estando entre os acessos 595 e 690, ambos do Estado do Mato Grosso.

TABELA 5. Similaridade genética dos 10 pares de acessos das plantas de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) menos similares. LAVRAS, UFLA, 2002.

Acessos	Localização	Similar.
595/690	Mirassol (MT) / Barra dos Bugres (MT)	0,24
701/807	Tangará da Serra (MT) / Rolim de Moura (RO)	0,27
602/708	Barra dos Bugres (MT) / Pontes e Lacerda (MT)	0,28
819/807	Cacoal (RO) / Rolim de Moura (RO)	0,29
701/708	Tangará da Serra (MT) / Pontes e Lacerda (MT)	0,29
819/700	Cacoal (RO) / Tangará da Serra (MT)	0,30
829/690	Costa Marques (RO) / Barra dos Bugres (MT)	0,31
829/807	Costa Marques (RO) / Rolim de Moura (RO)	0,31
819/708	Cacoal (RO) / Pontes e Lacerda (MT)	0,33
602/700	Barra dos Bugres (MT) / Tangará da Serra (MT)	0,33

Observa-se também que, entre os 10 pares de acessos mais distantes, nenhum dos acessos se encontra na região Sudeste.

A tabela 6 mostra que a maior similaridade obtida foi de 99%, quando se compararam os acessos 695 e 838 coletados nos Estados de Mato Grosso e Rondônia respectivamente. E entre os acessos 695 e 595 ambos coletados no estado do Mato Grosso. Observa-se também que o acesso 753, coletado no Estado de Minas Gerais da região sudeste é bastante próximo a acessos provenientes do estado de Mato Grosso (595 e 695), e Rondônia (838). No entanto, quando foi considerada a distância entre os acessos 753 e 751, os dois coletados no município de Caratinga, MG, esta é bem maior (55%).

TABELA 6. Similaridade genética dos 10 pares de acessos das plantas de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) mais similares. LAVRAS, UFLA, 2002.

Acessos	Localização	Similar.
695/838	Barra dos Bugres (MT) / Costa Marques (RO)	0,99
695/595	Barra dos Bugres (MT) / Mirassol (MT)	0,99
838/595	Costa Marques (RO) / Mirassol (MT)	0,98
838/707	Costa Marques (RO) / Pontes e Lacerda(MT)	0,98
838/753	Costa Marques (RO) / Caratinga (MG)	0,98
595/753	Mirassol (MT) / Caratinga (MG)	0,98
595/707	Mirassol (MT) / Pontes e Lacerda(MT)	0,98
695/707	Barra dos Bugres (MT) / Pontes e Lacerda (MT)	0,98
695/753	Barra dos Bugres (MT) / Caratinga (MG)	0,98
839/695	Costa Marques (RO) / Barra dos Bugres (MT)	0,98

Observando os acessos coletados na região Sudeste, pode-se verificar que quando comparados entre si, muitas vezes apresentam maior distância genética do que quando comparados com acessos de regiões geográficas distantes. É o caso dos acessos 745 e 746 coletados no município de Porciúncula, RJ; entre eles existe uma similaridade de 65%. No entanto, verifica-se que a similaridade genética entre os acessos 746, de Porciúncula, com os acessos 801 ou 816, ambos coletados em Rondônia, têm uma similaridade genética de 77 e 89% respectivamente, indicando maior similaridade. O mesmo ocorre com o acesso 745 e demais acessos da região Sudeste. Levando em consideração a distância geográfica entre a região Sudeste e os estados de Mato Grosso e Rondônia, conclui-se que a divergência genética para os 46 acessos de ipeca não está correlacionada à distribuição geográfica dos mesmos.

Considerando-se o teor de emetina presente nas raízes de cada um dos acessos e relacionando-os com os seus respectivos locais de coleta (tabela 3A, anexo A), também se pode observar que não existe nenhuma relação entre o teor do princípio ativo e a região de coleta. Assim como, não existe correlação entre o teor do princípio ativo e a similaridade genética entre os acessos.

Para confirmar esta hipótese, utilizou-se um teste de correlação entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas. O valor de correlação obtido foi de $r = -0,018$, sendo não significativo, e indicando que não existe correlação entre as distâncias genéticas e distâncias geográficas. Deve ser destacado que o intenso processo de devastação da Mata Atlântica pode dificultar a obtenção de um número de amostras representativo para a região Sudeste, mostrando que nesta região a espécie está sob maior risco de extinção do que as populações da região Amazônica. ASSIS & GIULIETTI (1999) relatam que as populações de ipeca normalmente se encontram em áreas sob grande impacto, seja na Mata Atlântica, seja no Sul da Amazônia. Destacam que as populações localizadas são descontínuas e, geralmente, formadas por poucos indivíduos. Apesar das várias

expedições de coleta realizadas, a espécie não foi mais coletada em Pernambuco, onde a última coleta foi em 1925. No estado de São Paulo a última coleta é de N. Santos, em 1940, e no Paraná, a última coleta foi de P. Dusén, em 1911 (ASSIS & GIULIETTI, 1999).

Segundo CRUZ (1990), as trocas de germoplasma de várias espécies entre pesquisadores e instituições causam perda de individualidade e ocorrência de tipos particulares nas regiões em virtude da interferência humana. Em função dos resultados obtidos, supõe-se que isto pode ter ocorrido para alguns dos acessos da região Sudeste, como por exemplo, para o acesso 753, coletado no município de Caratinga (MG).

De acordo com ASSIS e GIULIETTI (1999), que realizaram um estudo de diferenciação morfológica e anatômica em populações de ipeca distribuídas pelas regiões de Mato Grosso, Rondônia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e Pernambuco, além de várias regiões da América Central, houve poucas diferenças individuais a nível morfológico anatômico, mas que estas poucas diferenças não estão relacionadas com a distribuição geográfica das populações examinadas, confirmando os resultados de RAPD.

Para aroeira, uma análise de Coordenadas Principais baseada na similaridade genética estimada com 83 marcadores RAPD mostrou que não existem agrupamentos definidos entre indivíduos por área de coleta (MOREIRA, 1999). Para guaranazeiro, NASCIMENTO et al. (2000) concluiu que uma pequena divergência genética entre os clones estudados pode ter sido ocasionada pela não correlação entre a diversidade genética e a diversidade geográfica para a espécie, justamente o contrário do que ocorreu para ipeca, e o que talvez possa justificar a suposição de que alguns clones de ipeca coletados na região Sudeste possam estar ali em função de introduções através da interferência humana.

6. CONCLUSÕES

Os marcadores RAPD foram eficientes na separação dos acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes), não evidenciando a formação de grupos de acordo com os locais de coleta, e identificadas possíveis duplicatas de acessos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, M.C. GIULIETTI, A. M.; Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha"- *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.22, n 2, p.205-216, ago. 1999.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: ESALQ/ USP, 1990.188p (Tese de Doutorado).

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; KAWAHARA, K.; NAKAMURA, I.; SHIBATA, T. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. *Planta Medica*, New York, v.66, n.3, p.270-272, Apr., 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; CHAPARRO, J., WILCOX, P.; MCCORD, S.; WERNER, D.; AMERSON, H.; MCKEAND, S.; BRIDGWATER, F.; WHETTEN, R.; O'MALEY, D.; SEDEROFF, R. Mapping in woody plants with RAPD markers applications to breeding in forestry and horticulture. In: **Proceedings of the Symposium of Applications of RAPD Technology to plant Breeding**. 1992. CSSA/ ASHS/ AGA. P37-40.

LASHERMES, P.; TROUSLOT, P.; ANTHONY, F.; COMBERS, M. C.; CHARRIER, A. Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, Dordrecht, v.87, n.1, p59-64, 1999.

MOREIRA, A. M.M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urundeuva*- Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA.** Piracicaba: ESALQ/USP, 1999.60p. (Dissertação de Mestrado- Ciências Florestais).

MÜHLEN, G. S; MARTINS, P.S.; ANDO, A.; Variabilidade genética em etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n.2, p. 319-328, abr./ jun.2000.

NASCIMENTO F^o, F.J.; ATROCH, A L.; SOUSA, N. R.de; GARCIA, T. B.; CRAVO, M. S.; COUTINHO, E. F. Divergência genética entre clones de guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p. 501-506, mar., 2000.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima beans (*Phaseolus lunatos* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p. 300-306, Mar., 1995.

ROHLF, F.J. **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sistem.** New York, 1992. 470p.

TINGEY, S. V.; RAFALSKI, J.A; WILLIAMS, J.G.K; Genetic analysis with RAPD markers. In: **APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING**, Minneapolis, 1992. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992, p.3-8.

WILSON, J.R.S. A ipecacuanha – seus caracteres botânicos. **La Hacienda**, Kissimmee, v.25, n.1, p.25, Jan., 1930.

CAPÍTULO 3

Estabelecimento da concentração de Nitrogênio total no meio de cultura para micropropagação de ipeca, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.

1 RESUMO

LIMA, Patrícia Schober Gonçalves. **Estabelecimento da concentração de Nitrogênio total no meio de cultura para micropropagação de ipeca, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.** Lavras: UFLA, 2002. 83p. (Dissertação – mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de plantas).

A ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) é reconhecida mundialmente como planta medicinal. São produzidas em suas raízes a emetina e a cefalina, dois alcalóides de grande valor farmacológico. Sendo nativa da Mata Atlântica e estando ameaçada por ter sofrido intenso extrativismo e ter suas áreas de ocorrência natural reduzidas no presente, a ipeca é uma espécie passível de se adequar a um sistema de cultivo economicamente viável. A tecnologia do cultivo *in vitro* constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Visando o estabelecimento adequado da concentração de nitrogênio total em meio de cultura para o cultivo *in vitro* de ipeca, foram testadas 6 variações (0; 7.5; 15; 30; 45 e 60mM) da concentração de nitrogênio total da solução original do meio MS suplementado ou não com 2 mg/L de BAP. Verificou-se que a aplicação de 60mM de nitrogênio na presença de 2mg/L de BAP possui um efeito positivo na produção de matéria seca e na formação de um maior número de brotações por explante.

2 ABSTRACT

LIMA, Patrícia Schober Gonçalves. **Establishment of total nitrogen concentration on basic medium for micropropagation of ipecac, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.** Lavras: UFLA, 83p. (Dissertation – Plant Genetic and Breeding).

The ipecac is a recognized medicinal plant. In their roots are produced the emetin and cephaelin, two important alkaloids of pharmacological value for amoeba a dysentery treatments. This is a native endangered specie of Mata Atlântica Forest, because their intense extraction and their reduced natural incident area at the present; the ipecac is a specie subject to a viable economic cultivation system. The technology of *in vitro* culture is a promising alternative to maintain a constant and uniform supply of vegetable material. Looking for the establishment of an appropriate culture media for ipecac micropropagation, was tested 6 variations (0.0; 7.5; 15.0; 30.0; 45.0 and 60.0 mM) of total nitrogen concentrations of original media MS solution supplemented or not, with 2mg/L of BAP. It was checked that the 60mM nitrogen doses at the BAP presence had a positive effect on the mass production and greatest shoot number per explants.

3 INTRODUÇÃO

O emprego de técnicas adequadas visando o cultivo agrônômico ou extrativismo sustentado de espécies medicinais poderia colaborar para a redução da coleta comercial. A tecnologia do cultivo *in vitro* constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal.

A propagação *in vitro*, também denominada de micropropagação, em função do tamanho dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos para a agricultura (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis. A capacidade de regeneração e crescimento *in*

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 manejo da planta matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplante, são etapas influenciadas por diversas variáveis imponderáveis, que frequentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

Todos os componentes de um meio de cultura podem afetar a morfogênese *in vitro*, todavia, as atenções têm se voltado para o nitrogênio e, em especial, ao nitrogênio reduzido (AMMIRATO, 1985). A suplementação do meio quanto às fontes nitrogenadas na maioria das vezes é através de íons NH_4^+ e NO_3^- . A maioria das plantas prefere NO_3^- ao NH_4^+ e, em alguns casos, o oposto; para tanto é necessário encontrar o balanço certo de NO_3^- : NH_4^+ para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SATO, 1994).

Um meio mínimo sem a adição de hormônios raramente serve de veículo para suportar um crescimento de tecidos normais. O tipo e concentração dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, direcionam o desenvolvimento do explante e determinam o sucesso do cultivo. As citocininas formam um grupo de reguladores de crescimento muito importante para o cultivo *in vitro*. Na fase de estabelecimento de um processo de micropropagação, este grupo de reguladores de crescimento não só é favorável como necessário para o desenvolvimento do explante. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados. Em vista de todos estes fatores, o presente trabalho procura estabelecer um meio de cultivo *in vitro* adequado para a ipeca buscando principalmente, determinar a melhor dosagem de nitrogênio total para o desenvolvimento das plântulas *in vitro* e desta forma, contribuir com uma

alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal de qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

Todo o trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado constituiu-se de segmentos internodais de ipeca, com aproximadamente 1 cm de comprimento, provenientes de plantas obtidas a partir de cultura de gemas de raiz estabelecidas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Para obtenção das plantas que forneceram os explantes, foram inoculadas gemas de raízes de ipeca em meio básico de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido de 2mg.L^{-1} de BAP (6-benzilaminopurina). Após a emissão das brotações, estas foram subcultivadas em meio básico MS acrescido de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 (ácido giberélico) desprovido de BAP para o alongamento dos internós. Sendo em seguida, novamente subcultivadas em meio MS acrescido de 2mg.L^{-1} de BAP para que emitissem novas brotações e o número de explantes necessário para realização do experimento fosse alcançado.

4.3 Meios de cultivo

Para testar a concentração de nitrogênio total no meio de cultura suplementado ou não com 2 mg/L de BAP, variaram-se as concentrações de

TABELA 7. Concentração (mM) de N total com ou sem 2 mg/L de BAP nos diferentes tratamentos testados para o cultivo *in vitro* de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes). LAVRAS, UFLA, 2002.

	Dosagens de Nitrogênio Total (mM)					
	0,00	7,50	15,00	30,00	45,00	60,00
Com BAP	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6
Sem BAP	Trat. 7	Trat. 8	Trat. 9	Trat. 10	Trat. 11	Trat. 12

nitrogênio total da solução original do MS acrescidos ou não de 2 mg / L de BAP. O meio de cultura básico utilizado foi o de Murashige e Skoog, 1962 (MS), acrescido 6,0 g /L de Agar, com o pH ajustado para $5,8 \pm 1$ e autoclavado por 20 minutos a uma temperatura de 121°C à pressão de 1 atmosfera.

4.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos dispostos em um esquema fatorial 2 x 6 onde os fatores foram BAP e 6 dosagens de nitrogênio. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo cada uma das repetições composta por 3 tubos de ensaio. Os dados obtidos referentes ao número de brotações por explante e matéria seca foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

4.5 Condições de inoculação e incubamento

As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio (25 X 150mm) contendo 30 ml de meio de cultura em câmaras de fluxo laminar sob condições estéreis, e transferidas para a sala de crescimento com um

fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e intensidade luminosa de 1500 lux. Na sala de crescimento os tubos de ensaio contendo os explantes foram acondicionados em grades, onde foram dispostos de forma inteiramente casualizada. A cada 15 dias foi verificada a presença de contaminação e necrose dos explantes em desenvolvimento. A partir dos 45 dias de experimento passou-se a contar o número de brotações por explante, sendo realizadas mais 3 avaliações aos 60, 75 e 90 dias, respectivamente. Após um período de 90 dias as plântulas formadas foram retiradas dos tubos de ensaio, juntamente com o seu explante primário, para serem obtidos os pesos das matérias fresca e seca. Isto foi feito com auxílio de uma balança de precisão. Para ser obtido o peso seco, o material foi colocado em estufa a 70°C por 48 horas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a média do peso da biomassa dos tratamentos acrescidos de 2mg/L de BAP foi significativamente maior do que a média dos tratamentos que não continham BAP, indicando que a aplicação desta citocinina influencia de forma marcante na indução de brotação e crescimento da parte aérea dos explantes (Figura 5).

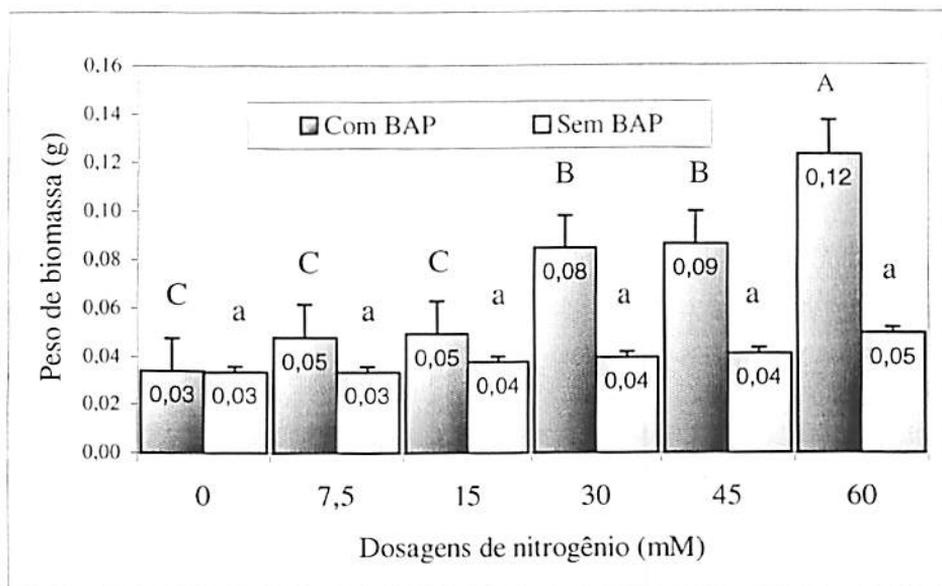


FIGURA. 5 Peso da biomassa de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) em função das dosagens de nitrogênio e da ausência e presença de BAP. LAVRAS, UFLA, 2002.

Houve interação simples significativa entre o fator presença de BAP e diferentes doses de nitrogênio total (Tabela 1B dos Anexos B). Com relação ao efeito das doses de nitrogênio total na formação de biomassa na presença de BAP, observou-se que a aplicação da dose de 60mM de nitrogênio total apresentou o peso da biomassa significativamente maior que as demais doses de nitrogênio total aplicadas. Embora as doses de 45 e 30mM tenha apresentado o peso da biomassa menor do que quando aplicada à dose de 60mM, elas ainda resultaram em maior formação de biomassa do que quando comparadas às doses de 15; 7,5 e 0 mM de nitrogênio total. As doses de 30 e 45mM não diferiram significativamente entre si quanto ao efeito sobre a formação da biomassa na presença de BAP. As doses de 0; 7,5 e 15 mM de nitrogênio total também não

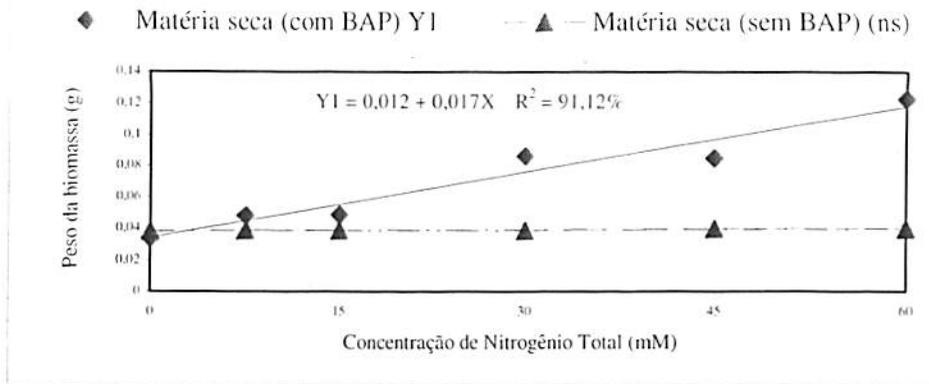


FIGURA 6. Peso da biomassa de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes.) em função das dosagens de nitrogênio e da ausência e presença de BAP. LAVRAS, UFLA, 2002.

diferiram significativamente entre si quanto ao efeito sobre o peso da biomassa, apresentando as menores médias (Figuras 5 e 6).

Na ausência de BAP, os diferentes níveis de nitrogênio não afetaram a formação de biomassa. Observando-se a figura 5, verifica-se que a média das diferentes doses de nitrogênio na ausência de BAP não diferem significativamente entre si. Este resultado reafirma a necessidade da aplicação do BAP no meio de cultivo para ipeca, pois indica que sem a aplicação do fitorregulador a capacidade do explante iniciar a formação de brotações é pequena mesmo na presença de altas concentrações de nitrogênio.

Na fase de estabelecimento de um processo de micropropagação, as citocininas não apenas favorecem, como são necessárias para o crescimento do explante. A maioria dos explantes *in vitro*, ao contrário do que ocorre com as giberelinas, não sintetiza citocininas suficientes para permitir um crescimento contínuo. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que em geral, apresenta melhores resultados. O uso de citocininas estimula o desenvolvimento e crescimento da parte aérea, mas em altas concentrações as citocininas podem ser prejudiciais. Na fase de multiplicação pode causar toxidez, caracterizada por entufamento e falta de alongamento dos brotos formados, encurtamento dos entrenós, engrossamento dos caules e hiperhidratação generalizada (TORRES,

CALDAS & BUSO, 1999). Em excesso, as citocininas podem também inibir o enraizamento. Segundo KEVERS, COUMANS & COUMANS-GILLES (1984) as citocininas, assim como os nitrogênios, podem estar relacionadas ao processo de hiperhidratação, principalmente quando usadas em excesso. O fato de não terem ocorrido os sintomas de toxidez apresentados acima entre os brotos regenerados a partir dos explantes de ipeca, indicam que a dose de BAP foi adequada para o cultivo *in vitro* de ipeca.

Quanto aos efeitos da interação entre as doses de nitrogênio total e a presença ou ausência de BAP para o peso da biomassa, conforme a Figura 6, verifica-se que houve um aumento linear ao aplicar-se BAP e elevar-se às dosagens de nitrogênio total. Mostrando que a melhor dose de nitrogênio total para obtenção de biomassa de ipeca é a de 60mM, que corresponde ao meio MS completo quanto às fontes de nitrogênio, observando a Figura 6, verifica-se também que na ausência de BAP não há resposta dos explantes às diferentes doses de nitrogênio quanto a produção de biomassa.

SATO (1994), ao cultivar diferentes clones de gérbera de vaso na presença ou ausência de BAP, também na concentração de 2 mg/L em meio MS, verificou que para todos os clones, tanto o peso da matéria fresca, como o peso da biomassa foram maiores quando se utilizou o fitohormônio.

Para ilustrar melhor, a figura 7 mostra o efeito da interação entre os fatores doses de nitrogênio e ausência ou presença de BAP sobre o desenvolvimento de biomassa dos explantes de ipeca.

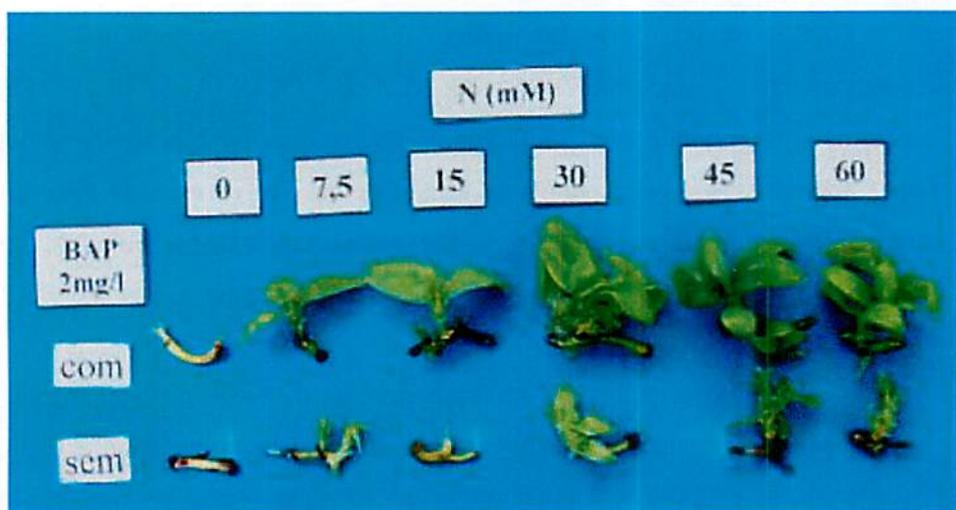


FIGURA 7. Efeito das diferentes doses de nitrogênio total sobre explantes de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) na ausência e presença de BAP. LAVRAS, UFLA, 2002.

A partir do 45º dia em meio de cultivo os explantes iniciaram a brotação, sendo então, contados a cada 15 dias, o número de brotações por explante para todos os tratamentos. Os explantes também foram avaliados quanto à ocorrência de necrose.

Foram feitas desta forma, 4 avaliações aos 45, 60, 75 e 90 dias de experimento, quando as plântulas obtidas foram retiradas do tubo de ensaio e pesadas para obtenção da biomassa.

Quanto ao número de brotações por explante, conforme a tabela 8, verificou-se que, para todas as doses de nitrogênio total na presença de BAP, as médias do número de brotações foram significativamente maiores nas 4 avaliações realizadas. Os reguladores de crescimento da classe das citocininas, a exemplo dos resultados promovidos pela presença do BAP neste experimento, atuam efetivamente na promoção direta ou indireta da formação de brotos.

TABELA 8. Valores médios do número de brotações dos explantes aos 45, 60, 75 e 90 dias, na presença e ausência de BAP, em função das dosagens de Nitrogênio Total. LAVRAS, UFLA, 2002.

N. Total (mM)	Número de brotações por explante							
	45 dias		60 dias		75dias		90dias	
	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP
0	0,19c	0,00a	0,30d	0,00a	0,43c	0,00a	0,29b	0,06a
7,5	0,56bc	0,00a	1,20cd	0,03a	2,03bc	0,00a	1,66ab	0,16a
15	0,90ab	0,07a	1,37bc	0,13a	2,13abc	0,33a	1,79ab	0,43a
30	1,46ab	0,19a	2,17abc	0,26a	3,76ab	0,50a	2,73a	0,73a
45	2,33a	0,28a	2,80ab	0,36a	4,30ab	0,59a	2,93a	1,06a
60	2,33a	0,56a	3,20a	0,56a	4,43a	0,60a	3,23a	1,63a
x	1,30 A	0,18 B	1,84 A	0,23 B	2,85 A	0,34 B	2,11 A	0,68 B

¹Médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna, representam a comparação para o efeito do desdobramento da interação entre os fatores doses de nitrogênio e presença ou ausência de BAP sobre o número de brotações por explante. As médias seguidas por letras diferentes indicam que as estimativas diferem entre si quanto a interação dos fatores nitrogênio e BAP. (Tukey: $p < 0.01$).

2 Médias seguidas por letras maiúsculas na mesma linha, representam a comparação do número de brotações por explante com a presença ou ausência de BAP.

Entretanto, o efeito das citocininas sobre a cultura de tecidos pode variar em função de diversos fatores, como a composição dos demais componentes do meio de cultura, a espécie de planta que está sendo utilizada, ou a maturidade do órgão da planta que gerou o explante. NANNETTI (1994) comenta que ao cultivar *Helicônia sp in vitro* na presença de diferentes níveis de nitrogênio não observou diferença quanto à formação de brotos quando se aplicou BAP a uma concentração de 2,5mg/L.

Quanto à dose de nitrogênio que resultou na formação do maior número de brotações por explante, verificou-se que na primeira avaliação aos 45 dias de cultivo *in vitro*, as doses de 60 e 45 mM na presença de BAP não diferiram significativamente entre si, e apresentaram as maiores médias.

Aos 60 dias de cultivo, a dosagem de 60mM na presença de BAP se destacou das demais; no entanto, as dosagens de 45 e 30 mM, apesar de apresentarem o número de brotações por explante significativamente diferentes, ainda se mostraram eficientes na promoção de brotações na presença de BAP.

Na ausência de BAP não houve interação significativa das dosagens de nitrogênio dentro do fator ausência de BAP, para os quatro períodos de avaliação. Desta forma as médias das dosagens de nitrogênio para o número de brotações por explante não apresentaram diferença significativa entre si, mostrando que na ausência de BAP os explantes não apresentam resposta satisfatória a nenhuma das diferentes doses de nitrogênio.

Aos 75 e 90 dias de cultivo a interação entre os fatores doses de nitrogênio e ausência ou presença de BAP passou a ser não-significativa, indicando que o efeito das diferentes doses de nitrogênio sobre a promoção da brotação passou a ser independente da presença ou ausência do BAP. No entanto, conforme a Tabela 8, a média do número de brotações por explante nos tratamentos contendo BAP e as concentrações de 30; 45 e 60 mM de nitrogênio, continuaram maiores em relação aos tratamentos que não foram acrescidos de BAP. Este comportamento deve ter sido ocasionado pelo efeito residual do BAP em função do longo período de cultivo *in vitro* sem que houvesse o subcultivo dos explantes. Segundo TORRES, CALDAS & BUSO (1999), o efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura, pois diversas vezes constata-se um efeito residual de uma subcultura para outra. Este efeito residual pode ser problemático quando afeta o alongamento ou se torna fator limitante para o enraizamento nos subcultivos posteriores.

Com relação ao tempo de cultivo, a tabela 8 mostra que para os tratamentos na presença de BAP, as médias do número de brotação por explante para os tratamentos contendo BAP não diferiram significativamente entre si para os diferentes períodos de cultivo indicando que a partir dos 45 dias, já pode ser realizado o subcultivo.

Para os explantes cultivados na ausência de BAP, ocorreu o mesmo, assim as médias do número de brotação por explante para os tratamentos na ausência de BAP não diferiram significativamente entre si para os diferentes períodos de cultivo, também indicando que a partir dos 45 dias já pode ser realizado o subcultivo.

De acordo com EYMAR et al. (2000), geralmente o pH do meio de cultura decresce com o passar do tempo, embora as razões para que isto ocorra não sejam ainda muito claras, especula-se que a desidratação do meio e a precipitação dos componentes do meio contribuam para isto. A acidificação excessiva do meio de cultivo prejudica a absorção de nutrientes pelo explante. Além disto, pode ser observado na Tabela 9, que por volta do período dos 75 dias os explantes para maior parte dos tratamentos atingiu uma alta porcentagem de necrose, com exceção dos tratamentos que continham doses de 45 e 60 mM de nitrogênio total na presença de BAP, que parece ter se estabilizado a partir daí. A necrose, resultante da morte dos tecidos, normalmente é acompanhada por um processo de oxidação de compostos fenólicos que se difundem pelo explante e pelo meio de cultura ao seu redor. Os produtos da oxidação são tóxicos ao explante, prejudicando o desenvolvimento do mesmo (TORRES, CALDAS & BUSO, 1999). Os compostos fenólicos liberados pelos tecidos necrosados também contribuem para acidificação do meio em contato com o explante.

TABELA 9. Porcentagem do número de explantes necrosados aos 45, 60, 75 e 90 dias, na presença e ausência de BAP, em função das dosagens de Nitrogênio Total.LAVRAS, UFLA, 2002.

N. Total (mM)	Porcentagem de explantes necrosados (%)							
	45 dias		60 dias		75 dias		90 dias	
	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP	C/ BAP	S/ BAP
0	40	73,3	50	80	56,6	93,3	56,6	93,3
7,5	0	80	6,6	80	26,6	80	26,6	80
15	43,3	56,6	50	56,6	53,3	23,3	50	33,3
30	10	90	33,3	36,6	33,3	50	33,3	50
45	0	70	0	73,3	0	73,3	0	83,3
60	0	73,3	0	73,3	0	73,3	0	73,3

Analisando-se os resultados obtidos tanto para as duas variáveis de resposta estudada, pode-se concluir que o cultivo de segmentos internodais de ipêca em meio MS acrescido de 2mg/L de BAP, e uma concentração de nitrogênio total de 60mM apresentam melhores resultados quanto à produção de biomassa e formação de múltiplas brotações. Tanto o incremento de biomassa, como o processo de crescimento celular estão intimamente relacionados a absorção e conversão de nitrogênio em matéria orgânica. TADESSE, LOMMEN & STRUIK (2000), ao estudarem o efeito da ação de diferentes concentrações de nitrogênio em diferentes cultivares de batata, verificaram que baixas doses de nitrogênio promoveram um incremento inicial da área foliar das plântulas formadas, mas ocasionaram efeitos relativamente negativos no aumento da área foliar das plantas durante a aclimação. WITJAKSONO et al. (2000) concluíram que para abacate uma concentração de nitrogênio total de 40 mM em meio MS é ideal para promover o desenvolvimento dos explantes. BESPALHOK, VIEIRA & HASHIMOTO (1992) observaram

que para explantes de *Stevia rebaudiana* concentrações elevadas de nitrogênio total em meio MS apresentam efeito tóxico, e determinaram que uma concentração de 5, 15mM de NH_4NO_3 além de não causar toxidez permitem uma elevada formação de brotos. No entanto, quando se considera a atuação do nitrogênio no cultivo *in vitro*, deve-se ressaltar que o nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato). A suplementação do meio quanto às fontes nitrogenadas, na maioria das vezes, é através de íons NH_4^+ e NO_3^- . A maioria das plantas prefere NO_3^- ao NH_4^+ e, em alguns casos o oposto; para tanto é necessário encontrar o balanço certo de NO_3^- : NH_4^+ para um ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SATO, 1994). Desta forma um estudo detalhado quanto à relação NO_3^- : NH_4^+ se faz necessário para o estabelecimento de um meio adequado para a micropropagação de ipeca.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de BAP no meio de cultura para o cultivo *in vitro* de ipeca é indispensável para o início da formação de brotações, assim como para o crescimento dos brotos formados.

A aplicação de 60mM de nitrogênio total na presença de 2mg/L de BAP possui um efeito positivo na produção de biomassa e na formação de um maior número de brotações por explante.

Ainda se faz necessário um estudo detalhado quanto à relação NO_3^- : NH_4^+ para o estabelecimento de um meio adequado para a micropropagação de ipeca.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO,P.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A; SHARP, W.R.; AMMIRATO,P.V.;YAMADA,(c/eds.).**Handbook of plant cell culture**. New York: Mcmillan Publishing, 1985.v.1, p.83-123.

BESPALHOK, J. C. F^o; VIEIRA, L. G. E.; HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação in vitro de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.4, n.1, p. 159-161, 1992.

EYMAR, E.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M.; LÓPEZ-VELA, D. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, n.1, p.57-65, 2000.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. eds. **Cultura de Tecidos e Transformações Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998.

KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLES, M.F; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, n.1, p.69-74, Jan., 1984.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p. 473-497, 1962.

NANNETTI, D.C.; **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p.:Il (Dissertação de Mestrado).

SATO, A. Y. **Propagação de gébera de vaso através da cultura de tecidos.** Lavras: ESAL, 1994. 95p.(Dissertação de Mestrado).

TADESSE , M.; LOMMEN; STRUIK, PC Effects of in vitro treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, n.1, p.59-67, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. 2v. (864p.); il. 1999.

WITJAKSONO, B., A. S.; ANGEL, M. C.; RICHARD, E. L.; PAMELA, A., M. avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, Largo, v.35, n.2, p.238-244, may-june. 2000.

ANEXOS

ANEXO A

	Pág
TABELA 1A. Matriz de distâncias genéticas (abaixo da diagonal) e erro estimado (acima da diagonal) entre os acessos de ipeca (<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes) analisados dois a dois. LAVRAS, UFLA, 2002.....	77
TABELA 2A. Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas dos 48 acessos de ipeca (<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes). LAVRAS, UFLA, 2002.....	79
TABELA 3A. Teor de emetina, identificação e local de coleta dos acessos de ipeca (<i>Psychotria ipecacuanha</i> (Brot.) Stokes).LAVRAS, UFLA, 2002.....	81

ANEXO B

TABELA 1B. Resumo da análise de variância para matéria seca.LAVRAS, UFLA, 2002.....	83
TABELA 2B. Análise do desdobramento de nitrogênio dentro de cada nível de BAP.LAVRAS, UFLA, 2002.....	84

TABELA 1A. Matriz de distâncias genéticas (abaixo da diagonal) e erro estimado (acima da diagonal) entre os acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) analisados dois a dois. LAVRAS, UFPA, 2002.

690	815	573	571	807	218	700	827	819	602	719	801	837	828	811	735	751	845	745	702	826	701	829	
690	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
815	0.75	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
573	0.82	0.86	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
571	0.70	0.75	0.75	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05
807	0.58	0.61	0.63	0.58	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
218	0.47	0.61	0.65	0.61	0.71	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
700	0.50	0.65	0.67	0.61	0.52	0.72	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
827	0.43	0.47	0.47	0.52	0.42	0.43	0.42	0.03	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
819	0.37	0.42	0.36	0.47	0.29	0.33	0.30	0.74	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
602	0.38	0.40	0.38	0.52	0.30	0.28	0.33	0.78	0.85	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
719	0.47	0.52	0.47	0.57	0.36	0.34	0.38	0.71	0.81	0.86	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
801	0.43	0.48	0.43	0.53	0.34	0.40	0.45	0.85	0.80	0.84	0.78	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
837	0.42	0.47	0.42	0.50	0.33	0.35	0.39	0.79	0.86	0.91	0.88	0.91	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
828	0.50	0.58	0.59	0.53	0.49	0.50	0.62	0.45	0.48	0.44	0.47	0.49	0.52	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05
811	0.57	0.61	0.60	0.65	0.57	0.55	0.63	0.55	0.55	0.54	0.62	0.62	0.63	0.62	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05
735	0.55	0.66	0.65	0.68	0.60	0.70	0.71	0.50	0.45	0.47	0.48	0.58	0.55	0.6	0.76	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
751	0.52	0.68	0.65	0.60	0.55	0.60	0.73	0.51	0.46	0.48	0.54	0.56	0.54	0.63	0.73	0.79	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
845	0.34	0.42	0.47	0.48	0.45	0.42	0.52	0.52	0.60	0.63	0.60	0.57	0.65	0.49	0.56	0.46	0.56	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
745	0.43	0.49	0.50	0.61	0.54	0.45	0.48	0.69	0.55	0.66	0.60	0.70	0.68	0.50	0.52	0.58	0.62	0.70	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05
702	0.39	0.46	0.40	0.53	0.38	0.37	0.40	0.60	0.71	0.72	0.7	0.70	0.77	0.44	0.53	0.55	0.54	0.68	0.74	0.04	0.05	0.05	0.05
826	0.45	0.51	0.45	0.59	0.41	0.41	0.41	0.67	0.66	0.66	0.68	0.70	0.69	0.47	0.54	0.60	0.60	0.49	0.73	0.82	0.05	0.05	0.05
701	0.40	0.40	0.36	0.44	0.27	0.29	0.38	0.68	0.80	0.81	0.80	0.82	0.85	0.42	0.55	0.51	0.47	0.63	0.57	0.73	0.68	0.05	0.05
829	0.31	0.43	0.41	0.50	0.31	0.41	0.36	0.69	0.73	0.81	0.76	0.76	0.82	0.41	0.56	0.51	0.44	0.59	0.66	0.72	0.64	0.78	0.78
877	0.41	0.46	0.48	0.54	0.43	0.51	0.56	0.63	0.58	0.62	0.60	0.68	0.64	0.53	0.57	0.60	0.59	0.52	0.66	0.68	0.70	0.64	0.65
760	0.43	0.50	0.47	0.56	0.41	0.45	0.45	0.67	0.59	0.66	0.66	0.74	0.68	0.45	0.58	0.54	0.53	0.50	0.69	0.64	0.64	0.68	0.74
810	0.34	0.45	0.39	0.53	0.32	0.41	0.48	0.60	0.62	0.62	0.59	0.62	0.65	0.52	0.59	0.43	0.46	0.59	0.51	0.52	0.50	0.61	0.61
694	0.34	0.48	0.44	0.52	0.42	0.46	0.46	0.60	0.55	0.60	0.52	0.69	0.65	0.52	0.60	0.59	0.58	0.52	0.64	0.56	0.58	0.52	0.61
612	0.47	0.47	0.52	0.53	0.46	0.53	0.48	0.51	0.66	0.59	0.61	0.57	0.64	0.50	0.61	0.57	0.54	0.53	0.50	0.60	0.52	0.59	0.56
574	0.45	0.45	0.42	0.55	0.37	0.41	0.50	0.68	0.63	0.70	0.66	0.76	0.72	0.42	0.62	0.52	0.50	0.53	0.62	0.59	0.59	0.66	0.67
607	0.24	0.34	0.36	0.52	0.44	0.46	0.44	0.54	0.46	0.57	0.51	0.51	0.53	0.41	0.63	0.52	0.53	0.48	0.62	0.53	0.55	0.41	0.50
712	0.39	0.48	0.37	0.46	0.32	0.39	0.51	0.63	0.56	0.62	0.62	0.68	0.66	0.44	0.64	0.47	0.55	0.50	0.57	0.55	0.57	0.51	0.53
833	0.43	0.43	0.43	0.50	0.44	0.51	0.55	0.59	0.48	0.58	0.54	0.61	0.59	0.37	0.65	0.61	0.59	0.39	0.50	0.49	0.50	0.54	0.53
777	0.48	0.61	0.52	0.57	0.40	0.44	0.53	0.67	0.59	0.64	0.64	0.70	0.69	0.48	0.66	0.59	0.62	0.56	0.63	0.60	0.61	0.57	0.62
693	0.55	0.63	0.60	0.61	0.48	0.58	0.58	0.68	0.57	0.63	0.67	0.71	0.68	0.5	0.67	0.70	0.66	0.47	0.56	0.56	0.60	0.61	0.61
714	0.46	0.56	0.51	0.52	0.40	0.47	0.53	0.59	0.52	0.57	0.58	0.66	0.64	0.48	0.68	0.72	0.63	0.44	0.54	0.53	0.60	0.58	0.56
816	0.39	0.50	0.45	0.55	0.40	0.49	0.53	0.72	0.69	0.74	0.70	0.73	0.74	0.45	0.69	0.53	0.54	0.57	0.62	0.66	0.64	0.68	0.72
814	0.4	0.59	0.51	0.57	0.44	0.46	0.51	0.69	0.71	0.75	0.73	0.74	0.79	0.51	0.70	0.57	0.58	0.64	0.67	0.72	0.62	0.68	0.71
746	0.47	0.52	0.45	0.50	0.40	0.41	0.47	0.74	0.70	0.76	0.74	0.77	0.80	0.49	0.71	0.51	0.54	0.57	0.65	0.68	0.63	0.72	0.72
696	0.50	0.56	0.50	0.56	0.39	0.42	0.51	0.76	0.73	0.80	0.78	0.82	0.86	0.55	0.72	0.57	0.58	0.61	0.69	0.73	0.69	0.78	0.79
808	0.50	0.55	0.50	0.55	0.38	0.41	0.50	0.73	0.77	0.83	0.81	0.82	0.89	0.58	0.73	0.56	0.61	0.65	0.68	0.72	0.68	0.79	0.78
839	0.43	0.50	0.43	0.54	0.36	0.40	0.45	0.77	0.78	0.83	0.78	0.81	0.88	0.52	0.74	0.49	0.53	0.66	0.66	0.70	0.64	0.76	0.78
695	0.42	0.52	0.46	0.56	0.40	0.41	0.46	0.77	0.79	0.84	0.80	0.82	0.90	0.55	0.75	0.52	0.56	0.69	0.68	0.73	0.67	0.78	0.78
838	0.42	0.52	0.46	0.55	0.39	0.41	0.46	0.78	0.78	0.83	0.80	0.81	0.89	0.54	0.76	0.51	0.56	0.68	0.68	0.72	0.66	0.77	0.79
595	0.42	0.52	0.46	0.55	0.39	0.41	0.46	0.78	0.78	0.83	0.80	0.81	0.89	0.54	0.77	0.51	0.56	0.68	0.68	0.72	0.66	0.77	0.79
707	0.41	0.50	0.44	0.55	0.36	0.38	0.46	0.75	0.77	0.83	0.80	0.80	0.88	0.52	0.78	0.50	0.54	0.67	0.66	0.71	0.65	0.76	0.77
753	0.41	0.50	0.45	0.54	0.38	0.38	0.45	0.77	0.77	0.84	0.80	0.80	0.88	0.53	0.79	0.49	0.55	0.68	0.67	0.70	0.64	0.76	0.73

TABELA IA. Continuação.

	877	760	810	694	612	574	607	712	833	777	693	714	816	814	746	696	808	839	695	838	595	707	753	
690	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07	0.06	0.057	0.04	0.05	
815	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.07	0.06	0.064	0.05	0.05	
573	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.065	0.06	0.06	
571	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.05	0.04	0.05	0.05	0.063	0.06	0.07	
807	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06
218	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.053	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06
700	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
827	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
819	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
602	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05
719	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05
801	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05
837	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06
828	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
811	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06
735	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
751	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
845	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
745	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
702	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
826	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
701	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
829	0.04	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
877	0.05	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
760	0.72	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05
810	0.56	0.66	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05
694	0.51	0.59	0.56	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
612	0.53	0.45	0.42	0.46	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
574	0.60	0.72	0.68	0.67	0.55	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
607	0.59	0.46	0.55	0.58	0.51	0.55	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
712	0.62	0.58	0.67	0.65	0.36	0.74	0.61	0.05	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
833	0.55	0.59	0.56	0.51	0.65	0.67	0.61	0.53	0.05	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	0.06
777	0.60	0.62	0.65	0.69	0.42	0.70	0.55	0.85	0.54	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
693	0.61	0.62	0.53	0.64	0.62	0.68	0.54	0.65	0.72	0.75	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
714	0.52	0.50	0.54	0.57	0.53	0.58	0.56	0.58	0.65	0.64	0.79	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
816	0.63	0.69	0.69	0.54	0.54	0.70	0.51	0.57	0.60	0.56	0.59	0.58	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
814	0.65	0.65	0.64	0.60	0.59	0.68	0.54	0.64	0.55	0.64	0.66	0.62	0.75	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
746	0.63	0.69	0.68	0.57	0.55	0.68	0.55	0.62	0.61	0.62	0.64	0.61	0.85	0.89	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
696	0.67	0.71	0.67	0.63	0.63	0.71	0.53	0.62	0.62	0.64	0.66	0.60	0.80	0.85	0.90	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
808	0.64	0.68	0.68	0.67	0.62	0.70	0.54	0.63	0.59	0.65	0.66	0.61	0.78	0.84	0.88	0.97	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
839	0.64	0.68	0.74	0.65	0.56	0.70	0.56	0.66	0.57	0.67	0.63	0.60	0.80	0.84	0.88	0.92	0.94	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
695	0.63	0.66	0.71	0.67	0.59	0.68	0.56	0.63	0.55	0.68	0.65	0.61	0.78	0.84	0.86	0.92	0.94	0.98	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
838	0.64	0.67	0.72	0.67	0.59	0.69	0.57	0.65	0.56	0.69	0.65	0.61	0.79	0.84	0.87	0.92	0.94	0.98	0.99	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
595	0.64	0.67	0.72	0.67	0.59	0.69	0.57	0.65	0.56	0.69	0.65	0.61	0.79	0.84	0.87	0.92	0.94	0.98	0.99	0.98	0.1	0.1	0.1	0.1
707	0.62	0.65	0.73	0.65	0.57	0.69	0.55	0.65	0.56	0.66	0.63	0.61	0.80	0.82	0.86	0.92	0.94	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98
753	0.64	0.65	0.72	0.66	0.56	0.68	0.56	0.64	0.55	0.67	0.63	0.59	0.79	0.83	0.85	0.91	0.92	0.97	0.98	0.98	0.98	0.98	0.98	0.97

TABELA 2A. Continuação.

690	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1								
815	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1								
573	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1								
571	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0								
807	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1								
218	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0								
700	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
827	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1								
819	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1								
602	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1								
719	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1								
801	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0							
837	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1							
828	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1							
811	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1								
735	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1							
751	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1							
845	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
745	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
702	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
826	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
701	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
829	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
877	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1							
760	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1							
810	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0						
694	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0						
612	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0						
574	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0						
607	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0						
712	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0					
833	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0						
777	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0					
693	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0					
714	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0					
816	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1				
814	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1				
746	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1				
696	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1				
808	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1				
839	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1				
695	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1			
838	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1		
595	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
707	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
753	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1

TABELA 3A. Teor de emetina, identificação e local de coleta dos acessos de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes).LAVRAS, UFLA, 2002.

Acesso	Emetina (%)	Local de coleta	UF
602	1,30	Barra dos Bugres	MT
719	0,56	Barra dos Bugres	MT
690	0,88	Barra dos Bugres	MT
695	1,89	Barra dos Bugres	MT
595	2,17	Mirassol	MT
700	1,15	Tangará da Serra	MT
701	0,68	Tangará da Serra	MT
702	1,19	Tangará da Serra	MT
707	0,91	Pontes e Lacerda	MT
708	0,59	Pontes e Lacerda	MT
712	1,98	V. B. S. Trindade	MT
714	0,71	V. B. S. Trindade	MT
612	1,44	Costa Marques	MT
826	1,99	Costa Marques	MT
827	1,39	Costa Marques	MT
828	0,85	Costa Marques	MT
829	0,65	Costa Marques	MT
833	1,62	Costa Marques	MT
834	1,55	Costa Marques	MT
835	1,60	Costa Marques	MT
836	1,78	Costa Marques	MT
837	1,66	Costa Marques	MT
838	1,29	Costa Marques	MT

TABELA 3A. Continuação

Acesso	Emetina (%)	Local de coleta	UF
839	0,69	Costa Marques	MT
776	0,90	Rolim de Moura	RO
801	0,98	Rolim de Moura	RO
802	1,92	Rolim de Moura	RO
803	1,63	Rolim de Moura	RO
807	1,45	Rolim de Moura	RO
808	1,92	Rolim de Moura	RO
810	0,79	Rolim de Moura	RO
811	0,82	Rolim de Moura	RO
814	2,00	Rolim de Moura	RO
815	1,25	Rolim de Moura	RO
571	1,53	Salto do Céu	MT
694	0,79	Salto do Céu	MT
845	0,65	Novo Horizonte	RO
760	0,74	Rio Branco	MT
816	0,64	Cacoal	RO
819	0,67	Cacoal	RO
845	0,67	Cerejeiras	RO
760	0,74	Linhares	ES
745	0,87	Porciúncula	RJ
746	1,07	Porciúncula	RJ
751	2,36	Caratinga	MG
753	0,56	Caratinga	MG

TABELA 1B. Resumo da análise de variância para matéria seca.LAVRAS, UFLA, 2002.

F.V	G.L.	SQ	QM
Nitrogênio	5	0,005830	30,617**
BAP	1	0,030315	159,207**
Nitrogênio*BAP	5	0,005576	29,285**
Erro	108	0,00019	
Total corrigido	119	0.107910	
CV (%) = 25,05			
Média geral:0,0550842		Número de observações: 120	

* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

TABELA 2. Análise do desdobramento de nitrogênio dentro de cada nível de BAP.LAVRAS, UFLA, 2002.

F.V.	G.L	S.Q.	Q.M.
Nitrogênio/ C.BAP	5	0,055220	0,011044 **
Nitrogênio/ S. BAP	5	0,001811	0,000362
Resíduo	180	0,020565	0,000190

* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

