

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CROTON*  
*ANTISYPHILITICUS* MART.**

**TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Horticultura)

BOTUCATU – SP  
Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *CROTON*  
*ANTISYPHILITICUS* MART.**

**TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Soares Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Horticultura)

BOTUCATU – SP  
Fevereiro – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO -  
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA

- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Oliveira, Taíce Gonçalves de, 1986-  
O48m      Micropropagação e conservação *in vitro* de *Croton antisiphiliticus* Mart. /  
Taíce Gonçalves de Oliveira. - Botucatu : [s.n.], 2011  
  
x, 69 f. : tabs., fots. color.  
  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011  
  
Orientador: Ana Maria Soares Pereira  
Inclui bibliografia  
  
1. Cerrado. 2. Plantas medicinais. 3. Pé-de-perdiz. 4. Euphorbiaceae. I.  
Pereira, Ana Maria Soares. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III.  
Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO in vitro DE Croton  
antisiphiliticus Mart.

ALUNA: TAÍCE GONÇALVES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANA MARIA SOARES PEREIRA

Aprovado pela Comissão Examinadora



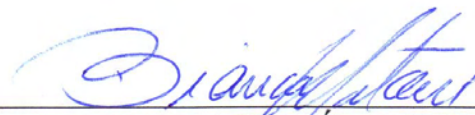
---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANA MARIA SOARES PEREIRA



---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA



---

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> BIANCA WALÉRIA BERTONI

Data da Realização: 22 de fevereiro de 2011.

“O homem vai à Lua, uma sonda cai a Júpiter, mas  
nós nem ao menos conseguimos contar as espécies  
vegetais no planeta.”

Gottlieb, 1994

## AGRADECIMENTOS

A Deus esse Pai amoroso, que sempre me ampara, me ensina e me mostra o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais João e Neli, e meus irmãos Ulisses, Tales e Tácia pelo amor incondicional, por compreenderem minha ausência e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Márllen meu companheiro que ombreia comigo essa caminhada, pelo amor, compreensão e pelo apoio em todas as minhas decisões.

A Fer essa grande amiga que em todos os momentos está ao meu lado e que com sua doce presença faz a minha vida mais feliz.

A July essa irmã do coração, que tanto colaborou com esse trabalho e que sempre esteve pronta a auxiliar, obrigada por colorir os meus dias com a sua companhia.

A Ana Maria Soares Pereira por aceitar me orientar, por ser essa “mãezona” que nos acolhe e nos aconchega e enche os nossos corações de uma esperança eterna.

A todos os meus familiares e amigos que sempre acreditaram e vibraram por mim, e que entenderam muitas vezes a minha ausência.

Aos amigos Patrícia, Lucas, Mayara, Camila, Marielle, Tiago, Edieidia e Fernando, pela ajuda, pelas sugestões e principalmente pelos momentos de alegria.

Aos amigos de Botucatu pelo amparo, por todas as vezes que me receberam e me abrigaram e me proporcionaram tantos momentos felizes.

A profa Bianca Waléria Bertoni pela amizade, por todo apoio e sugestões ao trabalho.

A família da Terra de Ismael por serem essa fonte inesgotável de esperança e amor que abastece a minha alma e me sustenta sempre.

A Profa Giuseppina Pace Pereira Lima por aceitar participar da banca.

A todos os funcionários e professores da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em especial a Profa Suzelei de Castro França, por todo o apoio oferecido para a execução deste trabalho.

A UNESP pela oportunidade de crescimento profissional.

A CAPES, pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

|                                                    | Página |
|----------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE TABELAS.....                              | VIII   |
| LISTA DE FIGURAS.....                              | X      |
| RESUMO.....                                        | 01     |
| SUMMARY.....                                       | 03     |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                 | 05     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA DA ESPÉCIE EM ESTUDO..... | 06     |
| 2.1 Cerrado.....                                   | 06     |
| 2.2 Plantas Medicinais e fitoterápicos.....        | 08     |
| 2.3 O Gênero <i>Croton</i> .....                   | 10     |
| 2.4 A espécie <i>Croton antisiphiliticus</i> ..... | 11     |
| 2.4.1 Descrição Botânica.....                      | 11     |
| 2.4.2 Taxonomia e habitat.....                     | 11     |
| 2.4.3 Distribuição geográfica.....                 | 12     |
| 2.4.4 Etnobotânica e etnofarmacologia.....         | 12     |
| 2.4.5 Atividade antimicrobiana.....                | 14     |
| 2.4.6 Fitoquímica.....                             | 14     |
| 2.5 Tecnologias <i>in vitro</i> .....              | 14     |
| 2.5.1 Micropropagação.....                         | 15     |
| 2.5.1.1 Etapas Básicas da Micropropagação.....     | 16     |
| 2.5.1.2 Reguladores vegetais.....                  | 17     |
| 2.6 Banco de Germoplasma.....                      | 18     |
| 3. OBJETIVOS.....                                  | 21     |
| 3.1 Objetivo geral.....                            | 21     |

## SUMÁRIO

|                                                       | Página |
|-------------------------------------------------------|--------|
| 3.2 Objetivos específicos.....                        | 21     |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....                            | 23     |
| 4.1 Condições gerais dos experimentos.....            | 23     |
| 4.2 Germinação de sementes <i>in vitro</i> .....      | 24     |
| 4.3 Escolha do meio basal.....                        | 24     |
| 4.4 Concentração de sais do meio basal.....           | 25     |
| 4.5 Multiplicação <i>in vitro</i> .....               | 25     |
| 4.6 Produção de múltiplas brotações .....             | 26     |
| 4.7 Co-cultivo .....                                  | 26     |
| 4.8 Tipo do recipiente .....                          | 27     |
| 4.9 Posição da gema .....                             | 27     |
| 4.10 Enraizamento <i>in vitro</i> .....               | 28     |
| 4.11 Aclimação .....                                  | 29     |
| 4.12 Conservação de germoplasma <i>in vitro</i> ..... | 29     |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                        | 31     |
| 5.1 Germinação de sementes <i>in vitro</i> .....      | 31     |
| 5.2 Escolha do meio basal .....                       | 33     |
| 5.3 Concentração de sais .....                        | 34     |
| 5.4 Multiplicação <i>in vitro</i> .....               | 35     |
| 5.5 Produção de brotações múltiplas.....              | 38     |
| 5.6 Co-cultivo.....                                   | 40     |
| 5.7 Tipo do recipiente.....                           | 42     |
| 5.8 Posição da gema.....                              | 43     |

**SUMÁRIO**

|                                                       | <b>Página</b> |
|-------------------------------------------------------|---------------|
| 5.9 Enraizamento <i>in vitro</i> .....                | 45            |
| 5.10 Aclimação.....                                   | 49            |
| 5.11 Conservação de germoplasma <i>in vitro</i> ..... | 50            |
| 6. CONCLUSÕES .....                                   | 53            |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                  | 55            |

## LISTA DE TABELAS

## Página

|                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Compilação de dados etnobotânicos e etnofarmacológicos sobre a espécie <i>C. antisiphiliticus</i> .....                                                                                                                                                       | 13 |
| Tabela 2: Efeito do meio basal na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.....                                                                                      | 34 |
| Tabela 3: Efeito da concentração de sais no número de gemas, porcentagem de calos, altura da brotação e na porcentagem sobrevivência aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010. ....                                                                               | 35 |
| Tabela 4: Efeito da adição das citocininas, BAP, 2ip, cinetina e zeatina em diferentes concentrações na porcentagem de calos, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.....                                   | 37 |
| Tabela 5: Valores da taxa de multiplicação para as citocininas, BAP, 2ip, cinetina e zeatina em diferentes concentrações aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.....                                                                                            | 38 |
| Tabela 6: Influência da adição da auxina AIA no meio MS basal suplementado com 1µM de IBA na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos, na altura da brotação e na taxa de multiplicação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010..... | 40 |
| Tabela 7: Efeito do co-cultivo na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.....                                                                                      | 41 |
| Tabela 8: Efeito do tipo do recipiente na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010. ....                                                                             | 43 |
| Tabela 9: Efeito da posição da gema apical e basal na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos, na altura da brotação e na taxa de multiplicação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.....                                        | 44 |
| Tabela 10: Efeito da adição de IBA na porcentagem de enraizamento, número e tamanho das raízes, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011.....                                                                                                                                  | 48 |

**LISTA DE TABELAS****Página**

|                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 11: Efeito da sacarose, manitol, sorbitol, espermidina e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de <i>C. antisiphiliticus</i> mantidos <i>in vitro</i> em 15°C, aos 150 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011,.....              | 51 |
| Tabela 12: Efeito da sacarose, manitol, sorbitol, espermidina e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de <i>C. antisiphiliticus</i> mantidos <i>in vitro</i> em 15°C, aos 30, 60, 90 e 150 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011 ..... | 52 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                              | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1: <i>Croton antisiphiliticus</i> (A) e detalhe da inflorescência (B).....                                                                                                                            | 12     |
| Figura 2: Frascos com meio de cultura MS suplementado com 1,0µM de BAP, com cinco gemas (A) e uma gema(B) de <i>C. antisiphiliticus</i> .....                                                                | 26     |
| Figura 3: Tipos de recipientes utilizados no experimento: frasco do tipo pote (A) e do tipo cubeta (B).....                                                                                                  | 27     |
| Figura 4: Posições de gemas de plantas de <i>C. antisiphiliticus</i> utilizadas no experimento.....                                                                                                          | 28     |
| Figura 5: Sementes de <i>Croton antisiphiliticus</i> , cultivadas em cubetas com meio MS basal, suplementado com sacarose e phytigel®, contaminada (A), não germinada (B), germinada (C) e plântula (D)..... | 32     |
| Figura 6: Explantes de <i>C. antisiphiliticus</i> cultivados em frasco do tipo pote de modo isolado e em co-cultivo.....                                                                                     | 41     |
| Figura 7: Explantes de <i>C. antisiphiliticus</i> em meio MS, suplementado com IBA com aparência amarelada com provável nível tóxico de auxina (A) e sem adição de reguladores (B).<br>.....                 | 47     |
| Figura 8: Vaso coberto com saco de polietileno transparente e com recipiente de fornecimento de água foi diário (A) e plantas de <i>C. antisiphiliticus</i> após o processo de aclimação (B).....            | 50     |

## **MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Croton antisiphiliticus* MART.**

**Autora:** Bióloga Taíce Gonçalves de Oliveira

**Orientadora:** Dra. Ana Maria Soares Pereira

### **RESUMO**

*Croton antisiphiliticus* Mart. ex M. Arg. popularmente pé de perdiz, é uma planta medicinal nativa do Cerrado, pertencente à família Euphorbiaceae. A raiz é utilizada popularmente na forma de decoctos e garrafadas para combater infecções do aparelho reprodutor masculino e feminino. A coleta da planta é realizada de forma extrativista e não há trabalhos a respeito da conservação da espécie. Desta forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação visando a multiplicação em larga escala de *C. antisiphiliticus* para que no futuro seja possível o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir desta espécie. Foram desenvolvidos experimentos de germinação *in vitro*, protocolos de micropropagação e conservação de germoplasma *in vitro*. Para determinar a melhor condição de germinação *in vitro* foi avaliada a ação do fungicida Cercobin na assepsia das sementes. No desenvolvimento do protocolo de micropropagação foram avaliados o efeito dos meios MS, WP e B5 e da concentração de sais no desenvolvimento das plantas; o efeito das citocininas BAP, cinetina, zeatina e 2ip na multiplicação dos explantes; a associação do BAP com a auxina AIA na intensificação das brotações; o tamanho do recipiente para o cultivo *in vitro*; o co-cultivo; a posição da gema em relação à brotação; a influência da auxina AIB no enraizamento *in vitro*; a aclimação dos explantes; e o efeito de agentes de estresse osmótico no crescimento mínimo de explantes de *C. antisiphiliticus*. O meio MS/2 foi o meio mais eficiente para o desenvolvimento de plantas *in vitro*. Várias citocininas influenciaram na multiplicação dos explantes, no entanto, a BAP (1µM) foi selecionada como a mais eficaz para a multiplicação. A associação de BAP com AIA não apresentou resultado significativo no aumento das brotações. As plantas cultivadas em frasco tipo pote apresentaram melhores

resultados. Os explantes além de apresentarem tolerância ao co-cultivo *in vitro* mostraram-se vigorosos. A melhor posição da gema para multiplicação é a apical. O meio MS sem adição de reguladores foi o mais eficiente no enraizamento. A aclimação de explantes de *C. antisiphiliticus* foi possível sem a presença de raízes desenvolvidas *in vitro*. Para conservação em Banco de Germoplasma, a presença ou ausência dos agentes osmóticos utilizados não garantiram a sobrevivência da maioria dos propágulos nesse ambiente. Assim, é possível concluir que a micropropagação da espécie *C. antisiphiliticus* é viável e faz-se necessário estudos futuros relacionados aos aspectos químicos e genéticos a fim de encontrar os genótipos elites para conservação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cerrado, planta medicinal, pé-de-perdiz, Euphorbiaceae.

**IN VITRO MICROPROPAGATION AND CONSERVATION OF *CROTON ANTISYPHILITICUS* MART.** Botucatu, 2011. 79p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: Bióloga Taíce Gonçalves de Oliveira

Adviser: Dra. Ana Maria Soares Pereira

## SUMMARY

*Croton antisiphiliticus* Mart. ex M. Arg. popularly “pé de perdiz” is a medicinal plant native from Cerrado, belonging to Euphorbiaceae family. The root is used popularly in the form of decoctions and “garrafadas” to combat males and females tract infections. The collection of the plant is carried through of extrativist form and it doesn’t have works regarding the conservation of the species. So, this study had as aimed to develop a micropropagation protocol to a multiplication in a large scale of *C. antisiphiliticus*, so that in future it is possible to develop a fitotherapeutic medicament from this species. Experiments had been developed of *in vitro* germination, micropropagation protocols and *in vitro* conservation of germoplasm. To determine the best condition for *in vitro* germination was evaluated the action of the fungicide Cercobin in the asepsis of the seeds. In the development of micropropagation protocol had been evaluated the effect of media MS, B5 and WP and the concentration of salts in plant development; the size of the container for the *in vitro* cultivation; the effect of the cytokinins BAP, kinetin, zeatin and 2ip in multiplication of explants; the combination of BAP with IAA in enhancing shoot; the influence of the auxin IBA on *in vitro* rooting; the co-cultivation; the bud position in relation to the shooting and; the effect of osmotic stress agents in minimal growth of explants of *C. antisiphiliticus*. The MS was the most efficient with its concentration reduced by half resulted in better development of plants *in vitro*. Plants grown in flasks showed better results. Many cytokinins had influence on the multiplication of the explants,

however, the BAP (1  $\mu$  M) was selected as the most efficient for multiplication. The combination of BAP with IAA didn't present weren't significant results in the increase of shoots. The explants also to present co-cultivation *in vitro* tolerance shown to be vigorous. The best bud position for multiplication is the apical. The MS medium without regulators was the most efficient in the rooting. The acclimatization of *C. antisyphiliticus* explants was possible without the roots presence developed in vitro. In order to in vitro germoplasm bank, the osmotic agents presence or absence used failed to ensure the majority survival of seedlings in this environment. So, it's possible to conclude that the micropropagation of the *C. antisyphiliticus* is viable and necessary to further research related to chemical and genetic aspects to find the elite genotypes for conservation.

---

Keywords: Cerrado, medicinal plant, pé-de-perdiz, Euphorbiaceae.

## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado possui uma flora riquíssima com imenso potencial terapêutico. Dentre as numerosas famílias de plantas encontradas no cerrado destaca-se a Euforbiaceae e em especial a espécie *Croton antisiphiliticus*, que é uma planta medicinal utilizada pela população para o tratamento de fungos, algumas doenças sexualmente transmissíveis e de infecções dos sistemas reprodutores feminino e masculino.

Não há até o presente momento estudos farmacológicos, químicos e agrônômicos para a referida espécie, sendo as informações existentes oriundas apenas de levantamentos etnobotânicos. Além disso, as preparações fitoterápicas são realizadas a partir da raiz, que ao ser coletada de forma extrativista compromete a existência das populações naturais e aumenta o risco de extinção e ou erosão genética da espécie.

Desse modo, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de propagação *in vitro* de *Croton antisiphiliticus*, visando corroborar com informações relevantes e inéditas que possam ser utilizadas para a conservação e multiplicação da espécie, tornando possível no futuro, o desenvolvimento de fitoterápicos a partir desta espécie de maneira sustentável.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Cerrado**

As zonas tropicais abrigam cerca de 2/3 da diversidade biológica mundial, distribuída principalmente nos países em desenvolvimento. Na América Tropical encontra-se 90.000 espécies de fanerógamas sendo que o Brasil abriga aproximadamente 60.000 espécies (VIEIRA e MARTINS, 2000).

O Cerrado está localizado principalmente no planalto central do Brasil, é o segundo maior bioma do País (KLINK e MACHADO, 2005; RIBEIRO e WALTER, 2008). De acordo com levantamento florístico para esse Bioma, a sua flora esta compilada em mais de 10 mil espécies vasculares (FELFILI et al., 2008). Sendo que, quarenta e quatro por cento dessa flora é endêmica, o que confere ao Cerrado o título da savana tropical mais diversificada do mundo (KLINK e MACHADO, 2005).

Os principais tipos de vegetação descritos para o bioma são enquadrados em: formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão); savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque do Cerrado, Palmeiral e Vereda) e campestres (Campo Sujo, Campo Limpo e Campo Rupestre) (RIBEIRO e WALTER, 2008).

O bioma possui como característica a presença de dois períodos climáticos bem definidos, uma estação das chuvas, quando ocorre mais de 90% da precipitação e uma estação de seca, com ausência quase total das chuvas e baixa umidade relativa. A média da precipitação total anual varia entre 1400 e 1700 mm, e a temperatura média anual oscila entre 18° e 25° C. De modo geral, os solos são profundos e bem drenados, de baixa fertilidade, como os latossolos e as areias quartzosas; que necessitam de correção e adubação para o uso agrícola (MANTOVANI e PEREIRA, 1998).

A metade dos 2 milhões de km<sup>2</sup> de cobertura original do bioma Cerrado está dominada por pastagens plantadas com gramíneas de origem africana (cerca de 600.000 km<sup>2</sup>) e com culturas anuais como soja, milho e algodão (cerca de 100.000 km<sup>2</sup>), o que resulta no processo de fragmentação do bioma (KLINK e MACHADO, 2005; KLINK et al., 2008). Esta ação antrópica tem gerado várias consequências danosas ao bioma como, por exemplo, a barreira e isolamento genético, introdução de espécies alóctones e efeito de borda (AQUINO e MIRANDA, 2008).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2010), o Cerrado teve sua cobertura vegetal original e a secundária reduzida de 2 038 953 km<sup>2</sup> para 1 052 708 km<sup>2</sup>, com área desmatada de 986 247 km<sup>2</sup> (48,37%) até 2008. Para Machado et al. (2004b), a situação do Cerrado é bastante crítica e preocupante e apesar do esforços do Ministério do Meio Ambiente – MMA em identificar áreas prioritárias para a conservação do bioma, essas ações não tem sido capazes de conter a tendência atual de utilização de áreas nativas, o que poderá causar a completa destruição do Cerrado até o ano de 2030, caso as tendências de ocupação continuem causando uma perda anual de 2,2 milhões de hectares dessas áreas.

Com o objetivo de minimizar a degradação do Cerrado por desmatamento e queimadas, o governo brasileiro lançou em setembro de 2010, um Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado, por meio da articulação de ações e parcerias entre os mais diversos âmbitos da sociedade brasileira (GOVERNO FEDERAL, 2010).

Estratégias de utilização sustentável do Cerrado tem sido descritas em

várias regiões do país, a exemplo do Barro no Mato Grosso do Sul (ARAKAKI et al., 2009) e de seis espécies de frutas do Cerrado no Norte de Minas (CARVALHO, 2007). Esses estudos relatam experiências locais na utilização dos recursos naturais de maneira sustentável.

Diante do exposto acima fica evidente a necessidade de ações que possam evitar ou reduzir a acelerada destruição do Cerrado, a partir de estratégias que visem o uso sustentável do bioma, e em particular dos recursos terapêuticos relacionadas à flora. O desenvolvimento de protocolos eficientes de micropropagação e o estabelecimento de Bancos de Germoplasma *in vitro* e *ex vitro* são estratégias importantes para abrandar o processo de erosão genética das espécies do *hotspot* Cerrado.

## 2.2 Plantas Medicinais e Fitoterápicos

Plantas medicinais são aquelas que administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercem algum tipo de ação farmacológica (FOGLIO et al., 2006).

Por longa data o uso terapêutico das plantas medicinais esteve associado a questões místicas, desconhecendo tanto a causa da doença como o funcionamento dessas drogas no desaparecimento dos sintomas e/ou cura das enfermidades. Nesse sentido, alguns estudiosos, com destaque para Paracelso (1493-1541), no intuito de procurar estabelecer uma relação entre ambas acabaram adotando a “doutrina da assinatura”. Segundo essa doutrina, Deus teria indicado qual o agente medicinal para determinada enfermidade através de um “sinal”, ou seja, uma semelhança entre a planta e o órgão ou doença a ser tratada. Assim, o açafrão teria ação sobre a icterícia por apresentar rizomas de coloração amarela. Essa “doutrina de assinatura” apesar de fundada na crença popular contribuiu significativamente para o desenvolvimento e progresso das ciências médicas (KOROLKOVAS, 1996).

Embora a utilização de plantas medicinais pela humanidade seja tão antiga quanto a sua própria origem, a maioria das espécies existentes no planeta são desconhecidas sob o ponto de vista científico. De aproximadamente 500 mil espécies de plantas identificadas botanicamente apenas 5% foram estudadas do ponto de vista fitoquímico

e uma porcentagem ainda menor foi avaliada sob os aspectos biológicos. Na atualidade a intensificação do uso de fitoterápicos em países desenvolvidos se deve ao avanço das técnicas espectroscópicas que têm contribuído com a elucidação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais com relevante ação farmacológica, a exemplo do taxol, forskolina, artemisinina, e vários fármacos como, a digoxina da *Digitalis* spp., quinina e quinidina da *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina da *Catharanthus roseus*, atropina da *Atropa belladonna* e morfina e codeína da *Papaver somniferum* (CECHINEL FILHO, 1998; RATES, 2001).

O mercado mundial de fitoterápicos vem apresentando expressivo crescimento, algo em torno de 22 bilhões de dólares/ano, devido ao desenvolvimento, cada vez maior, de processos de padronização, controle de qualidade de drogas vegetais e produtos farmacêuticos fitoterápicos, bem como o estabelecimento de critérios de eficácia e segurança destes produtos (CECHINEL FILHO, 1998; SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

O Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 instituído pelo Governo Federal estabeleceu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, visando oferecer ao Sistema Único de Saúde – SUS a possibilidade de tratamento com Plantas Medicinais e Fitoterápicos, conforme o disposto na Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Essa iniciativa tem estimulado estudos nas diversas áreas do conhecimento que envolvem as plantas medicinais além de retomar uma valorização a cerca do uso desta terapêutica.

No Brasil a 5ª ed. da Farmacopéia Brasileira lançada em dezembro de 2010, apresenta expressivo número de monografias de plantas medicinais as quais são contribuições relevantes para a normatização de metodologias adequadas para o controle de qualidade de fitoterápicos, isso terá significativa repercussão técnica, científica e política na área de desenvolvimento de medicamento no país (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

### 2.3 O Gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae é composta de 8000 espécies, distribuídas em 317 gêneros representada nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta (SÁTIRO e ROQUE, 2008). Estes estão agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias, segundo o sistema de classificação proposto por Webster (1994).

Levantamentos florísticos realizados no Brasil mostram que a família Euphorbiaceae é uma das mais ricas em número de espécies, com cerca de 1000, distribuídas em aproximadamente 80 gêneros. No Estado de São Paulo a família está representada por 37 gêneros e cerca de 160 espécies (CARUZO e CORDEIRO, 2007), além disso, é considerada uma das famílias de maior importância econômica (FRANÇA, 1997; CARNEIRO et al., 2002).

A subfamília Crotonoideae é formada por cerca de 2400 espécies agrupadas em 67 gêneros e 12 tribos (WEBSTER, 1994). O gênero *Croton* L. é o segundo maior e mais diverso, somando mais da metade das espécies da subfamília, cerca de 1.200, distribuídas predominantemente no continente americano (LIMA e PIRANI, 2008). O Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, com cerca de 300 espécies, que está representado nos mais variados ambientes e tipos vegetacionais (BERRY et al., 2005; SILVA et al., 2010).

O reduzido número de estudos com o gênero *Croton* se deve a sua complexidade taxonômica, o que tem levado alguns autores a considerá-lo como “gênero problema” (LIMA e PIRANI, 2008). Apesar disso, recentemente alguns trabalhos têm sido publicados enfatizando os aspectos da distribuição geográfica e chaves de identificação (CARUZO e CORDEIRO, 2007; SÁTIRO e ROQUE, 2008; LIMA e PIRANI, 2008; BINGTAO et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

## 2.4 A espécie *Croton antisiphiliticus*

### 2.4.1 Descrição Botânica

Domínio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta Cronquist, Takht. & W. Zimm. ex Reveal

Classe: Magnoliopsida Brongn.

Ordem: Malpighiales

Família Euphorbiaceae

Subfamília: Crotonoidae Johannes Müller Argoviensis [Müll.Arg.]

Tribo Crotoneae (Blume) Müll.Arg.

Gênero *Croton* (L.) Müll.Arg.

Seção *Eucroton* Müll.Arg.

Espécie *Croton antisiphiliticus* (Mart.) Müll.Arg. (FLORA BRASILIENSIS, 2010)

### 2.4.2 Taxonomia e habitat

A espécie *Croton antisiphiliticus* Mart. (Figura 1), conhecida popularmente como pé-de-perdiz, canela-de-perdiz, alcanforeira, herva-mular, alcânfora e cocaleira (MOREIRA, 1862; OLIVEIRA, 1854; CASTRO, 1878 *apud* FENNER, 2006; FORZZA et al., 2010) é um subarbusto ou erva (MUNHOZ e FELFILI, 2007; PAULA, et al., 2009), de ramos lenhosos, folhas lanceoladas, alternas, separadas por entrenós, eretas apoiadas por pecíolos; as flores são unissexuais, dispostas no ápice dos ramos em inflorescências espiciformes (FELFILI et al, 2007; SAINT-HILAIRE, 2009).



Figura 1: *Croton antisiphiliticus* (A) e detalhe da inflorescência (B).

#### 2.4.3 Distribuição geográfica da espécie

Ocorre nos estados de Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. É uma espécie nativa do bioma Cerrado, encontrada nas regiões de campo limpo, campo sujo e campos rupestres (FELFILI et al, 2007; MEDEIROS et al., 2008; FORZZA et al., 2010).

#### 2.4.4 Etnobotânica e etnofarmacologia

A espécie *C. antisiphiliticus* é citada em levantamentos etnobotânicos como uma das plantas mais utilizadas por comunidades regionais (SILVEIRA et al., 2008). As raízes e folhas são utilizadas na forma de decoctos e garrafadas, no tratamento de cólicas, reumatismos, contra sífilis, contra fungos, feridas de úlceras e inflamações em especial das vias genitais (VILA VERDE et al., 2003; (MOREIRA, 1862; OLIVEIRA, 1854; CASTRO, 1878 *apud* FENNER, 2006); TRESVENZOL et al., 2006; CAVÉCHIA e PROENÇA, 2007; SILVA et al., 2009) (Tabela1).

Tabela 1: Compilação de dados etnobotânicos e etnofarmacológicos sobre a espécie *C. antisiphiliticus*.

| Local                                   | Indicações                                                                                         | Parte usada              | Preparo             | Cuidados                                                  | Referência                                                                  |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Distrito Federal – DF                   | Inflamações uterinas                                                                               | Raiz                     |                     |                                                           | Barros, 1982                                                                |
|                                         | Anti-sifilítico, Anti-inflamatório, depurativo, czemas e reumatismo                                | Planta inteira           |                     |                                                           | Siqueira, 1982; Guarim Neto, 1987; Grandi et al., 1989; Vieira et al., 1998 |
| Luminária – MG                          | Problemas das vias urinarias, ovários, inchaço.                                                    |                          |                     |                                                           | <i>apud</i> Vieira e Martins, 2000.                                         |
|                                         |                                                                                                    |                          |                     | Não pode ser usada em machucado que não esta cicatrizado. | Rodrigues et al., 2002                                                      |
| Mossâmedes – GO                         | Anti-sifilítica, antiinflamatória, antireumática                                                   | Raiz e folhas            | Decoção, garrafada  |                                                           | Vila Verde et al., 2003                                                     |
|                                         | Feridas e Úlceras                                                                                  | Folhas frescas<br>Folhas |                     |                                                           | Moreira, 1862; Oliveira, 1854; Castro, 1878 <i>apud</i> Fenner et al., 2006 |
| Goiânia e cidades vizinhas - GO         | Infecções ginecológicas                                                                            | Raiz                     | Garrafada           |                                                           | Tresvenzol et al., 2006                                                     |
| Distrito Federal – Região de Planaltina | Antiinflamatório das vias genitais, cólica                                                         | Raiz e folhas            |                     |                                                           | Cavéchia e Proença, 2007                                                    |
| Alto Rio Grande - MG                    | Depurativo, anti-sifilítico, anti-inflamatório, nas úlceras eczemas, reumatismo e cancros venéreos | Toda planta              | Decocto ou infuso   |                                                           | Rodrigues e Carvalho, 2007                                                  |
| Indianópolis – MG                       | Cicatrização, infecção uterina e depurativo                                                        | Folhas ou raiz           | Decocção ou tintura |                                                           | Calábria et a.l, 2008                                                       |
| Jataí – GO                              | Infecções                                                                                          |                          | Garrafada           |                                                           | Silva et al., 2009                                                          |

#### 2.4.5 Atividade antimicrobiana

Os estudos relacionados à atividade antimicrobiana dessa planta são praticamente inexistentes, até o presente momento existe apenas um estudo realizado por Nader et al. (2010), que evidenciou a ação dos extratos clorofórmico e hexânico de *C. antisiphiliticus* sobre a multiplicação da bactéria *Staphylococcus aureus*, causadora da mastite bovina, promovendo melhor atividade inibitória e bactericida *in vitro*.

#### 2.4.6 Fitoquímica

Não há registros na literatura sobre estudos fitoquímicos realizados com a espécie *C. antisiphiliticus*, entretanto, foram relatadas em outras espécies do gênero *Croton* várias substâncias pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários como, por exemplo, as proantocianidinas, terpenos, alcalóides, flavonas, triterpeno lupeol e ésteres graxos do lupeol, os diterpenos ribenona, ácido caurenóico e a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol (PERES et al., 1997, ABREU et al., 2001, HILL et al., 2001, JONES, 2003, SALATINO et al., 2007).

### 2.5 Tecnologias *in vitro*

Alternativas que viabilizem a produção de plantas com propriedades terapêuticas cientificamente comprovadas, vêm sendo amplamente debatidas nos grupos de discussão sobre conservação de recursos naturais. A conservação *ex situ* em banco de sementes de plantas endêmicas do Cerrado é uma delas. No entanto, para espécies raras ou que apresentam sementes altamente predadas por insetos ou ainda para espécies cujo banco de sementes torna-se inviável (sementes recalcitrantes ou intermediárias), as tecnologias *in vitro* são indicadas. Essas tecnologias possibilitam a produção de centenas de plantas a partir de um

único explante, permitindo a conservação do genótipo através do desenvolvimento de duas tecnologias integradas, a micropropagação e o estabelecimento de banco de germoplasma *in vitro*, que são complementares aos bancos de sementes (MORAES et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010).

### 2.5.1 Micropropagação

A cultura de tecido é indicada para aquelas plantas que apresentam características botânicas que impeçam ou dificultam a propagação pelos meios clássicos (MELO et al., 2008).

Na atualidade a micropropagação vem sendo cada vez mais utilizada não apenas para propagar em larga escala genótipos de interesse comercial, mas também na limpeza clonal, por meio de cultivo de meristema apical, objetivando desinfetar plantas contaminadas por vírus (SOUZA et al., 2009b; NORTH, 2010 ).

A micropropagação é a técnica que permite a produção de plantas em larga escala, indicada para multiplicar clones elites (PEREIRA et al., 2007a). O estabelecimento da cultura *in vitro* depende da eficiência do processo de assepsia e adaptação dos explantes ao meio de cultura (MORAES et al., 2007).

Para a utilização da técnica de micropropagação alguns procedimentos básicos devem ser realizados como, seleção da planta matriz, nesse momento é importante considerar a sanidade e o estágio fisiológico da planta (juvenilidade) (SOUZA e PEREIRA, 2007; PAUNESCU, 2009) além do tipo do explante a ser utilizado na etapa inicial do cultivo *in vitro*, que podem ser folhas, cotilédones, caule, segmentos nodais, entre outros.

Na escolha do meio de cultivo deve-se considerar o meio basal que melhor atenda a necessidade nutricional da planta (sais minerais, fonte de carbono, vitaminas, aminoácidos), se necessário esse meio pode ser suplementados com reguladores vegetais, o que vai depender do nível endógeno de hormônio na planta e da fase do cultivo na qual ela se encontra. Apesar de não ser uma regra geral, a maioria dos estudos utilizam doses maiores de

citocininas para a produção de gemas e produção de múltiplas brotações, enquanto que para o enraizamento são utilizadas altas concentrações de auxinas. Em alguns casos as giberelinas são acrescentadas ao meio para promover o alongamento (FRANKLIN e DIXON, 1994; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; PEREIRA et al., 2003; CAMPOS et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010;).

As condições do ambiente também devem ser observadas. Para a maioria das espécies, o processo de incubação inicial é realizado em temperaturas entre 20 e 27°C, intensidade luminosa de 20 a 70  $25\mu\text{mol m}^2/\text{s}$  e fotoperíodo de entre 12 e 16 horas (SUNGKUMLONG e DEB, 2009; GONÇALVES et al., 2010; NORTH et al., 2010).

#### 2.5.1.1 Etapas Básicas da Micropropagação

Plantas com alta demanda comercial necessitam do estabelecimento de protocolo eficiente de micropropagação que possibilitem a multiplicação das mesmas em larga escala (NORTH et al., 2010).

De acordo com Werbrouck e Debergh (1994), a micropropagação geralmente envolve cinco etapas:

- a) Estágio preparativo – Preparo da planta para introdução do material *in vitro*; o material é cultivado de preferência em casa de vegetação, com condições controladas. Pode-se tentar melhorar a aptidão fisiológica das plantas matrizes utilizando reguladores de crescimento ou outros tratamentos.
- b) Iniciação das culturas – Introdução do material *in vitro*; deve-se escolher o explante mais adequado para a introdução *in vitro*, estabelecer o procedimento de assepsia, escolher o meio de cultura a ser utilizado inicialmente e determinar as melhores condições na sala de crescimento para o processo de cultivo *in vitro*.
- c) Multiplicação e alongamento do broto – Promover a proliferação de brotos; deve-se aumentar o número de gemas nos explantes ou regiões meristemáticas, promover se necessário o alongamento dos brotos e manter as plantas matrizes.

- d) Indução e desenvolvimento de raiz – promover se necessário o alongamento dos brotos e o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*.
- e) Aclimação – Transferência para condições de casa de vegetação; o objetivo desta fase é assegurar a sobrevivência das plântulas sob condição *ex vitro*.

#### 2.5.1.2 Reguladores vegetais

Os reguladores vegetais são amplamente utilizados na suplementação dos meios de cultura para suprir deficiências hormonais, e também estimular o desenvolvimento da planta durante todo o processo de micropropagação. O requisito para utilização de reguladores vegetais exógenos depende dos níveis endógenos na planta (WERBROUCK e DEBERGH, 1994).

Quando sementes são utilizadas como explantes iniciais, a germinação é normalmente realizada em meio nutritivo sem reguladores de crescimento ou simplesmente em água e ágar (MELO et al., 2008). Na fase de multiplicação, as citocininas são empregadas, principalmente para que ocorra a quebra da dominância apical induzindo a proliferação das gemas laterais (FRANKLIN e DIXON, 1994; NORTH et al., 2010). De modo geral, o suplemento de citocininas no meio de cultura determina o sucesso da etapa de multiplicação (MORAES et al., 2007).

A alta relação citocinina-auxina promove à formação de brotos, e o oposto ocasiona a diferenciação da raiz. Em alguns casos a indução de múltiplas brotações requer a combinação de citocinina e auxina, mas, isso não implica que seja necessário a presença concomitante de ambos no meio de cultura para que haja a formação de brotos (WERBROUCK e DEBERGH, 1994; MORAES et al., 2007).

As citocininas mais empregadas no cultivo *in vitro* das espécies do Cerrado são BAP (6-Benzilaminopurina), 2ip (Isopenteniladenina), cinetina e zeatina, em ampla faixa de concentração promovendo múltiplas brotações (SOUZA et al, 2003; MALOSSO, 2004). De modo geral o fitorregulador BAP deve ser o primeiro a ser testado, seguido do 2ip, e como última opção a zeatina em função do alto custo (WERBROUCK e

DEBERGH, 1994).

Na fase de enraizamento as auxinas são adicionadas ao meio de cultura, as mais utilizadas são ANA (ácido naftaleno acético) e AIB (ácido indolbutírico) (FRANKLIN e DIXON, 1994). Concentrações excessivas de auxina no meio podem gerar graves transtornos limitando a fase de enraizamento e podendo ser tóxica para a planta (SOUZA et al., 2004). Outros reguladores que não as auxinas podem comprometer a fase de enraizamento como, por exemplo, as citocininas, as giberelinas e o ácido abscísico inibindo a formação de raiz.

#### 2.5.2 Banco de Germoplasma

Banco de Germoplasma *in vitro* são unidades conservadoras de material genético sob condições de crescimento lento. A conservação dos recursos genéticos por meio de bancos de germoplasma pode ser mantida através de armazenamento de semente em câmara fria, coleções de plantas conduzidas a campo ou em casa de vegetação, em jardins botânicos, em arboretos e através de coleções de plântulas e tecidos mantidos sob condição *in vitro* ou ainda em sistema de criopreservação (VIEIRA, 2000; PEREIRA, et al., 2007b).

De modo geral Bancos Ativo de Germoplasma (BAG) estruturados são mantidos por universidades e empresas de pesquisas (EIRA et al., 1992; DINIZ e FERREIRA, 2000; LEMOS et al., 2002; CANTO et al., 2004; FERREIRA, 2005b; SOUZA et al., 2009b; GABR e SAYED, 2010; RANGSAYATORN et al., 2010; RITSCHER et al., 2010) e estas instituições têm por responsabilidade garantir a diversidade genética das coleções de germoplasma (seja pela iniciativa de coletar periodicamente recursos genéticos, seja por favorecer o intercâmbio com outros bancos de germoplasma), promover a sua caracterização molecular e/ou química por diferentes metodologias, multiplicar os acessos afim de mantê-los e disponibilizar os materiais conservados a comunidade científica interessada em desenvolver projetos de melhoramento (VIEIRA, 2000).

Segundo Pereira et al. (2007b), as principais atividades desenvolvidas

nos Bancos de Germoplasmas são: missões de coletas de materiais; se necessário multiplicação do material antes de introduzi-lo no banco; introdução de acessos; a conservação propriamente dita; caracterização morfológica, molecular e química; avaliação preliminar dos acessos conservados; regeneração; e multiplicação para utilização e distribuição. Essas informações são depois documentadas e disponibilizadas num sistema de base de dados.

Os acessos a serem conservados em Banco de germoplasma devem apresentar características químicas e agrônômicas superiores aos demais acessos, e ao mesmo tempo serem representantes da diversidade genética da espécie (MORAES et al., 2007; SOUZA et al., 2009b). As plantas conservadas *in vitro* são mantidas em condições físicas (temperatura e intensidade luminosa) e/ou químicas (meios de cultura com baixa concentração de sais, adição de agentes osmóticos e inibidores de crescimento) adequadas para que resistam a intervalos longos de repicagens (MALOSSO, 2004; SOUZA et al., 2009b). A conservação *in vitro* em função das condições físicas e químicas pode promover instabilidade genética que pode ser monitorada por marcadores moleculares (WITHERS e WILLIAMS, 1998; PAUNESCU, 2009).

No Brasil uma das iniciativas pioneiras no que se refere à conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em cultura de tecidos foi a criação, em 1987, do Banco de Germoplasma *in vitro* de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O Banco foi instalado a partir de recursos advindos da CEME (Central de Medicamentos - Ministério da Saúde) com objetivo de reunir o maior número possível de acessos de *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia* para disponibilizar à indústria de fitoterápico um amplo acervo de acessos dessas espécies. Em 2000, com a aprovação de vários projetos financiados pelo CNPq e Fapesp foram introduzidas dezenas de espécies medicinais do Cerrado e da Mata Atlântica na forma de plântulas e células. Posteriormente, em Janeiro de 2001 o banco foi ampliado mais uma vez, a partir de um projeto temático dentro do Programa Biota-Fapesp, cujo objetivo foi a introdução *in vitro* de espécies medicinais da família Bignoniaceae com atividade antitumoral. Atualmente, o banco de germoplasma conserva também espécies medicinais nativas de outras famílias, como por exemplo, Amaranthaceae, Asteraceae e outras. (ALVES et al., 2010; INÁCIO, 2010)

A Embrapa Amazônia Ocidental, em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA realizaram a instalação do banco de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas na Base Física da Embrapa em Manaus, entre as espécies escolhidas encontra-se duas espécies do gênero *Croton*, a sacaca (*Croton cajucara*) e a sacaquinha (*Croton sacaquinha*).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver um protocolo de micropropagação e conservação em banco de germoplasma *in vitro* para *Croton antisiphiliticus*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Os experimentos foram realizados com os seguintes objetivos:

1. Avaliar a germinação *in vitro* de *C. antisiphiliticus*;
2. Avaliar o efeito do meio basal na multiplicação e a influência da redução da concentração dos compostos do meio de cultura no desenvolvimento dos explantes *in vitro*;
3. Verificar a influência dos reguladores vegetais BAP, cinetina, zeatina e 2 ip na multiplicação de explantes de *C. antisiphiliticus*;
4. Avaliar a influência da associação dos reguladores vegetal BAP e AIA na

intensificação de brotações

5. Verificar a influencia do co-cultivo e do tipo de recipiente no desenvolvimento dos explantes *in vitro*;
6. Avaliar o efeito da posição da gema na produção de brotações múltiplas;
7. Avaliar o efeito do regulador AIB e do tempo de exposição deste regulador no enraizamento *in vitro*;
8. Estabelecer metodologia para aclimação de plântulas;
9. Determinar a conservação de germoplasma *in vitro* de *C. antisiphiliticus* através de agentes de estresse osmótico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condições gerais dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

As sementes foram coletadas em áreas de fragmento de Cerrado no município de Araxá, referenciadas por GPS (Latitude 19°48'53,6", longitude 46°24'18,3" e altitude 1121), em fevereiro de 2008 e a exsicata foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP e recebeu o voucher HPMU 1417. Os explantes tipo gema axilar e apical de *C. antisiphiliticus* utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* e multiplicadas *in vitro*.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 25µmol m<sup>2</sup>/s, fornecida por lâmpada fluorescente branca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott Knott 5% com o auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2005a).

## 4.2 Germinação de sementes *in vitro*

Sementes de *Croton antisiphiliticus* foram submetidas ao método densimétrico em água destilada de acordo com o seguinte procedimento: as sementes foram colocados em proveta contendo um litro de água destilada e agitadas com bastão por 3 minutos. Após meia hora aquelas localizadas no fundo do recipiente foram selecionadas como viáveis e as sobrenadantes foram descartadas.

As sementes viáveis foram submetidas à assepsia com, imersão em solução de Cercobin 1% (p/v) por 1 h sob agitação, posteriormente foram colocadas e solução álcool/ água 70% (v/v) por 1 min e em seguida imersas em solução de hipoclorito de cálcio 0,5% (p/v) por 30 min, também sob agitação. Após a assepsia superficial, as sementes foram lavadas com água destilada estéril e inoculadas em cubetas de vidro com 10 cm de altura e 2cm de diâmetro contendo 5 mL meio de cultura MS basal e mantidas em sala de crescimento.

Foram inoculadas 1.800 sementes distribuídas em 60 blocos de trinta cubetas. As sementes foram avaliadas a cada 3 dias, por 6 meses, quanto a porcentagem de germinação.

## 4.3 Escolha do meio basal

Os explantes (0,5 cm) foram inoculados nos seguintes meios:

M1 = MS + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

M2 = WP + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

M3 = B5 + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

Para definição do melhor meio basal, foram utilizadas 6 repetições

composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 30 dias.

O meio de cultura que apresentou os melhores resultados foi o escolhido como o meio base para os demais experimentos.

#### **4.4 Concentração de sais do meio basal**

Os explantes (0,5 cm) foram inoculados nos seguintes meios:

S0 - MS + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

S1 - MS/2 + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

S2 - MS/4 + 1,00 $\mu$ M BAP + 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® + 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose

Para definição da melhor concentração de sais do meio basal. Foram utilizadas 6 repetições composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 60 dias.

#### **4.5 Multiplicação *in vitro***

Os explantes (0,5 cm) foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel® , 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose e acrescidos ou não dos seguintes fitorreguladores: BAP, cinetina, Zeatina e 2ip nas concentrações de 0,50, 1,00, e 2,00 $\mu$ M.

Foram utilizadas 6 repetições composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 30 dias.

#### 4.6 Produção de múltiplas brotações

Este experimento foi realizado com uma gema por cubeta em meio de cultura MS suplementado com  $1,0\mu\text{M}$  de BAP associado ou não com AIA em diferentes concentrações (0,01, 0,10 e  $1,00\mu\text{M}$ )

Foram utilizadas 6 repetições compostas de 5 replicatas. A avaliação foi realizada aos 30 dias.

#### 4.7 Co-cultivo

Os explantes (0,5 cm) foram inoculados em frascos de 8 cm e  $\varnothing 5\text{cm}$  com meio de cultura MS suplementado com  $2\text{ gL}^{-1}$  Phytigel®,  $20\text{ gL}^{-1}$  de sacarose e  $1,0\mu\text{M}$  de BAP. Este experimento foi composto de dois tratamentos: frasco contendo 1 gema e outro contendo 5 gemas (Figura 2).

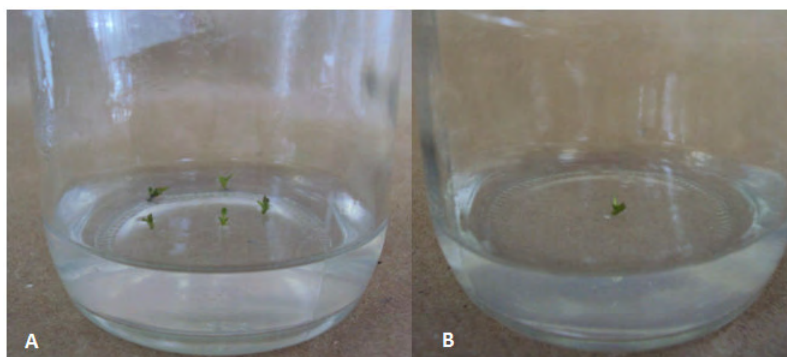


Figura 2: Frascos com meio de cultura MS suplementado com  $1,0\mu\text{M}$  de BAP, com cinco gemas (A) e uma gema(B) de *C. antisiphiliticus*.

Foram utilizadas 6 repetições composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 60 dias.

#### 4.8 Tipo de recipiente

Os explantes (0,5 cm) foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel®, 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose e 1,0μM de BAP.

Este experimento foi composto de dois tratamentos: frasco tipo cubeta medindo 10cm e Ø2cm com capacidade para 34mL e frasco tipo pote medindo 8cm e Ø5cm com capacidade para 160mL (Figura 3).

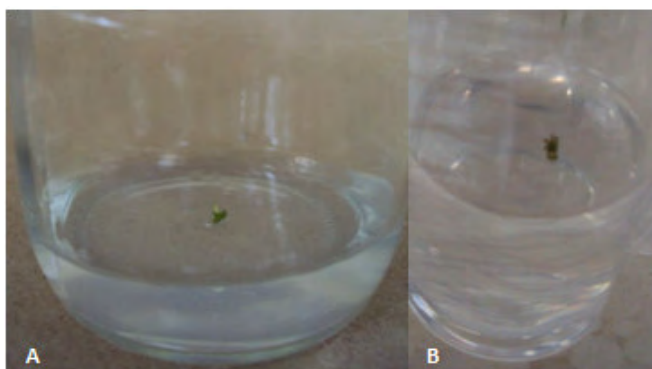


Figura 3: Tipos de recipientes utilizados no experimento: frasco do tipo pote (A) e do tipo cubeta (B).

Para definição do melhor recipiente, foram utilizadas 6 repetições composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 60 dias.

#### 4.9 Posição da gema

Os explantes oriundos da gema apical e da gema axilar localizada na parte basal na brotação (Figura 4) foram inoculados no meio MS suplementado com 1,00μM BAP

Foram utilizadas 6 repetições composta de 5 replicatas e a avaliação

foi realizada aos 60 dias.

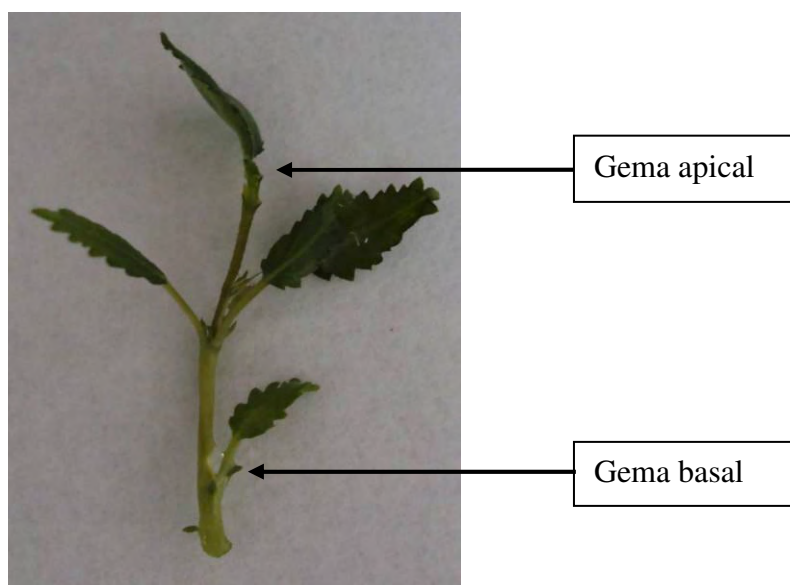


Figura 4: Posições de gemas de plantas de *C. antisiphiliticus* utilizadas no experimento.

#### 4.10 Enraizamento *in vitro*

Os explantes com duas gemas (basal e apical) foram transferidas para meio de cultura MS suplementado com 2 gL<sup>-1</sup> Phytigel®, 20 gL<sup>-1</sup> de sacarose com ou sem AIB por tempo de exposição alternado ao meio com fitorregulador conforme descrita abaixo

Os explantes foram mantidos no meio contendo 1, 2, 4, e 6μM de AIB por 5, 10, 15 e 30 dias, após esse período foram transferidos para o meio basal sem adição de regulador vegetal. Foram utilizadas 3 repetições composta de 5 explantes e a avaliação foi realizada aos 30 dias.

#### 4.11 Aclimação

Plantas multiplicadas *in vitro* sem raízes foram lavadas em água corrente até a retirada total de resíduos de Phytigel® e posteriormente plantadas em vaso contendo solo do Cerrado, autoclavado por 2 horas. Os vasos foram cobertos com saco de polietileno transparente e o fornecimento de água foi diário (10ml) vertido em recipiente raso alocado embaixo do vaso. Este foi mantido em condições controladas de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (70%). Uma semana após as transferências dos propágulos os sacos plásticos foram perfurados utilizando palitos de madeira (2,2mm) e aos cinquenta os sacos foram removidos totalmente.

Foram utilizados 3 repetições composta de 10 explantes e realizadas observações diárias quanto a sobrevivência das plântulas.

#### 4.12 Conservação de germoplasma *in vitro*

Explantes com uma gema foram inoculados em cubetas contendo meio de cultura MS suplementado com  $2,0 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel®, acrescido ou não de agentes de estresse osmótico em sala a  $18^{\circ}\text{C}$ , divididos nos seguintes tratamentos:

T0 = 2% de sacarose;

T1 = 2% de sacarose + 4% de sorbitol;

T2 = 2% de sacarose + 4% de manitol;

T3 = 2% de sacarose + 4% de sorbitol +  $2 \text{ mgL}^{-1}$  pantotenato de cálcio;

T4 = 2% de sacarose + 4% de manitol +  $2 \text{ mgL}^{-1}$  pantotenato de cálcio;

T5 = 2% de sacarose +  $2 \text{ mgL}^{-1}$  espermidina;

T6 = 2% de sacarose +  $4 \text{ mgL}^{-1}$  espermidina.

Foram utilizadas 6 repetições composta de 5 replicatas, a avaliação foi realizada 150 dias após a introdução do material em ambiente de banco de germoplasma

(18°C) e fotoperíodo de 12 horas de luz. Os parâmetros avaliados foram porcentagem de sobrevivência dos explantes, número de gemas, altura das brotações, porcentagem de enraizamento, número de raiz e tamanho da raiz.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Germinação de sementes *in vitro*

Sementes ao serem utilizadas como explantes, em geral, apresentam menor incidência de contaminação quando comparada a gemas retiradas de matrizes advindas diretamente do campo ou mantidas em casa de vegetação, além disso as sementes apresenta maior resistência ao processo de desinfestação (MELO et al., 2008).

A porcentagem de germinação das sementes inoculadas *in vitro* foi de 0,4% ( $\pm 0,08$ ), elas começaram a germinar a partir de 45 dias e não germinaram mais após 6 meses. A porcentagem de contaminação das sementes foi baixa (20%) sendo que dessa porcentagem 6% ( $\pm 1,2$ ) apresentaram fungos, 10% ( $\pm 4,72$ ) bactéria e 4% ( $\pm 0,8$ ) foram acometidas por contaminação mista (Figura 5).

A reduzida porcentagem de germinação de sementes de *C. antisiphiliticus* mostra que as mesmas apresentam dormência, considerando que toda semente que não germina no período de quatro semanas são enquadradas nesta categoria (BASKIN e BASKIN, 1998). Este fato evidencia a necessidade de realizar estudos futuros mais específicos que visem encontrar condições ideais de germinação destas sementes e ao mesmo tempo

mostra a importância de se estabelecer protocolo de micropropagação como uma alternativa viável de se propagar esta espécie em larga escala.

A porcentagem de germinação *in vitro* de *C. antisiphiliticus* foi muito inferior a de outras espécies nativas do Cerrado como por exemplo *Hancornia speciosa* (92,4%) (MACHADO et al., 2004a) e *Copaifera langsdorffii* Desf. (17%) (NOLETO; SILVEIRA, 2004). Vários fatores externos como temperatura, água, oxigênio e luz bem como os internos, entre eles os inibidores e os promotores de germinação influenciam nesse processo (MELO et al., 2008) e portanto como já afirmado acima o mecanismo de dormência encontrado nas sementes de *C. antisiphiliticus* precisam ser investigados.

Quanto a contaminação apresentada pelas sementes o mais provável é que tenha ocorrido infestação por manipulação inadequada na câmara de fluxo laminar em função das características morfológicas intrínsecas das sementes de *C. antisiphiliticus* como superfície lisa e ausência de reentrâncias.

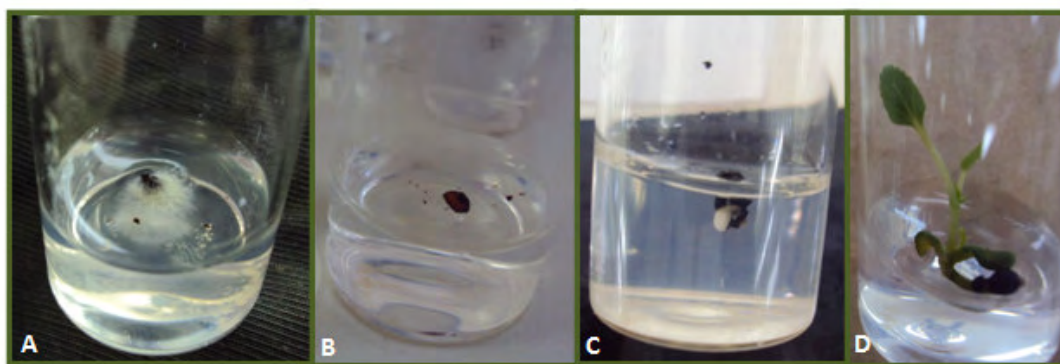


Figura 5: Sementes de *Croton antisiphiliticus*, cultivadas em cubetas com meio MS basal, suplementado com sacarose e phytigel®, contaminada (A), não germinada (B), germinada (C) e plântula (D).

## 5.2 Escolha do meio basal

Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais que influenciam diretamente no crescimento e controlam em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998, SOUZA et al., 2003).

Os explantes de *C. antisiphiliticus* cultivados por trinta dias, em meio B5 não sobreviveram, resultado diferente foi obtido com os explantes cultivados em meios MS e WP, os quais apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 80 e 90%, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os meios MS e WP em todos os parâmetros avaliados aos trinta dias (Tabela 2). No entanto, foi observado (dados não mostrados) na segunda avaliação aos 60 dias que todos os indivíduos mantidos no meio de cultura WP morreram. Espécies de outras famílias e gêneros cultivadas *in vitro* como, por exemplo, *Tainia latifolia*, *Baccharis tridentata*, *Cabralea canjerana*, *Phyllanthus stipulatus*, *codiaeum variegatum* tiveram também melhor desenvolvimento em meio MS do que B5 e WP (CATAPAN et al., 2001; KAJIKI e SHEPHERD, 2006; ROCHA et al., 2007; NASIB et al., 2008; SUNGKUMLONG e DEB, 2009).

A principal diferença no teor de macronutrientes entre os meios WP, B5 e MS é que o último apresenta maiores níveis de nitrogênio e segundo alguns autores a presença deste elemento é um fator determinante no crescimento dos vegetais, além de ser um promotor de embriogênese somática em algumas espécies e estimulador de organogênese em outras (FRANKLIN e DIXON, 1994; CALDAS et al., 1998) (Anexo 1).

Tabela 2: Efeito do meio basal na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| Meio | % calos | % sobreviv. | nº broto | nº gema | Altura brotação |
|------|---------|-------------|----------|---------|-----------------|
| MS   | 70,00a  | 80,00a      | 1,16a    | 2,22a   | 0,54a           |
| WP   | 76,67a  | 90,00a      | 1,07a    | 2,82a   | 0,63a           |
| B5   | 0       | 0           | 0        | 0       | 0               |
| CV   | 11.13   | 11.76       | 6.14     | 22.20   | 34.42           |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

### 5.3 Concentração de Sais

A alta concentração de sais do meio MS pode ser inadequada ao processo morfogênico de algumas espécies, para isso muitas modificações têm sido sugeridas com intuito de melhor adaptação das culturas *in vitro* e ao mesmo tempo redução dos custos (JESUS et al., 2003).

Os explantes de *C. antisiphiliticus* cultivados em meio MS/2 apresentaram o melhor resultado quanto ao número de gema (2,41), em relação ao MS na concentração original (1,88) e o MS/4 (1,53). Quanto à altura das brotações não houve diferença significativa entre MS e MS/2 (Tabela 3) o mesmo resultado foi observado com trabalho realizado com *Baccharis tridentata* cujo meio MS foi mais eficiente para promover alongação das brotações do que MS/2 e MS/4 (KAJIKI e SHEPHERD, 2006).

Em relação à porcentagem de calos a redução da concentração de todos os elementos do meio de cultura MS não foi eficiente para reduzir a proliferação dos mesmos, todos os tratamentos apresentam elevada porcentagem de calos na base não diferindo estatisticamente entre si.

A resposta de sobrevivência dos explantes de *C. antisiphiliticus* aos

meios MS e MS/2 foram superiores em relação ao MS/4. De modo geral, o solo do Cerrado é considerado pobre em macro e micronutrientes e as espécies nativas deste bioma apresentam boa adaptabilidade a essa condição. Apesar disso, a redução do MS/2 para MS/4 certamente ultrapassou a capacidade da espécie *C. antisyphiliticus* de resistir às deficiências nutricionais do último meio.

Assim, podemos concluir que o meio MS reduzido a metade é o mais indicado para a multiplicação de *C. antisyphiliticus*, esse resultado corrobora com vários trabalhos realizado com outras plantas do cerrado a exemplo de *Kielmeyera coriacea* (PINTO et al., 1994), *Anacardium occidentale* (BOGGETTI et al., 1999) além das espécies *Sinnigia speciosa* (ARAÚJO et al., 2004), *Vriesea inflata* (PEDROSO et al., 2010).

Tabela 3: Efeito da concentração de sais no número de gemas, porcentagem de calos, altura da brotação e na porcentagem de sobrevivência aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| Meio | nº gema | Altura brotação | % calos | % sobrev.          |
|------|---------|-----------------|---------|--------------------|
| MS   | 1,88b   | 0,78a           | 91,67a  | 70,00a             |
| MS/2 | 2,41a   | 1,05a           | 85,00a  | 78,33 <sup>a</sup> |
| MS/4 | 1,53c   | 0,43b           | 90,00a  | 45,00b             |
| CV   | 5.09    | 23.72           | 11.86   | 11.17              |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

#### 5.4 Multiplicação *in vitro*

As citocininas participam de muitos processos celulares, sendo que o controle da divisão celular é o central, participando assim, do alongamento e diferenciação

celular, principalmente quando interagem com as auxinas (TAIZ e ZEIGER, 2009). A adição de citocininas é favorável ou em alguns casos é essencial para o desenvolvimento de explantes *in vitro* e a concentração utilizada depende da espécie e tipo de explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os reguladores apresentaram diferença significativa nas concentrações utilizadas conforme é mostrado na Figura 6. As citocininas BAP (1,0 e 2,0 $\mu$ M) e cinetina (0,5 e 1,0  $\mu$ M) apresentaram os melhores resultados quanto ao número de brotações 1,72 e 1,97 e 2,00 e 1,81, respectivamente (Tabela 4). Estes resultados foram semelhantes ao encontrados por Souza et al. (2008), que ao avaliarem diferentes citocininas na multiplicação de *Eugenia uniflora* constataram que o maior número de brotos (2,33 – 2.44) foi produzido em meio de cultura contendo BAP, o mesmo fitorregulador foi também o que mais induziu formação de brotos em explantes de *Myracrodruon urundeuva* cultivados *in vitro* (ANDRADE et al., 2000). Convém ressaltar que esta citocinina pode responder de maneira não favorável ao desenvolvimento *in vitro* de outras espécies, um exemplo disso foi demonstrado com explantes de *Copaifera langsdorfii* que não apresentaram nas concentrações avaliadas de BAP o aumento no número de brotos como o esperado (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

Quanto à altura das brotações os melhores resultados foram obtidos com a Zeatina na concentração de 2,0 $\mu$ M (1,49) e com BAP na concentração de 0,5 $\mu$ M (1,25). Embora a citocinina zeatina tenha mostrado o melhor resultado quanto a altura das brotações de *C. antisyphiliticus* sugere-se que seja utilizado o BAP para promover o alongamento das brotações por ser um fitorregulador mais barato e ter se mostrado semelhante eficiência.

As citocininas 2ip, BAP e zeatina na concentração de 1 $\mu$ M apresentaram em média três gemas por explante. Um trabalho realizado *in vitro* por Biondo et al. (2007) com *Mandevilla velutina*, uma espécie do Cerrado, mostrou resultado diferente do encontrado *C. antisyphiliticus*, ou seja entre as citocininas zeatina, 2ip e BAP apenas a última, na concentração de 0,44 $\mu$ M, mostrou-se eficiente na multiplicação do número de gemas (6,7 gemas/brotação).

Quanto a presença de calos na base dos explantes as citocininas zeatina (0,5 e 1,0 $\mu$ M) e 2ip (1,0 e 2,0 $\mu$ M) foram as que promoveram as menores porcentagem de

calos 17 e 27% e 20 e 27%, respectivamente. Porém, foi observado durante o estudo que a formação de calos na base dos propágulos de *C. antisiphiliticus* não interferiu no desenvolvimento dos explantes *in vitro*.

Tabela 4: Efeito da adição das citocininas, BAP, 2ip, cinetina e zeatina em diferentes concentrações na porcentagem de calos, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| Parâmetros         |              | Regulador Vegetal |        |          |         |
|--------------------|--------------|-------------------|--------|----------|---------|
| analisados         | Concentração | 2ip               | BAP    | CINETINA | ZEATINA |
| n° brotos          | 0,0          | 1,17aA            | 1,17bA | 1,17bA   | 1,17aA  |
|                    | 0,50         | 1,46aA            | 1,25bA | 1,93aA   | 1,42aA  |
|                    | 1,00         | 1,05aB            | 1,72aA | 1,81aA   | 1,24aB  |
|                    | 2,00         | 1,05aB            | 1,97aA | 1,45bB   | 1,12aB  |
| altura<br>brotação | 0,0          | 0,45aA            | 0,45bA | 0,45aA   | 0,45cA  |
|                    | 0,50         | 0,89aA            | 1,25aA | 0,63aA   | 0,70cA  |
|                    | 1,00         | 0,67aA            | 0,79bA | 0,44aA   | 1,00bA  |
|                    | 2,00         | 0,59aB            | 0,43bB | 0,31aB   | 1,49aA  |
| n° gemas           | 0,0          | 1,59bA            | 1,59bA | 1,59aA   | 1,59bA  |
|                    | 0,50         | 2,04bA            | 3,00aA | 1,57aA   | 2,26bA  |
|                    | 1,00         | 2,98aA            | 2,90aA | 1,89aA   | 3,02aA  |
|                    | 2,00         | 2,57aB            | 1,62bB | 1,63aB   | 3,85aA  |
| % calos            | 0,0          | 57bA              | 57aA   | 57aA     | 57bA    |
|                    | 0,50         | 40bA              | 47aA   | 43aA     | 17aA    |
|                    | 1,00         | 20aB              | 73aA   | 43aB     | 27aB    |
|                    | 2,00         | 27aB              | 80aA   | 47aB     | 43bB    |

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

A citocinina BAP na concentração 1,0 $\mu$ M promoveu 5,03 de taxa de multiplicação (n°broto x n° gema), sendo o maior valor em relação a todos os outros fitorreguladores (Tabela 5). A taxa de multiplicação é um parâmetro importante porque possibilita verificar a velocidade do processo de propagação *in vitro* (SANTOS et al., 2006).

Conclui-se que a citocinina zeatina (2,0 $\mu$ M) é o fitorregulador mais indicado para promover a multiplicação de explantes de *C. antisiphiliticus*, seguido pelo BAP (1,0 $\mu$ M). A escolha entre um ou outro fitorregulador para produção em escala de propágulos de *C. antisiphiliticus* dependerá de avaliação de custo-benefício.

Tabela 5: Valores da taxa de multiplicação para as citocininas, BAP, 2ip, cinetina e zeatina em diferentes concentrações aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| Concentração | Taxa de multiplicação (n°broto x n° gema) |       |          |         |
|--------------|-------------------------------------------|-------|----------|---------|
|              | Reguladores                               |       |          |         |
|              | 2ip                                       | BAP   | CINETINA | ZEATINA |
| 0,0          | 1,88a                                     | 1,88b | 1,88a    | 1,88a   |
| 0,50         | 2,77a                                     | 3,69b | 3,49a    | 3,23a   |
| 1,00         | 3,11b                                     | 5,03a | 3,15b    | 3,70b   |
| 2,00         | 2,73b                                     | 3,14b | 2,31b    | 4,29a   |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

### 5.5 Produção de brotações múltiplas

Segundo Paiva e Aloufa (2009), o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento podem intensificar a proliferação de brotos e gemas *in vitro*. Estudos mostram que a combinação de auxinas e citocininas é decisiva no controle da morfogênese *in vitro* e podem possibilitar maior indução e desenvolvimento de brotação em

explantes cultivados *in vitro* (SANTANA, 2008; CAMPOS et al., 2007; SANTOS et al., 2006; SUNGKUMLONG e DEB, 2009)

A suplementação de várias concentrações de AIA no meio MS suplementado com 1,0 $\mu$ M de BAP não diferiu estatisticamente em relação à porcentagem de sobrevivência, altura das brotações, número de gemas e de brotos (Tabela 6). Quanto à presença de calos, foi observado que quanto maior o teor de AIA utilizado maior foi a proliferação dos calos na parte aérea dos explantes, este resultado, de certa forma, já era esperado, pois a ação do AIA sobre a proliferação celular é uma das respostas mais previsíveis em experimentos com cultura de tecido.

Estudos realizados *in vitro* com as espécies *Sinningia allagophylla*, *Myracrodruon urundeuva* e *Tainia latifolia* mostraram resultados semelhantes aos encontrados com *C. antisiphiliticus* (ALMEIDA e SHEPHERD, 1999; ANDRADE et al., 2000; SUNGKUMLONG e DEB, 2009).

Em relação a taxa de multiplicação a associação de AIA (0,01 $\mu$ M) e BAP mostrou melhor resultado (4,32) em relação as demais concentrações (Tabela 6). No entanto, esse número foi inferior ao encontrado no experimento de multiplicação (item 5.6). Desse modo, a associação de AIA e BAP não se mostrou vantajosa para intensificar o número e brotações em explantes de *C. antisiphiliticus*.

Tabela 6: Influência da adição da auxina AIA no meio MS basal suplementado com 1µM de AIB na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos, na altura da brotação e na taxa de multiplicação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| <b>Regulador</b> | <b>%<br/>calos</b> | <b>%<br/>sobrev.</b> | <b>nº<br/>gema</b> | <b>nº<br/>broto</b> | <b>Altura<br/>brotação</b> | <b>Taxa de<br/>multiplicação</b> |
|------------------|--------------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Controle         | 33,33a             | 76,67a               | 2,03a              | 1,00a               | 0,70a                      | 2,03b                            |
| 0,01µM AIA       | 73,33b             | 90,00a               | 2,40a              | 1,80a               | 0,69a                      | 4,32a                            |
| 0,1µM AIA        | 66,67b             | 93,33a               | 2,46a              | 1,03a               | 0,67a                      | 2,53b                            |
| 1,0µM AIA        | 73,33b             | 93,33a               | 1,13a              | 1,00a               | 0,32a                      | 1,13c                            |
| CV               | 28,47              | 11,32                | 36,62              | 37,57               | 54,81                      | 22,15                            |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

## 5.6 Co-cultivo

Entre as principais causas de perdas em culturas é a competição entre as plantas pelos recursos disponíveis no meio ambiente. Essa disputa em condições *in vitro* torna-se um importante parâmetro físico que influencia no crescimento das microplantas durante a micropropagação (SARKAR et al., 1997; PEREIRA et al., 1999).

Os explantes de *C. antisiphiliticus* cultivados em número de um ou cinco por recipiente não apresentaram diferença estatística em relação à porcentagem de calos e de sobrevivência, número de brotos e altura das brotações, entretanto aqueles que foram co-cultivados mostraram-se mais robustos (Figura 7). Este resultado corrobora com os dados obtidos por Pereira et al. (1999) que não obtiveram diferença estatística no número de brotos em relação aos explantes cultivados isoladamente ou em co-cultivo das espécies *Cephaelis ipecacuanha* e *Eclipta alba*.



Figura 6: Explantes de *C. antisiphiliticus* cultivados em frasco do tipo pote de modo isolado e em co-cultivo.

No entanto, para o número de gemas de *C. antisiphiliticus*, houve diferença entre os tratamentos, o cultivo de um explante por frasco apresentou valor superior (4,80) em relação ao co-cultivo com 5 explantes por frasco (3,22) (Tabela 7).

Tabela 7: Efeito do co-cultivo na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

|                 | % calos | % sobreviv. | nº gema | nº broto | Altura brotação |
|-----------------|---------|-------------|---------|----------|-----------------|
| Pote Grupo      | 72,00a  | 97,33a      | 3,22b   | 1,21a    | 1,22a           |
| Pote Individual | 53,33a  | 100,00a     | 4,80a   | 1,27a    | 1,51a           |
| CV              | 22,26   | 1,66        | 7,01    | 14,43    | 12,11           |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

A influência do co-cultivo no desenvolvimento de explantes *in vitro* esta relacionada ao tempo de permanência dos propágulos no meio de cultura. Um trabalho realizado por Sarkar et al. (1997) com duas variedades de batata mostrou que o cultivo isolado de 1 explante por frasco e o co-cultivo de 5 explantes por frasco apresentou positiva diferença nas duas primeiras semanas e não diferiu mais após quatro semanas de avaliação.

Concluí-se que apesar dos resultados com *C. antisiphiliticus* terem mostrado que na maioria dos parâmetros avaliados não houve diferença estatística entre os explantes cultivados de modo isolado e os co-cultivados, é mais vantajoso estabelecer um protocolo de multiplicação com co-cultivo dos explantes, pois isso otimiza o espaço na sala de crescimento, reduz gastos com meios de cultura e reguladores e acelera o processo de repicagem viabilizando a produção em escala a nível de bio-fábrica.

## 5.7 Tipo de recipiente

O tipo de frasco e a quantidade de meio são variáveis que interferem diretamente no crescimento e desenvolvimento das culturas, no entanto, não são amplamente avaliadas em estudos de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A influência do tipo de recipiente no desenvolvimento dos propágulos foi avaliada aos 60 dias e o frasco tipo pote apresentou os melhores resultados quanto ao número de gemas (4,80) e altura das brotações (1,51) quando comparado ao frasco tipo cubeta (Tabela 8). Esses dados corroboram com os estudos realizados com *Pfaffia glomerata* que mostram ser os recipientes grandes (25cm e Ø2cm) mais adequados para o crescimento em biomassa do que frascos menores (15cm e Ø2,5cm) (NICOLOSO e ERIG, 2002).

Em relação ao número de brotos, porcentagem de calos e de sobrevivência, não houve diferença estatística significativa entre os tipos de frascos avaliados. Apesar da não observância de diferenças estatísticas entre os tratamentos, os propágulos desenvolvidos em frasco tipo pote obtiveram valores superiores àqueles crescidos em cubetas, além disso se mostraram mais robustos (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito do tipo do recipiente na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos e na altura da brotação aos 60 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| Tipo do frasco | % calos | % sobreviv. | nº gema | nº broto | Altura brotação |
|----------------|---------|-------------|---------|----------|-----------------|
| Pote           | 53,33a  | 100,00a     | 4,80a   | 1,27a    | 1,51a           |
| Cubeta         | 73,33a  | 93,33a      | 1,60b   | 1,15a    | 0,46b           |
| CV             | 18,23   | 8,45        | 8,84    | 10,28    | 18,15           |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

O sucesso do cultivo em recipiente do tipo pote pode estar relacionado ao fato do frasco apresentar maior área para a planta crescer, além disso, há uma maior disponibilidade de ar o que pode intensificar as reações de fotossíntese, permitindo assim maior desenvolvimento das plantas cultivadas nesses recipientes.

Assim, conclui-se que o recipiente tipo pote é o indicado para o cultivo *in vitro* de explantes de *C. antisiphiliticus*.

## 5.8 Posição da gema

Em função da totipotência, teoricamente, qualquer tecido vegetal, pode ser usado como explante para iniciar a micropropagação. No entanto, na prática procura-se utilizar explantes com maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência. Para a propagação *in vitro* os explantes mais indicados são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados, por terem crescimento vegetativo determinado e apresentarem capacidade de se desenvolverem normalmente quando supridas suas necessidades nutricionais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os experimentos com gema apical e axilar basal de *C. antisiphiliticus* avaliados aos 60 dias apresentaram diferença estatística em relação a porcentagem de

sobrevivência, número de gemas, altura da brotação e taxa de multiplicação (Tabela 9). Respostas semelhantes foram encontradas em estudo realizado com *Passiflora edulis*, cujos os explantes advindos da gema apical ou das proximidades desta apresentaram melhores respostas, do que aqueles oriundos da gema basal ou mais próximos da mesma (ALEXANDRE et al., 2008), e em estudo realizado com *Cordia verbenacea* cuja a gema apical originou maior número de gemas (2,6) e maior comprimento (10,5 mm) (LAMEIRA e PINTO, 2006). Outros estudos mostram resultados diferentes, ou seja, os segmentos nodais foram os explantes que apresentaram melhores resultados (PINTO et al., 1994; NOLETO e SILVEIRA, 2004; NICOLOSO e ERIG, 2002; PAIVA e ALOUFA, 2009; GONÇALVES et al., 2010).

Tabela 9: Efeito da posição da gema apical e basal na porcentagem de calos e de sobrevivência, no número de gemas e brotos, na altura da brotação e na taxa de multiplicação aos 30 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2010.

| <b>Posição da gema</b> | <b>% calos</b> | <b>% sobrev.</b> | <b>nº gema</b> | <b>nº broto</b> | <b>Altura brotação</b> | <b>Taxa de multiplicação</b> |
|------------------------|----------------|------------------|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------|
| Apical                 | 60,00a         | 100,00a          | 2,23a          | 1,20a           | 0,72a                  | 2,70a                        |
| Basal                  | 53,33a         | 76,67b           | 1,27b          | 1,27a           | 0,31b                  | 1,69b                        |
| CV                     | 47,24          | 9,24             | 21,03          | 14,95           | 19,61                  | 7,08                         |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

Conclui-se com esse experimento que a gema apical é o explante mais indicado para intensificar a multiplicação *in vitro* de *C. antisiphiliticus*.

## 5.9 Enraizamento *in vitro*

Um dos fatores mais limitantes no processo de micropropagação de plantas do Cerrado é a indução de raízes adventícias (KAJIKI e SHEPHERD, 2006; MORAES et al., 2007). O sucesso no enraizamento depende de vários fatores entre eles, da vitalidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, dos níveis de auxina endógena, da concentração de auxina exógena e do tempo de exposição dos explantes a mesma, da presença de substâncias como carvão ativado que diminuem a liberação de compostos fenólicos, além de condições ambientais entre outros inúmeros fatores (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; SOUZA et al., 2004; MORAES et al., 2007; SOUZA et al., 2007). De modo geral plantas herbáceas enraízam com maior facilidade quando comparadas com as espécies lenhosas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As auxinas ANA e AIB são as mais utilizadas nos trabalhos de enraizamento *in vitro* devido a estabilidade em relação a outros fitorreguladores, a exemplo do AIA (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; SOUZA et al., 2007) e a rizogênese varia de acordo com a espécie estudada (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

O fitorregulador AIB foi a auxina escolhida para o desenvolvimento do experimento de enraizamento *in vitro* de *C. antisyphiliticus* em função da realização de experimentos prévios com ANA e AIB (dados não mostrados) e por este último ter apresentado resultados superiores quanto ao enraizamento.

O meio MS basal sem fitorregulador produziu a maior porcentagem de enraizamento (80,0%) e a exposição das microestacas de *C. antisyphiliticus* a 1  $\mu$ M de AIB por dez dias foi o tratamento que promoveu maior número de raízes (1,75) (Tabela 10). Apesar de ter ocorrido enraizamento nas microestacas de *C. antisyphiliticus* o desenvolvimento das raízes não foi expressivo, sendo 0,30 cm o maior tamanho observado.

Resultado semelhante ao encontrado com *C. antisyphiliticus* foi relatado por SOARES et al. (2007), que obtiveram baixa porcentagem de enraizamento *in vitro* (20%) com microestacas de *Hancornia speciosa*, quando estas foram exposta por 15 dias a meio suplementado com AIB (SOARES et al., 2007).

Embora o presente trabalho não tenha apresentado bons resultados quanto ao desenvolvimento de raízes de microestacas de *C. antisiphiliticus* expostas a diferentes concentrações de auxina e variados tempos de exposição, há trabalhos que mostram a efetividade desse procedimento no enraizamento de explantes *in vitro*, de outras espécies do cerrado, a exemplo de *Mandevilla illustris* e *Lychnophora pinaster* quando as microestacas destas permaneceram 15 dias na presença da auxina ANA (SOUZA et al., 2004; 2009a) e também com as microestacas de *Jatropha elliptica*, que na presença de meio de cultura suplementado com ANA, no tempo de exposição de 5 dias, obtiveram resultados eficientes no enraizamento (CAMPOS et al., 2007).

As microestacas de *C. antisiphiliticus* mantidas em contato com diferentes concentrações de AIB, além de terem apresentado uma resposta inferior ao controle, quanto à porcentagem de enraizamento, mostraram-se amareladas com intensa formação de calos e aspectos de senescência, revelando que em todas as concentrações utilizadas houve algum nível de toxicidade, certamente em função dos explantes já apresentarem elevada concentração de auxina endógena (Figura 7). Vários trabalhos descritos na literatura relatam também o enraizamento de explantes em meio de cultura sem a adição de reguladores (DINIZ et al., 2006; KAJIKI & SHEPHERD, 2006; LAMEIRA e PINTO, 2006; SOUZA et al., 2009a; GONÇALVES et al., 2010).



Figura 7: Explantes de *C. antisiphiliticus* em meio MS, suplementado com AIB com aparência amarelada com provável nível tóxico de auxina (A) e sem adição de reguladores (B).

Tabela 10: Efeito da adição de IBA na porcentagem de enraizamento, número e tamanho das raízes, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011

|                 | Concentração | Dias         |              |              |              | CV %         |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                 |              | 5            | 10           | 15           | 30           |              |
| % enraizamento  | 0µM AIB      | 80,00aA      | 80,00aA      | 80,00aA      | 80,00aA      | <b>0,00</b>  |
|                 | 1µM AIB      | 53,00bA      | 66,67bA      | 40,00bA      | 40,00bA      | <b>22,17</b> |
|                 | 2µM AIB      | 33,33cB      | 6,67eC       | 33,33bB      | 46,67bA      | <b>16,69</b> |
|                 | 4µM AIB      | 10,00dD      | 40,00cA      | 33,33bB      | 26,67cC      | <b>11,74</b> |
|                 | 6µM AIB      | 33,33cA      | 33,33dA      | 13,33cB      | 6,67dB       | <b>20,03</b> |
|                 | CV %         | <b>10,65</b> | <b>6,39</b>  | <b>23,72</b> | <b>12,09</b> |              |
|                 | Concentração | Dias         |              |              |              | CV %         |
|                 |              | 5            | 10           | 15           | 30           |              |
| Número de raiz  | 0µM AIB      | 1,08aA       | 1,08bA       | 1,08aA       | 1,08aA       | <b>0,00</b>  |
|                 | 1µM AIB      | 1,00aB       | 1,75aA       | 1,00aB       | 1,00aB       | <b>10,53</b> |
|                 | 2µM AIB      | 1,11aA       | 0,67bA       | 1,33aA       | 1,11aA       | <b>15,02</b> |
|                 | 4µM AIB      | 0,67aA       | 1,00bA       | 1,00aA       | 0,78aA       | <b>19,76</b> |
|                 | 6µM AIB      | 1,00aA       | 1,00bA       | 0,67aA       | 0,33aA       | <b>19,29</b> |
|                 | CV %         | <b>27,00</b> | <b>25,93</b> | <b>36,21</b> | <b>48,19</b> |              |
|                 | Concentração | Dias         |              |              |              | CV %         |
|                 |              | 5            | 10           | 15           | 30           |              |
| Tamanho da raiz | 0µM AIB      | 0,21aA       | 0,21aA       | 0,21aA       | 0,21aA       | <b>0,00</b>  |
|                 | 1µM AIB      | 0,19aB       | 0,30aA       | 0,10bB       | 0,15aB       | <b>23,04</b> |
|                 | 2µM AIB      | 0,17aA       | 0,22aA       | 0,22aA       | 0,23aA       | <b>7,12</b>  |
|                 | 4µM AIB      | 0,15aA       | 0,15aA       | 0,12bA       | 0,12bA       | <b>6,87</b>  |
|                 | 6µM AIB      | 0,17aA       | 0,11aA       | 0,10bA       | 0,03cA       | <b>5,02</b>  |
|                 | CV %         | <b>33,64</b> | <b>47,21</b> | <b>32,91</b> | <b>37,49</b> |              |

Considerando que há na literatura alguns estudos mostrando alternativas viáveis para estimular o crescimento de raízes produzidas *in vitro*, como a adição de carvão ativo no meio (SILVA et al., 2008) e também uso de diferentes tipos de vedação das cubetas (SANTANA et al., 2008) recomenda-se que novos experimentos sejam realizados no futuro com microestacas de *C. antisiphiliticus* visando otimizar a fase de enraizamento.

Diante do exposto acima, conclui-se que para o enraizamento *in vitro*

da espécie de *C. antisiphiliticus* o meio de cultura sem adição de reguladores é o mais indicado para promover a indução de raízes.

### 5.10 Aclimação

O processo de aclimação de plântulas mantidas *in vitro*, é considerada como uma fase crítica e, em alguns casos, representa um fator limitante da micropropagação. Plântulas produzidas *in vitro*, com ou sem raiz, são aclimatadas em casa de vegetação. No entanto, a presença de raízes é sempre desejável por conferir vigor às plântulas, além de contribuir para a superação do estresse ocasionado pela mudança da condição heterotrófica para a autotrófica. Os principais fatores que interferem no processo de aclimatização são a umidade, a temperatura e o tipo de substrato utilizado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; SOUZA et al., 2004; MORAES et al., 2007).

A aclimação de microestacas de *C. antisiphiliticus* apresentou índice de sobrevivência de 63,34% (Figura 8). O sucesso da aclimação pode ser atribuído a associação dos seguintes fatores: uso de solo de cerrado autoclavado e controle de temperatura e umidade. Estes fatores certamente facilitaram a passagem da condição heterotrófica *in vitro* para autotrófica *ex vitro*. Os propágulos que não sobreviveram apresentaram proliferação de fungos os quais podem ser de origem endofítica, uma vez que o ambiente em que foram mantidos apresentava excelentes condições fitossanitárias.

Muitos autores têm afirmado que o sucesso da fase de aclimação está diretamente relacionada a plântulas que apresentam raízes bem desenvolvidas *in vitro* (SOUZA et al., 2004; SANTOS et al. 2006; BIONDO et al., 2007; SILVA et al., 2008; SUNGKUMLONG e DEB, 2009) no entanto, mesmo sem a presença de raízes nos propágulos de *C. antisiphiliticus* a porcentagem de sobrevivência, ao processo de aclimação, foi elevada.



Figura 8: Vaso coberto com saco de polietileno transparente e com recipiente de fornecimento de água foi diário (A) e plantas de *C. antisiphiliticus* após o processo de aclimação (B).

### 5. 11 Conservação de germoplasma *in vitro*

A conservação de germoplasma *in vitro* é um método realizado a partir de técnicas de cultura de tecidos, sob condições de crescimento lento, com objetivo de preservar genótipos em ambiente especial, protegidos de eventuais perdas, garantindo a utilização em curto, médio e longo prazo. Para isso são adicionados ao meio de cultura substâncias como manitol, prolina, glicerol e sacarose que aumentam o potencial osmótico (ASSIS e TEIXEIRA, 1998; PEREIRA et al., 2007b). Além dessas substâncias a redução de nutrientes e a temperatura (12-18°C) da sala de crescimento, induzem os explantes a desacelerar seu crescimento (PEREIRA et al., 2007b; PAUNESCU, 2009).

Aos 150 dias não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto à altura de brotação. Em relação ao número de gema os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura contendo sacarose (1,44) (T0) e em meio suplementado com 2%

sacarose + 4% manitol + 2mg. L<sup>-1</sup> pantotenato de cálcio sorbitol (1,33). Quanto ao enraizamento este último também foi o meio mais adequado (Tabela 11)

Tabela 11: Efeito da sacarose, manitol, sorbitol, espermidina e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo em explantes de *C. antisiphiliticus* mantidos *in vitro* em 15°C, aos 150 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011.

| Tratamento                                                                       | Alt broto<br>(cm) | N gema      | % enra      | tam raiz<br>(cm) | N raiz       |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|-------------|------------------|--------------|
| T0-MS + 2% sacarose                                                              | 0,28a             | 1,44a       | 40,00c      | 0,22b            | 1,00b        |
| T1-MS + 2% sacarose + 4% sorbitol                                                | 0,37a             | 1,89b       | 20,00b      | 0,35c            | 1,33b        |
| T2-MS + 2% sacarose + 4% manitol                                                 | 0,34a             | 1,83b       | 0,00a       | 0,00a            | 0,00a        |
| T3-MS + 2% sacarose + 4% sorbitol +<br>2mg.L <sup>-1</sup> pantotenato de cálcio | *                 | *           | *           | *                | *            |
| T4-MS + 2% sacarose + 4% manitol +<br>2mg. L <sup>-1</sup> pantotenato de cálcio | 0,38a             | 1,33a       | 5,00s       | 0,07a            | 0,67a        |
| T5-MS +2% sacarose + 2mgL <sup>-1</sup><br>espermidina                           | *                 | *           | *           | *                | *            |
| T6-MS + 2% sacarose + 4 mgL <sup>-1</sup><br>espermidina                         | *                 | *           | *           | *                | *            |
| <b>CV%</b>                                                                       | <b>19,60</b>      | <b>6,20</b> | <b>0,00</b> | <b>34,11</b>     | <b>54,43</b> |

Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Scott Knott.

\* Não avaliados estatisticamente por morreram.

Explantes de *C. antisiphiliticus* mantidos em todos os tratamentos apresentaram reduzida taxa de sobrevivência, sendo que no tratamento sorbitol e pantotenato de cálcio todos os explantes morreram em 30 dias.

Propágulos mantidos em ambiente de banco de germoplasma apresentaram reduzido crescimento quando comparado aos mantidos em sala de crescimento, entretanto os agentes osmóticos utilizados não foram eficientes para manter vivo a maioria dos explantes. Estudos realizados *in vitro* com outras espécies, a exemplo de

*Mandevilla velutina* (BIONDO et al., 2007) e *Solanum tuberosum* (FORTES e PEREIRA, 2001), utilizando agentes osmóticos também apresentaram porcentagem de sobrevivência inferior a cinquenta por cento.

Aos 60 dias a porcentagem de sobrevivência foi reduzida à mais da metade na maioria dos tratamentos (Tabela 12). Aos 90 e 150 dias houve uma estabilização no índice de sobrevivência nos tratamentos T0, T1, T2 e T3 (16,67 a 23,33%) e morte de todos os indivíduos submetidos aos tratamentos T5 e T6. É possível que a adição de espermidina no meio tenha provocando intoxicação e morte dos propágulos.

Novos estudos precisam ser desenvolvidos, no futuro, para que propágulos de *C. antisiphiliticus* possam ser conservados em ambiente de germoplasma.

Tabela 12: Efeito da sacarose, manitol, sorbitol, espermidina e pantotenato de cálcio sobre crescimento mínimo de explantes de *C. antisiphiliticus* mantidos *in vitro* em 15°C, aos 30, 60, 90 e 150 dias, UNAERP, Ribeirão Preto – SP, 2011.

| Tratamento/dias                                                              | % sobrevivência |        |        |        |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|--------|--------|
|                                                                              | 30              | 60     | 90     | 150    |
| T0-MS + 2% sacarose                                                          | 23,33c          | 16,67b | 16,67a | 16,67a |
| T1-MS + 2% sacarose + 4% sorbitol                                            | 43,33b          | 20,00b | 20,00a | 20,00a |
| T2-MS + 2% sacarose + 4% manitol                                             | 60,00a          | 26,67a | 23,33a | 23,33a |
| T3-MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mgL <sup>-1</sup> pantotenato de cálcio | 0,00d           | 0,00c  | 0,00b  | 0,00b  |
| T4-MS + 2% sacarose + 4% manitol + 2mgL <sup>-1</sup> pantotenato de cálcio  | 70,00a          | 30,00a | 23,33a | 23,33a |
| T5-MS + 2% sacarose + 2mgL <sup>-1</sup> espermidina                         | 40,00b          | 13,33b | 10,00b | 0,00b  |
| T6-MS + 2% sacarose + 4 mgL <sup>-1</sup> espermidina.                       | 40,00b          | 3,33c  | 3,33b  | 0,00b  |
| <b>CV%</b>                                                                   | 24,69           | 40,49  | 46,07  | 38,67  |

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste Scott-Knott 5%.

## 6. CONCLUSÕES

1. Sementes introduzidas *in vitro* apresentam dormência e baixa porcentagem de germinação
2. Explantes e propágulos desenvolvem-se melhor em meio de cultura menos nutritivo (MS/2).
3. A multiplicação de explantes de *C. antisiphiliticus* é dependente de fitorregulador, sendo as citocininas zeatina e BAP as mais indicadas;
4. A associação da auxina AIA e a citocinina BAP, nas concentrações avaliadas não promoveu um balanço hormonal eficiente para intensificar o número de brotações;
5. Os explantes de *C. antisiphiliticus* além de apresentarem tolerância ao co-cultivo *in vitro* mostraram-se vigorosos;
6. Frascos maiores, que alocam maior volume de gases, promoveram maior desenvolvimento e robustez dos explantes;
7. O balanço hormonal adequado entre os tecidos da gema apical e a citocinina presente no meio MS/2 mostrou que esse tipo de explante é o mais adequado para multiplicação *in vitro*;

8. O elevado nível de auxina endógena nos tecidos dos explantes de *C. antisiphiliticus* isenta o uso de auxina ao meio de cultura para a indução de raízes *in vitro*.
9. A aclimação de explantes de *C. antisiphiliticus* é possível sem a presença de raízes desenvolvidas *in vitro*.
10. Independente da presença ou ausência dos agentes osmóticos utilizados a maioria dos propágulos não sobreviveram em ambiente de banco de germoplasma.
11. Em função dos resultados obtidos nos experimentos realizados *in vitro* com a utilização de fitorreguladores é possível compreender melhor que a arquitetura da espécie *C. antisiphiliticus* que apresenta reduzida parte aérea e exuberância do sistema radicular esta diretamente relacionada ao balanço hormonal.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, A. S. et al. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullet* var. *gabrior* (Euphorbiaceae) **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, Belém, v. 1, n. 2, p. 3-9, out, 2001. Disponível em: <<http://www.ufpa.br/rcientifica/cabecalho.php?conteudo=10.26>>. Acesso em: 30 jun. 2010.

ALEXANDRE, R. S. et al. *In vitro* organogenesis of passion fruit (*Passiflora edulis* sims. f. *flavicarpa* DEG.) affected by irradiance, sucrose and explant position. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 62-69, 2008.

ALMEIDA, V. P.; SHEPHERD, S. L. K. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *in vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 381-384, 1999.

ALVES, R. B. N. et al. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 4, p. 510-515, 2010.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar., 2000.

AQUINO, F. G.; MIRANDA, G. H. B. Consequências ambientais da fragmentação de habitats no Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Orgs.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa, 2008. p. 319-350.

ARAKAKI, A. H. et al. O baru (*Dipteryx alata* Vog.) como alternativa de sustentabilidade em área de fragmento florestal do Cerrado, no Mato Grosso do Sul. **Interações**, Campo Grande, v. 10, n. 1, p. 31-39, jan./jun., 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/inter/v10n1/04.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2011.

ARAÚJO, A. G. et al. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p. 261-296.

BARROS, M. A. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 50, p. 35-45, 1982.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination, **Plant Ecology**, Netherlands, v. 152, n. 2, p.204-205, feb., 2001.

BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and *trnL-trnF* sequence data. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, sept. 2005.

BINGTAO, L. et al. Euphorbiaceae. In: ZHENGYI, W.; RAVEN, P.H.; DEYUAN, H. (Orgs.). **Flora of China** (Oxalidaceae through Aceraceae), Science Press Beijing / Missouri Botanical Garden St. Louis, v. 11, p. 163-314, 2008. Disponível em: <<http://hua.huh.harvard.edu/china/mss/volume11/Euphorbiaceae.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2010.

BIONDO, R. et al. Micropropagation, seed propagation and germplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.) Woodson. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p. 263-268, may/june, 2007.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, Berlin / Heidelberg, v. 18, n.6, p. 456-461, 1999.

BRASIL. Decreto 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 119, p. 2-4, jul. 2006. Seção 1.

CALÁBRIA, L. et.al. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais em Indianópolis, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 49-63, 2008.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p. 87-132.

CAMPOS, R. A. S. et al. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 30-36, 2007.

CANTO, A. M. M. E. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p.717-720, jul. 2004.

CARNEIRO, D. C.; CORDEIRO, I.; FRANÇA, F. A família Euphorbiaceae na Flora de Inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 20, p. 31-47, 2002.

CARVALHO, I. S. H. Potenciais e limitações do uso sustentável da biodiversidade do Cerrado: um estudo de caso sobre a Cooperativa Grande Sertão no Norte de Minas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, p. 1449-1452, out. 2007.

- CARUZO, M. B. R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 571-585, 2007.
- CATAPAN, E.; OTUKI, M. F.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulates* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 25-34, mar. 2001.
- CAVÉCHIA, L. A.; PROENÇA, C. E. B. Resgate cultural de usos de plantas nativas do Cerrado pela população tradicional da Região do atual Distrito Federal. **Heringeriana**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 11-24, dez. 2007.
- CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- DINIZ, J. D. N. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2006.
- DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos: Garantia da segurança alimentar do terceiro milênio. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 2, n. 13, p. 34-38, 2000.
- EIRA, M. T. S. et al. Conservação de sementes de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* STAPF). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 37-39, 1992.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/dcb.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2010.
- FELFILI, J. M. et al. Composição florística da Estação Ecológica de Águas Emendadas no Distrito Federal. **Heringeriana**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 25-85, 2007.
- FELFILI, J. M. et al. Padrões fitogeográficos e sua relação com sistemas de terra no bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Orgs.). **Cerrado: ecologia e**

flora. Planaltina: Embrapa, 2008. p. 319-350.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.1** - Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2005a. Download gratuito. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2009.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Orgs.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005b. p. 40-52.

FLORA BRASILIENSIS. v. 11, n. 2, p. 207-209. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/index>>. Acesso em: 27 out. 2010.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**: Construindo a História dos Produtos Naturais, out. 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/art04\\_7.htm](http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm)>. Acesso em: 10 dez. 2010.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 10, p. 1261-1264, out. 2001.

FORZZA, R. C. et al. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

FRANÇA, F.; MELO, E.; SANTOS, C. C. Flora de inselbergs da Região de Milagres, Bahia, Brasil: I. Caracterização da vegetação e lista de espécies de dois inselbergs. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 17, p. 177-184, jul./dez. 1997.

FRANKLIN, C. I.; DIXON, R. A. Initiation and maintenance of callus and cell suspension

cultures. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A., (Orgs.). **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 1-26.

GABR, A. M. M.; SAYED, S. Slow growth conservation and molecular characterization of *Deutzia scabra* Thunb. **African Journal of Plant Science**, Lagos, v. 4, n. 10, p. 409-416, oct. 2010.

GONÇALVES, S.; FERNANDES, L.; ROMANO, A. High-frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 101, n. 3, p. 359-363, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, CBAB, 1998. p. 183-260.

GOVERNO FEDERAL. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no cerrado – PPCerrado**. Disponível em: <[http://www.casacivil.gov.br/arquivos/PPCerrado\\_VCC\\_1\\_OUTUBRO.pdf](http://www.casacivil.gov.br/arquivos/PPCerrado_VCC_1_OUTUBRO.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2010.

HILL, A. P. et al. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. **Revista Cubana de Farmacia**, Ciudad de La Habana, v. 35, n. 3, p. 203-206, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Estudos e pesquisa. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/ids2010.pdf>> Acesso em: 17 dez. 2010.

INÁCIO, M. C. **Estudo agrônomo, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (Mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do Cerrado**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

JESUS, A. M. S. et al. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 288, p. 183-189, 2003.

JONES, K. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New Rochelle, v. 9, p. 877-896, dec. 2003.

KAJIKI, F. O.; SHEPHERD, S. L. K. Micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 42-47, 2006.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Washington, DC, v. 19, n. 3, p. 707-713, june 2005.

KLINK, C.A. et al. Conservação dos recursos naturais em terras privadas: o papel das reservas legais no arranjo funcional das paisagens produtivas do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Orgs.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa, CPAC, 2008. p. 319-350.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 1, p. 1-7, jan./jun. 1996.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* propagation of *Cordia verbenacea* L. (Boraginaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p. 102-104, 2006.

LEMOS, E. E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, out. 2002.

LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (*Euphorbiaceae* s.s.). **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 177-231, abr./jun. 2008.

MACHADO, L. L. et al. Seleção de matrizes e clones de mangabeira para o cultivo *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 5, p. 431-435, maio 2004a.

MACHADO, R.B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional**, Brasília, DF. 2004b.

MALOSSO, M. G. **Estudo da propagação sexuada e assexuada de *Jacaranda decurrens* (Cham.) e estabelecimento de Banco de Germoplasma *in vitro***. 2004. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2004.

MANTOVANI, J. E.; PEREIRA, A. Estimativa da integridade da cobertura vegetal de cerrado através de dados TM/Landsat. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSO-RIAMENTO REMOTO, **Anais...** São José dos Campos: INPE, 1998. p. 1455-1466.

MEDEIROS, D.; VALLE, L. S.; ALVES, R. J. V. Euphorbiaceae nativas de Cerrado e campo rupestre da Serra de São José, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 2, p. 323-349, abr./jun. 2008.

MELO, J. T. et al. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F., (Orgs.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa, 2008. p. 319-350.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plantas Medicinais & Orientações Gerais para o Cultivo I: Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília, DF: MAPA/SDC, 2006. 48 p.

MORAES, R. M. et al. Micropropagação e Banco de Germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007. p. 185-211.

MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. Florística do estrato herbáceo-subarbusivo de um campo limpo úmido em Brasília, DF, Brasil. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 205-215, 2007.

NADER, T. T. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de extratos de plantas medicinais do cerrado frente *Staphylococcus aureus* isolado de diferentes fontes de propriedades leiteiras.

**Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 429-433, jul./set. 2010.

NASIB, A.; ALI, K.; KHAN, S. *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, n. 1, p. 99-104, 2008.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, 1499-1506, dez. 2002.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba – propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 33, p. 109-120, jul./dez. 2004.

NORTH, J. J.; NDAKIDEMI, P. A.; LAUBSCHER, C.P. The potential of developing an *in vitro* method for propagating Strelitziaceae. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 45, p. 7583-7588, nov. 2010.

PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 300-304, 2009.

PAULA, J. E. et al. Levantamento florístico e sua distribuição diamétrica da vegetação de um cerrado *sensu stricto* e de um fragmento de floresta de galeria no Ribeirão Dois Irmãos na APA de Cafuringa, DF, Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 35-46, set. 2009.

PAUNESCU, A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. **Romanian Biotechnological Letters**, București, v. 14, n. 1, p. 4095-4103, 2009.

PEDROSO, A. N. V. et al. . *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 407-414, jul./set. 2010.

PEREIRA, A. M. S. et al. The effect on *in vitro* co-cultivation of *Cephaelis ipecacuanha*,

*Eclipta alba* and *Oryza sativa* on plant development and yield of emetine, wedeloctane and demethyledelelactona. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 502, p. 307-311, 1999.

PEREIRA, A. M. S. et al. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an endangered medicinal plant. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 6, p. 571-573, June 2003.

PEREIRA, A. M. S. et al. *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld ex de Souza. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007a. p. 213-256.

PEREIRA, A. M. S. et al. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007b. p. 37-73.

PINTO, J. E. B. P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 6, p. 867-873, 1994.

RANGSAYATORN, N.; JINA, K.; PAMPASIT, S. Slow growth *in vitro* conservation of *Dendrobium draconis* RCHB. F.: effect of black kwao krua (*Mucuna colletti* Lace). **Acta Horticulturae**, n. 829, p. 355-358, 2009. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/829/829\\_56.htm](http://www.actahort.org/books/829/829_56.htm)>. Acesso em: 20 dez. 2010.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Glasgow, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Orgs.). **Cerrado: ecologia e flora**. Planaltina: Embrapa, CPAC, 2008. p. 319-350.

RITSCHER, P. S. et al. Organização do banco ativo de germoplasma de batata-doce: situação atual e perspectivas. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/batatadoce.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2010.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabrlea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 43-50, jan./feb. 2007.

RODRIGUES, L. A. et al. Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias, MG. **Boletim Agropecuário**, Lavras, n. 52, p. 1-34, nov. 2002.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 17-35, 2007.

SAINT-HILARIE, A. **Plantas usuais dos brasileiros**. In: PIGNAL, M.; BRANDÃO, M. G. L. (Org.). Belo Horizonte: IDM Composição e arte Ltda., 2009. p. 329-333.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 80-86, jan./fev. 2008.

SANTOS, R. B. et al. Micropropagação de pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 8, n. 2, p. 293-296, ago. 2006.

SARKAR, D.; CHANDRA, R.; NAIK, P. S. Effect of inoculation density on potato micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 48, n. 1, p. 63-66, 1997.

SÁTIRO, L. N.; ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v. 22, n. 1, p. 99-118, 2008.

SILVA, F. A. B.; PEREIRA, L. A. R.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1103-1114, nov./dec. 2008.

SILVA, J. S. et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Feira de Santana, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, R. F. et al. Estudo Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela População do Município de Jataí, Goiás. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 4, n. 2, p. 174-177, nov. 2009.

SILVEIRA, D.C. et al. Saber local e meio ambiente no Alto Jequitinhonha. **IV Encontro Nacional da Anppas**, Brasília, DF, 2008. 16p. Disponível em: <<http://www.anppas.org.br/encontro4/cd/ARQUIVOS/GT3-532-242-20080518210052.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2010.

SOARES, F. P. et al. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, A. V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, 1532-1538, dez. 2003.

SOUZA, A. V. et al. Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 85-91, 2004.

SOUZA, A. V. et al. Otimização de protocolo para o enraizamento *in vitro* de jalapa (*Mandevilla illustris*) (Vell.)R.E.Woodson. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. S1124-S1130, ago. 2009a.

SOUZA, A. S. et al. Preservação de Germoplasma Vegetal, com ênfase na conservação *in*

*vitro* de variedades de mandioca. **Circular técnica:** EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, p. 11-24, 2009b.

SOUZA, J. A. et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2046-2048, out. 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 435-440, jan./jul. 2010.

SUNGKUMLONG; DEB, C. R. Regeneration competence of *Tainia latifolia* (Lindl.) Benth ex Hook pseudobulb segments: An *in vitro* study. **Indian Journal of biotechnology**, New Delhi, v. 8, n. 1, p. 121-126, jan. 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma *in vitro*. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 3, n. 14, p. 18-20, 2000.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, supl. 1, p. 64-66, 2003.

WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 81, n. 1, p. 3-32, 1994.

WERBROUCK, S. P. O.; DEBERGH P. C. Applied aspects of plant regeneration - Micropropagation In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A., (Orgs.). **Plant cell culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 127-135.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, CBAB, 1998. p. 297-330.

## Anexo1

Composição de sais e concentração dos meios basais MS de Murashige & Skoog (1962), B5 de Gamborg et al. (1968) e WP de Lloyd et al. (1980).

| Concentração dos Componentes para 1 Litro de Meio de Cultura |         |         |         |
|--------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|
| Componentes                                                  | Meio MS | Meio B5 | Meio WP |
| Macronutrientes (mg/L)                                       |         |         |         |
| Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O        | -       | -       | 556     |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                              | 1,650   | -       | 400     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>              | -       | 134     | -       |
| KNO <sub>3</sub>                                             | 1,900   | 2,500   | 2,500   |
| CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O                          | 440     | 150     | 96      |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                         | 370     | 250     | 300     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                              | 170     | -       | 170     |
| KCl                                                          | -       | -       | -       |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                              | -       | -       | -       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O           | -       | 150     | -       |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O            | -       | -       | 990     |
| Micronutrientes (mg/L)                                       |         |         |         |
| MaSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                         | 22,3    | -       | -       |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                          | -       | 10      | 22,3    |
| ZnSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O                        | 8,6     | 2,0     | 8,6     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                               | 6,2     | 3,0     | 6,2     |
| KI                                                           | 0,83    | 0,75    | 0,83    |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O           | 0,25    | 0,25    | -       |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                         | 0,025   | 0,025   | 0,025   |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                         | 0,025   | 0,025   | -       |
| FeEDTA (mg/L)                                                |         |         |         |
| Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O                       | 37,3    |         | 37,7    |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                         | 27,8    |         | 27,8    |
| Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | -       | -       | -       |
| Vitaminas e Aminoácidos (mg/L)                               |         |         |         |
| Acido nicotínico                                             | 0,5     | 1,0     | 0,5     |
| Piridoxina.HCl                                               | 0,5     | 1,0     | 0,5     |
| Tiamina.HCl                                                  | 0,1     | 1,0     | 1,0     |
| Glicina                                                      | 2,0     | -       | 2,0     |
| Mio-inositol (mg/L)                                          |         |         |         |
| Mio-inositol                                                 | 100     | 100     | 100     |
| Sacarose (g/L)                                               |         |         |         |
| Sacarose                                                     | 30      | 20      | 20*     |
| pH                                                           | 6,0     | 6,0     | 6,0     |