

MAURECILNE LEMES DA SILVA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, ONTOGENIA DE GEMAS RADICULARES E
BROTOS ADVENTÍCIOS DE *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes -
RUBIACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586g
2003

Silva, Maurecilne Lemes da, 1973-
Germinação *in vitro*, ontogenia de gemas radiculares e
brotos adventícios de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.)
Stokes-Rubiaceae / Maurecilne Lemes da Silva. – Viçosa
: UFV, 2003
62p. : il.

Orientador: Aristéa Alves Azevedo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. *Psychotria ipecacuanha* - Propagação. 2. *Psychotria
ipecacuanha* - Germinação *in vitro*. 3. *Psychotria
ipecacuanha* - Ontogenia. 4. *Psychotria ipecacuanha* -
Brotação. 5. *Psychotria ipecacuanha* - Morfogênese *in
vitro*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 583.5204165

CDD 20.ed. 583.5204165

MAURECILNE LEMES DA SILVA

**GERMINAÇÃO *in vitro*, ONTOGENIA DE GEMAS RADICULARES E
BROTOS ADVENTÍCIOS DE *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes -
RUBIACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 Março de 2003.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Luiz Orlando de Oliveira
(Conselheiro)

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof^ª. Renata Maria Strozi Alves Meira

Prof^ª. Aristéa Alves Azevedo
(Orientadora)

Dedico este trabalho aos meus pais Mauro e Remísia pelo amor e pela confiança dispensada nesta e em todas as fases de minha vida.

A minha irmã Maurenilde pela amizade e carinho.

A Maria Vitória, Izabela e Renan pelas alegrias.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades concedidas e por suas realizações.

A Universidade do Estado de Mato Grosso pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Viçosa e Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Botânica pela realização deste curso.

A professora Aristéa Alves Azevedo pela orientação, amizade e por sua visão científica indispensáveis a minha formação.

Ao professor Wagner Campos Otoni pela amizade, apoio e pelas valiosas sugestões prestadas na realização deste trabalho.

Ao professor José Eduardo B. P. Pinto pelas valiosas sugestões.

A Rosane Portugal pelo carinho, confiança e auxílio na confecção do laminário.

A Elisionete (Lili) pelos ensinamentos na Cultura de Tecidos, incentivo e paciência.

A professora Renata pelas sugestões na Anatomia e ao Márcio e à Miranda pela amizade e pelo auxílio na Estatística.

A Ana Rossi pela amizade e companheirismo e ao Osvaldo pela valiosa ajuda no trabalho de campo.

Ao Edgard pela amizade e apoio constante que influenciaram no amadurecimento deste trabalho.

A Daniela pela amizade e agradável convivência e ao Dirceu pela disponibilidade e sugestões.

Ao Fabiano pelo auxílio na anatomia vegetal e Gilmar pelas fotos.

Ao Rogério pelo fornecimento de plantas de poaia, principalmente no início do trabalho.

Ao Manoel (Maninho) pela gentileza em coletar as sementes de poaia em Barra do Bugres/MT.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II pelo companheirismo.

Aos amigos: Carla e Edénir pela acolhida e amizade, Letícia, Ivênio, Maria Antônia, Leninha e Eduardo pelo carinho e torcida.

Aos amigos de Cáceres, Antonio Malheiros, Solange Ikeda e Paulo Alberto,, pela amizade e pelas experiências profissionais e pessoais compartilhadas.

A minha irmã Maurecilde pela companhia mesmo distante, mas sempre presente, ao Marlon e Danilo e a todos os meus irmãos.

BIOGRAFIA

MAURECILNE LEMES DA SILVA, filha de Mauro Lemes da Silva e Remísia da Guia Salgado da Silva, nasceu no dia 16 de março de 1973, na cidade de Cáceres, Mato Grosso.

Em novembro de 1995, graduou-se em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Cáceres, Mato Grosso.

Professora da Universidade do Estado de Mato Grosso, desde 2000, na área de Biologia Geral, atuando no Campus Universitário de Alta Floresta/MT.

Em abril de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa – MG, submetendo-se à defesa em 6 de março de 2003.

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	02

CAPÍTULO I

Germinação *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes Rubiaceae

RESUMO.....	03
ABSTRACT.....	04
INTRODUÇÃO	05
MATERIAL E MÉTODOS	07
Protocolo de desinfestação.....	07
Germinação <i>in vitro</i>	07
Cultivo das plântulas.....	08
Delineamento experimental	09
RESULTADOS	10
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÕES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
PROTOCOLO PROPOSTO PARA A GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE SEMENTES DE <i>Psychotria ipecacuanha</i>	22

CAPÍTULO II

Ontogenia de gemas radiculares em *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae

RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
Local de coleta.....	27
Aspectos da reprodução vegetativa.....	27
Propagação <i>in vitro</i>	27
Anatomia da ontogenia das gemas radiculares	28
RESULTADOS.....	29
Aspectos da reprodução vegetativa	29
Ontogenia das gemas radiculares	31
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

CAPÍTULO III

Organogênese *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes – Rubiaceae a partir de hipocótilos

RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
Material Vegetal e estabelecimento da cultura.....	49
Alongamento	50
Rizogênese.....	50
Análise histológica	50
Delineamento experimental	51
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CONCLUSÕES	62

RESUMO

SILVA, Maurecilne Lemes da, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2003. Germinação *in vitro*, ontogenia de gemas radiculares e brotos adventícios de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae. Orientadora: Aristéa Alves Azevedo. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Luiz Orlando de Oliveira.

Psychotria ipecacuanha (Rubiaceae) é uma espécie medicinal conhecida como poaia ou ipeca, cujo uso está relacionado à presença dos alcalóides encontrados em suas raízes, sendo os principais emetina, cefalina e psicotrina, que são freqüentemente utilizados no combate da hepatite e disenteria amebiana. Os objetivos do trabalho foram: estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* de sementes; caracterizar a reprodução vegetativa e os aspectos morfogênicos na produção de gemas adventícias; e regenerar plantas a partir de hipocótilo de *P. ipecacuanha*. Fragmentos radiculares foram cultivados em meio hidropônico, em solução de Hoagland e em água destilada, com presença ou ausência de 2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina. Verificou-se nestes tratamentos que a maior produção de gemas ocorreu em solução de Hoagland. A adição de BAP ao meio (2 mg L⁻¹) resultou no decréscimo do número de gemas. *In vivo*, a produção de gemas adventícias na raiz está associada com injúrias mecânicas e perda parcial da parte aérea. Na análise anatômica do caule de *P. ipecacuanha* destaca-se um felogênio originando a partir de células epidérmicas e subepidérmicas. As raízes adventícias não apresentam medula e se originam na porção dos entre-nós caulinares prostados ao solo. As gemas adventícias radiculares, formam-se a partir dos meristemóides resultantes da divisão, em vários planos, das células do felogênio. As gemas radiculares em *P. ipecacuanha* foram classificadas como reparativas e desenvolveram-se assincronicamente. Uma alta taxa de germinação (84,17 %) foi obtida pelo cultivo *in vitro* de sementes de *P. ipecacuanha*, com ausência de tegumento, em meio de MS na metade da concentração de sais (MS ½) com ausência de reguladores de crescimento. A obtenção desses valores pode ser atribuída à remoção da barreira para a embebição representada pelo tegumento, ao potencial osmótico do meio de cultura e as condições ambientais adequadas. As plântulas obtidas foram submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA₃) em dois estádios de desenvolvimento. A concentração de 3 mg L⁻¹ GA₃ não influenciou efetivamente o

crescimento das plântulas. Hipocótilos com polaridade invertida e segmentos de hipocótilos foram inoculados em meio MS, suplementado com concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). A utilização de concentrações mais baixas do regulador induziu maior produção de brotos adventícios. A organogênese nos hipocótilos ocorreu de forma direta. Os brotos adventícios produzidos em hipocótilos com polaridade invertida apresentaram-se mais vigorosos, quando diferenciados fora do meio de cultivo. A indução da rizogênese nas brotações foi eficiente nas concentrações de 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de AIB.

ABSTRACT

SILVA, Maurecilne Lemes da, MS, Universidade Federal de Viçosa, March 2003. *In vitro* germination ontogeny of the root adventitious buds and adventitious shoots of the *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae. Advisor: Aristéa Alves Azevedo. Committee members: Wagner Campos Otoni and Luis Orlando de Oliveira.

Psychotria ipecacuanha (Rubiaceae) is a medicinal species known as poaia or ipeca, which use is related with alkaloids found in its roots, mainly emetin, cephaelin and psychotrin, and frequently used in the treatment of hepatitis and amoebiasis. The species undergoes slow growth and low seed germination, which rendered the vegetative reproduction the main propagation strategy. The goals of this work were: to characterize *P. ipecacuanha* vegetative reproduction and morphogenic aspects of adventitious bud production; analyze *in vitro* seed germination and to regenerate plants from hypocotyl explants. Root segments were cultured in Hoagland solution, in which higher number of adventitious buds was observed. The addition of 2 mg L⁻¹ BAP to this solution resulted in a decrease in the number of buds. *In vivo*, adventitious bud production in the root system is associated with mechanical injuries and to the partial loss of the aerial part. On stem anatomical analysis, attention is drawn to a phellogen originated from epidermical and sub-epidermical cells in the region of adventitious roots emission. The adventitious roots did not display pith and were localized in the stem internodes prostrated in the soil surface. The root adventitious buds formation began with the division in several planes of the phellogen cells, resulting in the meristemoids formation. The buds in the *P. ipecacuanha* roots are classified as reparative and arise assynchronously. A high germination index (84.17%) was obtained by culturing seeds without the tegument on half- strength MS medium and no growth regulator added. Seedlings were submitted to giberellic acid (GA₃) treatment in two developmental stages. GA₃ 3 mg L⁻¹ did not influence the seedling growth. Subsequently, hypocotyls with inverted polarity were transferred to MS medium, supplemented with different BAP concentrations (0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹). The use of lower concentrations of this regulator led to higher production of adventitious shoots. Direct organogenesis was observed in the hypocotyl explants. This was validated by anatomical analysis, which also permitted the description of the main morphogenic events in the adventitious shoot ontogenesis in *P. ipecacuanha* hypocotyls. The shoots, from inverted polarity hypocotyl, were

more vigorous when they were differentiated out the culture medium. Nevertheless, higher production of adventitious shoots was observed in the hypocotyl segments than in the inverted polarity hypocotyls. Additionally, rooting induction was efficient at 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ IBA.

INTRODUÇÃO GERAL

Psychotria ipecacuanha (Rubiaceae) é originária da América do Sul e popularmente conhecida como poaia, ipecacuanha ou ipeca, dentre outros. É um subarbusto perene, com aproximadamente 30-40 cm de altura, encontrado em subosques de floresta, apresenta caules finos, pouco ramificados e raízes aneladas. A espécie é mundialmente utilizada na indústria de fármacos, por possuir em suas raízes os alcalóides psicotrina, cefelina e emetina, sendo este último o principal. Esses compostos têm ação emética, amebicida, nas afecções brônquicas, hemorragias uterinas, entre outras (Pinto, 1976; Bruneton, 1999).

A coleta silvestre das raízes de poaia é a principal fonte de manutenção do mercado mundial. Em consequência desse extrativismo intenso e da destruição do habitat, pelo desmatamento de áreas florestais, a espécie encontra-se em via de extinção (Vieira, 1999). Assim, é fundamental que pesquisas sejam realizadas na busca de mecanismos viáveis de cultivo e conservação de *P. ipecacuanha*.

O cultivo de plantas medicinais implica no domínio da tecnologia e de todas as etapas de desenvolvimento da espécie e requer conhecimentos da forma de propagação, adaptação ao ambiente de cultivo (Reis & Mariot, 2001), além das mudanças morfológicas e fisiológicas que possibilitam a especialização de células, tecidos ou órgãos durante o ciclo de vida da planta (Wardlaw, 1968).

Os objetivos do trabalho foram: estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* de sementes; caracterizar a reprodução vegetativa e os aspectos morfogênicos na produção de gemas adventícias; e regenerar plantas a partir de hipocótilo de *P. ipecacuanha*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1999, 1119 p.

PINTO, C. M. D. A ipecacuanha. In: Simpósio Internacional sobre as plantas de interesse econômico de la Flora Amazônica IICA. Costa Rica: Trópicos. Informes de conferencias, cursos e reuniones, n. 93, 1976

REIS, M.S. & MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRS, 2001, 3 ed. (Revisada), p.41-62.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants Brazil. In: **Perspective on new crops and new use**. Alexandria, ed. Janick, p. 152-159.

CAPÍTULO I

Germinação *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes -Rubiaceae

RESUMO

Psychotria ipecacuanha é uma planta medicinal da família Rubiaceae, encontrada em sub-bosques de florestas. A espécie encontra-se ameaçada de extinção principalmente devido ao desmatamento de áreas florestais e ao extrativismo silvestre. São plantas de lento crescimento, produzem poucas inflorescências e conseqüentemente poucos frutos, e suas sementes apresentam baixo índice de germinação. O presente trabalho teve como objetivos desenvolver um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de *P. ipecacuanha* e avaliar o efeito do ácido giberélico (GA₃) na germinação e no desenvolvimento de plântulas em dois estádios: I - plântulas com protusão de radícula; e II- plântulas com raízes laterais e adventícias. Após 70 dias de cultivo, as sementes de *P. ipecacuanha* com tegumento não germinaram, enfatizando-se a dificuldade de desinfestação das sementes nesta condição. A retirada do tegumento foi um método eficaz para a germinação das sementes, com um percentual de 84,17% de germinação quando cultivadas em meio MS meia força não suplementado com GA₃. Verificou-se que entre o 14º e 21º dias de cultivo, ocorreu maior índice de germinação. A utilização de 3 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultivo retardou o início da germinação de sementes de *P. ipecacuanha*. Em relação ao cultivo das plântulas, o GA₃ apenas influenciou satisfatoriamente o alongamento das plântulas no estágio I de desenvolvimento.

***In vitro* germination of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae**

ABSTRACT

Psychotria ipecacuanha is a medicinal plant from the Rubiaceae family, found in the forest sub-bushes. The species is in eminent extinction because of deforestation, harvesting in wild areas and to the low seed germination index. The species displays slow growth, generate few inflorescences and consequently few fruits. The present work aimed to develop an efficient protocol to germinate *P. ipecacuanha in vitro* and to test seedling development in the presence and absence of giberellic acid (GA₃), in two stages: I – seedlings with root protrusion; and II – seedlings with lateral and adventitious roots. *P. ipecacuanha* seeds with remaining teguments did not germinate within 70 days of culture, highlighting the difficulty in surface sterilizing the seeds in this condition. The tegument removal improved seed germination up to 84,17 %, when seeds were cultured on to half-strength MS medium without GA₃. The use of GA₃ (3 mg L⁻¹) delayed the initiation of seed germination. As far as the seedling culture is concerned, GA₃ solely influenced satisfactory plant elongation in development stage I.

INTRODUÇÃO

Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes é uma espécie da família Rubiaceae, nativa do Brasil, de hábito subarborescente e perene. Ela possui propriedades medicinais, sendo popularmente conhecida como poaia, ipeca ou poalha. Essas propriedades são atribuídas aos alcalóides de grande valor farmacológico presentes em suas raízes sendo a emetina o principal. Esse fármaco possui aplicação terapêutica como adstringente, expectorante, antiinflamatório (Vieira, 1991; Bruneton, 1999), tem ação inibidora sobre a síntese de proteínas (Sidhu & Omiecinski *et al.*, 1998) e de DNA (Burhans *et al.*, 1991) e é principalmente utilizado no combate da amebíase (Bruneton, 1999).

A poaia brasileira é a preferida no mercado mundial, por possuir maior concentração de alcalóides emetínicos, o que levou o Brasil a ser um dos principais exportadores desse produto. A coleta indiscriminada, além da destruição de seu habitat natural, levou a espécie a encontrar-se em vias de extinção (Vieira, 1991).

O cultivo da espécie é dificultado devido ao crescimento lento e a baixa porcentagem de germinação de suas sementes. Em condições naturais, e em viveiro, a germinação demora de três (Oliveira & Martins, 1998) a seis meses (Alzugaray & Alzuragay, 1988), além disso ocorre a perda de viabilidade das sementes após estocagem (Gatoni, 1968; Kalyanasundaram, 1968; Chatterjee, 1993). Outro aspecto relevante é atribuído ao extenso período, de 3 a 4 anos, para que ocorra maior concentração dos alcalóides eméticos (Yoshimatsu & Shimomura, 1993) nas raízes. Esses fatores contribuem para que haja oscilações no atendimento às demandas da indústria farmacêutica.

O cultivo *in vitro* de *P. ipecacuanha* é relatado na literatura visando a produção em escala comercial dos alcalóides emetínicos (Ikeda *et al.*, 1988; Teshima *et al.*, 1988; Veeresham *et al.* 1994; Yoshimatsu & Shimomura, 1993; Lameira *et al.*, 1994; Pinto, 1994). Entretanto, estes autores não abordaram a germinação de suas sementes, havendo escassez de informações sobre a reprodução sexuada da espécie. Experimentos com germinação *in vitro* de sementes de *P. ipecacuanha* foram realizados por Jha *et al.* (1988), utilizando plântulas para o cultivo de calo a partir de hipocótilo, visando a produção *in vitro* de alcalóide emetínicos; e por Rajkhowa (1969) que cultivou as sementes *in vivo*, obtendo um baixo índice de germinação. A germinação *in vitro* de

sementes da espécie é uma alternativa importante no fornecimento de material juvenil livre de contaminantes para a micropropagação.

O presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo para a germinação *in vitro* das sementes de *Psychotria ipecacuanha*, avaliar a influência do GA₃ na germinação e no desenvolvimento das plântulas.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo de desinfestação

Sementes de *Psychotria ipecacuanha* foram coletadas em plantas adultas, em áreas de fragmentos florestais remanescentes na cidade de Barra do Bugres, localizada a 58° W a 57° 45' W e 14° 30' a 14° 45' S, Estado de Mato Grosso, nos meses de abril a junho de 2002.

As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por 1 minuto, em seguida foram imersas em água, deionizada e autoclavada, com Tween 20, durante 15 minutos; em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5%, por 30 minutos, e submetidas a 4 lavagens em água deionizada e autoclavada.

Em capela de fluxo laminar retirou-se mecanicamente o tegumento externo, com auxílio de um bisturi, sob lupa. Em seguida, procedeu-se nova desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,5 %, durante 15 minutos, seguido por 4 enxágües em água deionizada e autoclavada. Sementes com tegumento passaram pelo mesmo processo de desinfestação.

Germinação *in vitro*

Com o objetivo de estabelecer um protocolo eficiente para a germinação de sementes de *P. ipecacuanha*, foram realizados testes pré-germinativos para definir as melhores condições de cultivo. Sementes sem tegumento e intactas foram cultivadas, sendo 10 sementes por tratamento. O meio de cultura utilizado foi o contendo os sais básicos de MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido com metade da concentração (MS ½), acrescido de sacarose a 3,0 % (p/v), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, complexo vitamínico de White (10 mL L⁻¹) e 5 g L⁻¹ de ágar (Sigma Chemical Co., USA), com a adição de 300 mg L⁻¹ de Timentin (Smithkline Beecham, Brasil). O pH foi ajustado a 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. O meio de cultura foi vertido em 20 tubos de ensaio (25 x 150 mm), 10 mL por tubo. As culturas foram mantidas no escuro em estufa incubadora (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de 28 ± 5 °C para germinação.

Para analisar a influência do ácido giberélico (GA_3) na germinação, sementes de *P. ipecacuanha*, sem tegumento e intactas, foram embebidas em água, deionizada e esterilizada, com a adição de 3 mg L^{-1} de GA_3 e o controle apenas em água, permanecendo em frascos com agitação orbital (100 rpm), distribuídos em três tratamentos: 3, 4 e 5 dias de embebição, com 5 sementes por tratamento, sendo que cada uma foi considerada uma repetição. O baixo número amostral de sementes, foi devido à escassez do material. Utilizou-se do mesmo meio de cultura anteriormente descrito.

Após os resultados obtidos nos testes pré-germinativos e verificada a melhor condição de cultivo, realizou-se um experimento com 240 sementes com ausência de tegumento e de GA_3 . As sementes foram cultivadas em placas de Petri de polietileno estéril (90 x 1,5 mm), vedadas com filme de PVC. Dez sementes foram inoculadas por placa de Petri, num total de 24 repetições. O número de sementes germinadas foi avaliado a cada 7 dias, durante 70 dias de cultivo

Cultivo das plântulas

As plântulas cultivadas foram classificadas em 2 estádios de desenvolvimento (I) plântulas com protusão da radícula e (II) com o desenvolvimento de raízes adventícias e laterais. Foram realizados quatro tratamentos:

- 1 - Estádio I : suplementado com 3 mg L^{-1} de GA_3
- 2 - Estádio I : não suplementado com de 3 mg L^{-1} de GA_3
- 3 - Estádio II : suplementado com 3 mg L^{-1} de GA_3
- 4 - Estádio II : não suplementado com de 3 mg L^{-1} de GA_3

Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento e 4 plântulas por frasco num total de 12 plântulas. O meio para inoculação foi o mesmo anteriormente citado, utilizando-se força iônica total e frascos com 40 mL de meio.

As plântulas foram cultivadas em sala de crescimento, com luz fluorescente sob irradiância de $24 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$.

A avaliação das plântulas ocorreu aos 30 dias após inoculação. Os parâmetros adotados para a avaliação foram: altura da plântula, número de raízes e comprimento das raízes adventícias e laterais.

As plântulas com aproximadamente 8-10 cm de altura foram aclimatadas em copos plásticos com substrato Plantimax em estufa.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos a teste de média, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAEG.

RESULTADOS

O protocolo de desinfestação testado foi ineficaz para as sementes com tegumento intacto (Fig. 1); apesar da utilização do antibiótico Timentin no meio de cultivo, a contaminação principalmente por bactérias foi de 99%. Também não foi obtido sucesso na germinação das sementes nessas condições do experimento. Entretanto, para sementes inoculadas com ausência de tegumento (Fig. 2) o procedimento mostrou-se eficiente (Fig. 3) com 8 sementes germinadas, e evitou completamente a contaminação.

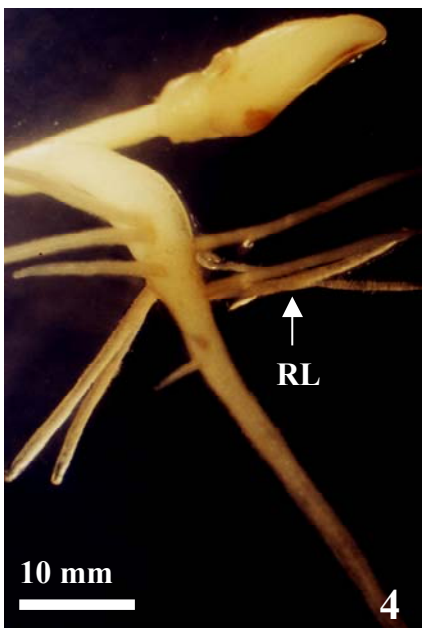
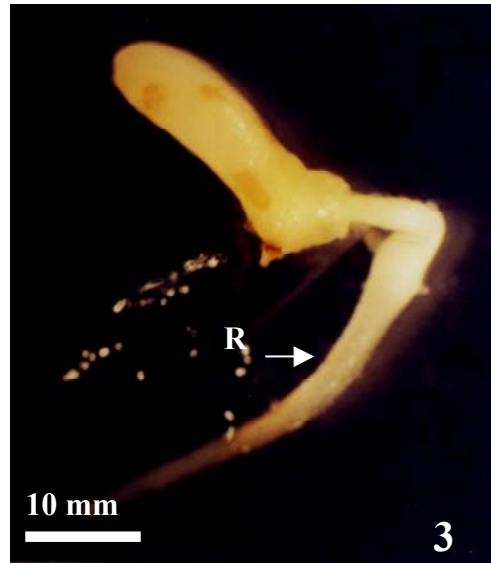
Nos tratamentos das sementes sem tegumento embebidas em 3 mg L^{-1} de GA_3 foram observadas diferenças: sementes com 3, 4 e 5 dias de embebição obtiveram um percentual de 60, 20 e 20 de germinação, respectivamente. Nesses tratamentos com GA_3 o processo de germinação iniciou após o 20º dia de cultivo. As sementes com a presença de tegumento não germinaram; para as sementes embebidas em água, na ausência do regulador de crescimento, obteve-se 60% de germinação.

Para as 240 sementes inoculadas sem tegumento e na ausência de GA_3 obteve-se o um total de germinação de 84,17% (Figs. 3 e 4) com desenvolvimento normal das plântulas.

Observa-se que, em casos extremos, a germinação teve início no segundo dia de cultivo ou mesmo após 70 dias, ocorrendo grande desuniformidade. No intervalo entre o 14º e 21º dias após a inoculação, constatou-se maior número de sementes germinadas 42 e 72, respectivamente (Fig. 7).

Figuras 1 a 6: Germinação *in vitro* e desenvolvimento de plântulas de *Psychotria ipecacuanha*.

1 - Vista geral da semente com tegumento; **2** - Semente com ausência de tegumento e início da germinação do tipo epígena; **3** - Protusão da radícula, (estádio I de desenvolvimento); **4** - Desenvolvimento de raízes laterais (estádio II de desenvolvimento); **5** - Detalhe de uma plântula com expansão da parte aérea e sistema radicular já desenvolvido. **6** - Plântula em processo de aclimatação. IG - Semente evidenciando o início da protusão da radícula; R - radícula; RL - raízes laterais e adventícias em desenvolvimento.



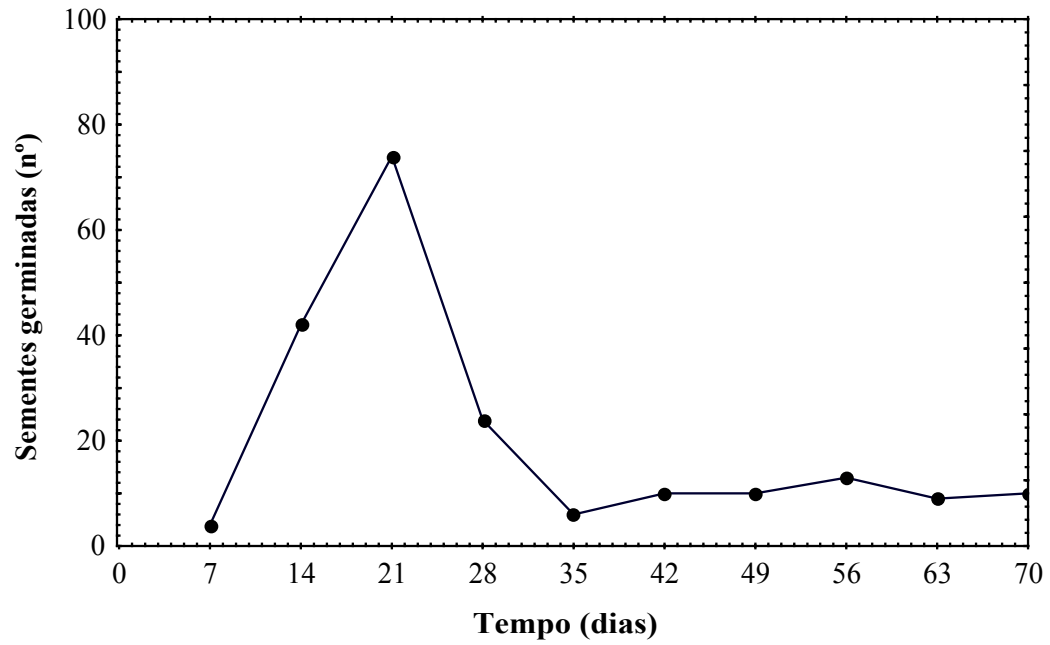


Figura 7: Representação gráfica da germinação das sementes de *P. ipecacuanha*, sem tegumento, cultivadas no meio de MS com ausência de GA₃, até 70 dias após inoculação, em 28 ± 5 °C de temperatura.

No estágio I (Fig. 4) de desenvolvimento das plântulas de *P. ipecacuanha*, o tratamento suplementado com 3 mg L⁻¹ GA₃ foi mais eficiente que o tratamento com ausência de GA₃ para o desenvolvimento das plântulas (Tab. 1). De maneira geral na presença de 3 mg L⁻¹ ou ausência de GA₃, durante 30 dias de cultivo, as plântulas de *P. ipecacuanha* independente do estágio inicial (Figs. 4 e 5) apresentaram respostas similares, não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos quando se analisou o número e o comprimento das raízes (Tab. 1). Em relação à altura das plântulas, a presença de GA₃ induziu maior alongamento, quando comparando ao meio não suplementado com GA₃ no estágio I de desenvolvimento (Fig. 4) como visto na Tab.1.

Tabela 1: Desenvolvimento de plântulas de *Psychotria ipecacuanha* nos estádios I e II, na ausência e na presença de GA₃ (3 mg L⁻¹), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Estádio	Meio de Cultivo	Altura das Plântulas (cm)	Número de Raízes	Comprimento das Raízes (cm)
I	MS + GA ₃	3,44 a	16,40 a	0,91 a
I	MS	2,38 b	12,85 a	0,89 a
II	MS + GA ₃	3,25 a	12,10 a	1,14 a
II	MS	2,93 a	11,45 a	0,70 a

As médias seguidas por uma mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Após a fase de alongamento, as plântulas foram aclimatadas com sucesso (Fig. 6), resultando em elevado percentual de sobrevivência das mesmas. As plantas com raízes mais curtas responderam melhor a aclimação.

DISCUSSÃO

A presença do tegumento intacto das sementes favoreceu o aparecimento de contaminantes, principalmente bactérias, apesar da utilização de antibiótico. Após a retirada do tegumento, observou-se assepsia no meio de cultura. A assepsia da cultura *in vitro* é um aspecto importante para o sucesso no cultivo de espécies vegetais, tendo em vista que um dos entraves maiores no estabelecimento de culturas assépticas é a contaminação, de modo especial se usados explantes provenientes de casa-de-vegetação/campo. Explantes de vários órgãos vegetativos de plântulas assépticas freqüentemente são usados na cultura de tecidos *in vitro* (Takamura *et al.*, 1995; Bond 1998; Kotsias & Rousso, 2001; Paiva Neto, 2002; Singh *et al.*, 2002) porque provém de tecidos jovens livres de contaminantes e os explantes são vigorosos, enquanto os coletados no campo, freqüentemente estão contaminados por microrganismos endofíticos, geralmente de difícil erradicação.

A dormência das sementes de *P. ipecacuanha* deve estar relacionada com a consistência fibrosa do tegumento (dados não inclusos) que prejudica a embebição e impede a extrusão da radícula. O mesmo tipo de dormência foi verificado em sementes de *Bixa orellana* L. cv. Bico de Pato (Amaral *et al.*, 1995, Paiva Neto, 2002). No entanto, observa-se que outros aspectos podem estar envolvidos nesse processo como a presença de reguladores nos envoltórios das sementes, que geralmente interferem na germinação. A mesma hipótese também foi levantada por Morley e Bunker *apud* Tsuboi & Nakagawa (1992), em sementes de *Passiflora edulis*.

A remoção do tegumento foi uma estratégia eficiente para a quebra da dormência das sementes de *P. ipecacuanha*. A mesma técnica também aumentou a taxa de germinação em sementes de *Fraxinus ornus* L. e *Sorbus domestica* (Arrilaga & Marzo *et al.*, 1992), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Reis, 2001), *Pterodon pubescens* (Coelho, 2001) e *Bixa orellana* L. cv. Bico de Pato (Paiva Neto, 2002). A escarificação mecânica ou química promove a ruptura da camada em paliçada do tegumento, facilitando a entrada de água nas sementes. Apesar de *P. ipecacuanha* não apresentar camada em paliçada do tegumento, entretanto, o seu tegumento é constituído de fibras entrelaçadas e esclerificadas (dados não amostrados), o que dificulta a embebição.

A reidratação da semente, possibilita a absorção de água, respiração e outras atividades que desencadeiam o processo germinativo (Araújo Neto, 1997). De acordo com Toledo & Marcos Filho

(1977), o conjunto de condições intrínsecas ou extrínsecas do ambiente de cultivo (umidade, luz, temperatura, pH, e os nutrientes do meio de cultura) são fundamentais para que o processo de desenvolvimento do embrião ocorra normalmente.

A utilização de regulador de crescimento foi desnecessária para o cultivo de sementes de *P. ipecacuanha*, considerando que o tempo para o início da germinação no tratamento com ausência de giberelina foi menor: a germinação ocorreu no 7º dia, enquanto no tratamento com giberelina ocorreu após o 20º dia de cultivo. Jha *et al.* (1988) utilizaram 20 mg L⁻¹ GA₃ na indução da germinação de sementes de *P. ipecacuanha*, em condições assépticas. Entretanto, os autores não relataram as condições de cultivo das sementes, em relação à presença ou a ausência de tegumento, o tempo de cultivo e o percentual de germinação. As giberelinas são reguladores de crescimento relacionados diretamente ao controle e promoção da germinação (Arteca, 1995).

O percentual de germinação obtido (84,17%), neste trabalho pode ser considerado altamente promissor, em função das dificuldades de germinação *in vivo* observadas nesta espécie. Além disso, as plântulas assépticas desenvolvidas pela técnica, apresentaram-se vigorosas e sem anormalidades. Entretanto, para algumas espécies cultivadas *in vitro* ocorre um alto percentual de sementes germinadas, mas, podem desenvolver plântulas com anomalias morfológicas e anatômicas, como visto em *Passiflora edulis* (Reis, 2001). Destaca-se a rapidez de início da germinação, pois após o segundo dia de inoculação, já foi observado um percentual de 0,83 % de sementes com emissão da radícula, e ocorreu um pico entre o 14º e 21º dias de cultivo. Este fato é importante para a obtenção mais rápida de plântulas, facilitando a multiplicação. Outro aspecto a ser considerado é que na produção de plântulas a partir de sementes pode-se selecionar indivíduos mais produtivos, em função da variação genética.

O cultivo de sementes de poaia no campo foi realizado por Rajkhowa (1964) sendo verificado que a germinação ocorre entre 95 e 125 dias após semeadura, porém, este período pode variar de acordo com a época de plantio. O mesmo autor ainda ressalta que sementes de *P. ipecacuanha* são consideradas impermeáveis, e sua germinação ocorre no período de janeiro a fevereiro, caracterizado por umidade relativa do ar alta, porém o percentual é de apenas 10%. Entretanto, o autor conseguiu elevar esse índice para 59% quando cultivando sementes durante o mês de fevereiro em local sombreado.

Para a germinação de sementes de *P. ipecacuanha* com ausência de tegumento constata-se a necessidade do cultivo *in vitro*, pois, o embrião é delicado, e esta condição de cultivo proporciona um ambiente favorável à germinação.

A utilização de 3 mg L⁻¹ de GA₃ no estágio I de desenvolvimento foi favorável apenas ao crescimento da plântula e no estágio II nenhum aspecto avaliado apresentou diferenças. Aparentemente, não é necessária a utilização de regulador de crescimento nas plântulas nestas condições.

A concentração de 3 mg L⁻¹ de GA₃ já foi testada para o alongamento de brotações adventícias provenientes da proliferação *in vitro* de *P. ipecacuanha*, apresentando bom desenvolvimento. Entretanto, para as plântulas neste particular os resultados não foram satisfatórios, principalmente em relação ao seu alongamento. Souza (2002) utilizou GA₃ em plântulas de *Arnica* com diferentes tamanhos, sendo que para esta espécie o regulador influenciou positivamente principalmente no alongamento.

O protocolo desenvolvido para a germinação de sementes de *P. ipecacuanha in vitro*, possibilita a manutenção de plantas oriundas de diferentes genótipos, além de se constituir uma fonte de material para a micropropagação.

CONCLUSÕES

A remoção do tegumento das sementes favoreceu a germinação com menor período de tempo, após o qual foi observado o desenvolvimento normal das plântulas.

A germinação *in vitro* de sementes de *P. ipecacuanha* ocorreu após a retirada do tegumento, resultando em 84,17% de germinação e as plântulas desenvolveram-se normalmente.

A adição de ácido giberélico ao meio de cultura aumentou o tempo necessário para a germinação.

As plântulas no estágio I de desenvolvimento, mostraram-se mais alongadas quando suplementadas com 3 mg L^{-1} de GA_3 .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZURAGAY, D. & ALZURAGAY, C. **Enciclopédia de plantas brasileiras**, São Paulo: Edt. Três, 1988, 300 p.

AMARAL, L.I.V. ; PEREIRA, M.F.A. & CORTELAZO, A.L. Quebra de dormência em sementes de *Bixa orellana* . **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 273-285, 1995

ARAÚJO NETO, J.C. **Caracterização e germinação de sementes e desenvolvimento pós-seminal de Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.)**. Jaboticabal: UNESP, 1997, 82 p., Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo.

ARRILLAGA, I. & FETT NETTO, A.G. Embryo culture of *Fraxinus ornus* and *Sorbus domestica* removes seed dormancy. **HortScience**, v. 27, p. 371, 1992.

ARTECA, R. N. **Plant Growth Substances; Principles and Applications**. Pennsylvania: Chapman & Hall, 1995, 332 p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1999, 1119 p.

BURHANS, W.C.; VASSILEY, L.T.; WU, J.M.; NALLASETH, F.S.; DEPAMPHILIS, M.L. Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replicaton by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. **EMBO Journal**, v. 10, p. 4351-4360, 1991.

CHARTERJEE, S.K. Domestication studies of some medicinally important exotic plants growing in India. **Acta Horticulturae**, n. 331, p. 151-158, 1993.

COELHO, M.C.F.; PINTO, J.E.B.P.; MORAIS, A. R.; CID, L.P.B. & LAMEIRA, O.A. Germinação de sementes de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (BEBTH) BENTH) *in vitro* e *ex vitro*. **Revista Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. **1**, p. 38-48, 2001.

GATONI, L. A. A raiz de ipecacuanha. **A Fazenda**, n. **55**, p. 16-18, 1960.

IKEDA, K. TESHIMA D. AOYAMA T, SATAKE M. SIMOMURA K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, v. **7**, p. 288-291, 1988.

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

KOTSIAS, D. & ROUSSOS, P.A. An investigation on the effect on different plant growth regulating compounds in *in vitro* shoot tip and node culture of lemon seedlings. **Scientia Horticulturae**, v. **89**, p. 115-128, 2001.

JHA, S. *et al.* Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta Médica**, v. **54**, p. 505-506, 1988.

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

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. **15**, p. 473-497, 1962.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa: UFV, 105 p., 2002, Dissertação (Doutorado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

PINTO, C. M. D. A ipecacuanha. In: Simpósio Internacional sobre as plantas de interesse econômico de la Flora Amazônica IICA, Belém, 1972, p. 109-119.

RAJKHOWA, S. Germination of *Cephaelis ipecacuanha*. **Indian Forestier**, v. **90**, p. 312-314, 1964.

RAJKHOWA, S. The cultivation of ipeca roots in Assam. **Indian Forestier**, p. 245-252, 1969.

REIS, L.B. **Morfogênese in vitro de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*)** Viçosa: UFV, 89 p., 2001, Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

SIDHU, J.S. & OMIECINSKI, C.J. Protein synthesis inhibitors exhibit a nonspecific effect on phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. **273**, p. 4769-4775, 1998.

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R. *et al.* Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from in vitro germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v. **20**, p. 213-221, 2002.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P. *et al.* Crescimento in vitro de plântulas de Arnica expostas ação do GA₃ em diferentes períodos de tempo. **Horticultura Brasileira**, v. **20**, (suplemento), 2002.

TAKAMURA, T.; IKUO, M. & MATSOU, E. Somatic embryogenesis of *Cyclament persicum* Mill. “Anneke” from aseptic seedlings. **Plant Cell Reports**, v. **15**, p. 22-225, 1995.

TESHIMA, D.; IKEDA, K.; STAKE, M. & AOYAMA, T. SHIMOMURA, K. Production of emetic alkaloid by in vitro culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. **Plant Cell Reports**, v. **7**, p. 278-280, 1988.

TOLEDO, F.F. & MARCOS FILHO, J. **Manual de Sementes: tecnologia da produção**. v. **2**, p. 71-77, 1995.

TSUBOI, H. & NAKAGAWA, J. Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Científica**, v. **20**, p. 63-72, 1992.

VEERESHAM, C.; KOKATE, C. & VENKATESHWARLU, V. Influence of precursors on production of isoquinoline alkaloids in tissue cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, v. **35**, p. 947-949, 1994.

VIEIRA, L.S. **Manual da medicina popular**. Belém, Ed. Vozes, 1991, p. 247.

YOSHIMATSU, K. & SHIMOMURA, K. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) Micropropagation and the production of emetine and cephaeline. In: Bajaj Y. P. S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture Forestry – Medicinal and Aromatic Plants**, v. **21**, IV Berlin: Springer Verlag, p. 87-103, 1993.

PROTOCOLO PROPOSTO PARA A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE *Psychotria ipecacuanha*

A) Desinfestação

Lavagem em água para a retirar a mucilagem das sementes. Logo após lavar com 9 gotas de Tween 20 durante 15 minutos; lavar em álcool 70° por 1 minuto; colocar as sementes imersas em hipoclorito de sódio comercial, a 5 %, por 30 minutos.

Em capela de fluxo laminar enxaguar as sementes 4 vezes com água deionizada e autoclavada.

Retirar mecanicamente o tegumento externo, com auxílio de um bisturi. Logo após, realizar outra desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,5 % durante 15 minutos.

B) Meio de germinação

Meio contendo os sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido com metade da força iônica; sacarose a 3 % v/v, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, complexo vitamínico de White (10 mL L⁻¹), solidificado com ágar 5 g L⁻¹; pH ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem, e com a adição de 300 mg L⁻¹ de Timentin (Smithkline Beecham, Brasil)..

C) Incubação das sementes

Colocar em incubadora, manter no escuro, com temperatura mínima de 28 ° C e máxima de 33 ° C.

D) Cultivo das plântulas

Após emissão da radícula, transferir as plântulas, para o meio contendo os sais de MS com força iônica total. A irradiância de 24 μmol.m⁻².s⁻¹ sob luz fluorescente, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 ± 2 °C.

E) Aclimação

Colocar as plântulas com aproximadamente 5 cm de altura imersas em água deionizada e autoclavada em copos plásticos na estufa por 15 dias. Transferir as plântulas para copos plásticos com substrato plantimax por 30 dias. Logo após, cultivar as plântulas em casa de vegetação em local sombreado com sombrite a 70%.

CAPÍTULO II

Ontogenia de gemas radiculares de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae

RESUMO

Psychotria ipecacuanha é um subarbusto da família Rubiaceae, popularmente conhecido como poaia ou ipeca, utilizado no combate da amebíase. As propriedades medicinais da espécie são atribuídas à presença de alcalóides emetínicos. A propagação da espécie se dá principalmente via raízes gemíferas. O objetivo do trabalho foi descrever os principais aspectos da reprodução vegetativa e da ontogenia das gemas adventícias radiculares. O sistema caulinar varia quanto a morfologia externa, possuindo partes subterrâneas (eretas ou horizontais ao solo) e partes aéreas que, em geral, se curvam até a superfície do solo emitindo raízes adventícias, na região do entre-nó. As raízes adventícias são protostélicas com medula ausente. No caule são produzidos sucessivos felogênios de origem epidérmica e subepidérmica, resultando na descamação na região de emergência das raízes ou por todo o caule. Fragmentos radiculares de *P. ipecacuanha* foram cultivados em meio hidropônico com solução de Hoagland (presença ou ausência de 2 mg L⁻¹ de BAP) e em água destilada (presença ou ausência de 2 mg L⁻¹ de BAP). Verificou-se nestes tratamentos que a maior produção de gemas ocorreu no cultivo em solução de Hoagland; nos tratamentos com regulador de crescimento ocorreu primeiramente a formação de raízes adventícias. As gemas adventícias se diferenciam a partir dos meristemóides originados do felogênio. As gemas formaram-se assincronicamente na superfície da raiz em crescimento secundário. Nos primórdios das gemas observou-se a presença de coléteres e idioblastos com ráfides. O sistema vascular das gemas é formado por diferenciação de células meristemáticas, e posteriormente conecta-se ao sistema radicular da raiz de origem. No córtex radicular encontram-se grãos de amido, os quais devem contribuir na manutenção e no estabelecimento das gemas adventícias.

Ontogeny and bud from roots of *Psychotria ipecacuanha* Brot. Stokes) - Rubiaceae

ABSTRACT

Psychotria ipecacuanha is a sub-shrub from Rubiaceae family, known as (poaia) or (ipeca), which is used as therapy for healing and amoebiasis. Its medicinal properties are attributed to emetic alkaloids. The aim of this work was to describe main aspects of the vegetative reproduction and ontogeny of root-derived adventitious buds. The regeneration of this species is essentially carried out from roots sprouts. Variation on the stem external morphology is observed which enclose subterranean parts (straight or horizontally to soil) and aerial parts that, in general, bend to the soil surface, where adventitious roots are emitted from the internode. Anatomical analysis from adventitious roots revealed pith absence. Continuous phellogen from epidermical and sub-epidermical layers are formed in the stem, occurring cell elimination on the root emergence surface or all over the stem. Root fragments of *P. ipecacuanha* were cultivated in distilled water (presence or absence of 2 mg L⁻¹ BAP) and in hydroponics medium with Hoagland solution (presence or absence of 2 mg L⁻¹ BAP). The latter treatments displayed higher bud production as compared to Hoagland solution. Adventitious buds arose from the phellogen, which divided in several planes, forming the meristemoids. The buds were formed asynchronously on the surface of roots that presented secondary growth. At the bud primordia it was observed coleteres and idioblasts containing raphides. The bud vascular system is formed by meristematic cell differentiation, and, with a late development, it is connected to the root vascular system. There is a great starch concentration in roots that participate on the adventitious bud maintenance and establishment.

INTRODUÇÃO

A poaia, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, pertencente à família Rubiaceae, é uma planta medicinal do sub-bosque de florestas, cuja distribuição é disjunta no Brasil, Colômbia e América Central. Atualmente a ocorrência de populações nativas está restrita a regiões geograficamente discretas na América Central (Costa Rica, Nicarágua e Panamá), na parte sudoeste da região amazônica brasileira (Mato Grosso e Rondônia), na Mata Atlântica (principalmente em Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia) e na Colômbia.

O uso farmacológico de *P. ipecacuanha* está associado à presença dos alcalóides encontrados em suas raízes, sendo os principais emetina e cefelina, que conferem à planta um poder emético e amebicida (Bruneton, 1999).

P. ipecacuanha ocorre em formações denominadas de “fogões” ou “reboleiras”, originadas pelo crescimento vegetativo da planta ou pela disseminação de suas sementes realizadas pelo pássaro-poaieiro (Caminha Filho, 1943). As sementes de poaia têm baixo índice de germinação, em condições naturais, podendo demorar até três meses para germinar em viveiros (Oliveira & Martins, 1998). Observa-se em ambiente natural que a propagação vegetativa, por meio da formação de gemas no sistema subterrâneo radicular e caulinar, resulta no aumento de indivíduos nas reboleiras. Entretanto, há escassez de dados referentes aos mecanismos morfogenéticos e aos aspectos anatômicos envolvidos na reprodução vegetativa da espécie.

Raízes de algumas plantas superiores têm a capacidade de formar gemas vegetativas sob condições naturais (Kerbauy, 1998) como um mecanismo de adaptação a reprodução vegetativa (Apezato-da-Glória & Estelita, 2000). Outras espécies formam gemas adventícias apenas esporadicamente, como consequência de injúrias mecânicas ou de podas drásticas da parte aérea (Kerbauy, 1998; Rizzini, 1966). A propagação vegetativa através da formação de gemas em fragmentos radiculares, foi registrada para várias plantas adaptadas a ambiente de cerrado (Rizzini & Heringer 1962 e 1966). A formação de raízes gemíferas está, geralmente, associada a uma forte perturbação do ambiente capaz de interferir com a reprodução por sementes e estimular a gemação radicular (Rizzini & Heringer 1966).

Nas regiões florestais que sofrem a ação constante do fogo, ou de outras perturbações, o desenvolvimento das gemas a partir de sistemas radiculares é uma característica vantajosa e permite a

rápida recomposição da cobertura vegetal (Lacey & Johnston, 1990, Rizzini & Heringer, 1966). Raju *et al.* (1966) relatam que a presença de raízes gemíferas em algumas dicotiledôneas, consideradas perenes, tem fortes implicações na sua estratégia de sobrevivência, quando submetidas a condições adversas.

As gemas originadas de raízes proporcionam maior capacidade de competição na ocupação de áreas e na exploração dos recursos ambientais (Lacey & Johnston, 1990). A formação de gemas adventícias confere vantagens em relação às plântulas originadas por via seminífera, pois, as brotações podem ser mantidas com suprimento constante de água e nutrientes fornecidos pela planta de origem (Greig & Mauseth, 1991; Janzen, 1980; Hudson, 1955). Entretanto, a reprodução sexuada é essencial para a manutenção da variabilidade genética dentro da comunidade vegetal (Rood *et al.*, 1994).

As gemas formadas num sistema radicular normal, não perturbado, recebem a denominação de gemas adicionais, enquanto as formadas em resposta as injúrias são consideradas gemas reparativas (Raju *et al.*, 1966; Polowick & Raju, 1982; Wittrock, *apud* Raju *et al.*, 1966).

Os estudos anatômicos de *P. ipecacuanha* estão restritos à caracterização da raiz e do caule (Silva, 1936; Assis & Giuliett, 1999; Garcia, 2001). Estudos realizados por Hayashi (1998), nos sistemas subterrâneos de 8 espécies arbóreas, confirmaram, mediante análises anatômicas, a ocorrência da formação de raízes gemíferas em floresta tropical brasileira. A continuidade dos estudos anatômicos é essencial para esclarecer o processo de formação e desenvolvimento de gemas em sistemas subterrâneos (Apezzato-da-Glória & Estelita, 2000). Apesar da conhecida importância da raiz para a planta e de algumas características peculiares para seu desenvolvimento, os estudos dos aspectos morfogenéticos desse órgão não têm recebido a mesma atenção direcionada aos órgãos da parte aérea (Kerbaui, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo descrever os principais aspectos da reprodução vegetativa e a ontogenia de gemas radiculares em *Psychotria ipecacuanha*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta

As amostras de *Psychotria ipecacuanha* foram coletadas nos meses de fevereiro a março, em populações naturais no município de Itaperuna, no estado do Rio de Janeiro, localizado a 21°07'S/42°06'W e 190 m de altitude. A vegetação é constituída de fragmentos remanescentes de mata Atlântica, próximos a área de pastagem, na Fazenda Caeté.

Foram coletados fragmentos radiculares e plantas inteiras para o cultivo *in vivo*.

Aspectos da reprodução vegetativa

Foram realizadas observações de campo nos meses de janeiro a março, com alto regime hídrico. As observações visaram identificar alguns aspectos da reprodução vegetativa da espécie, como: profundidade do sistema radicular subterrâneo; o tipo de órgão gemífero, bem como o tipo de distribuição espacial da espécie.

Propagação *in vivo*

Para obtenção de gemas radiculares, *Psychotria ipecacuanha* foi propagada vegetativamente por meio de estacas radiculares.

Fragmentos de raízes, com aproximadamente 5 cm de comprimento, foram desinfestados por imersão em uma solução de Benlate 0,1 %, durante 15 minutos, e submetidos à lavagem em água destilada sendo, logo após, colocados em uma solução de hipoclorito comercial a 5%, por 30 minutos e submetidos a 4 lavagens em água destilada.

Os fragmentos radiculares foram cultivados e mantidos em locais sombreados com cobertura de sombrite (70%) em casa de vegetação. Foi testada a aplicação de BAP (benzilaminopurina) 2 mg L⁻¹, com pulso de 24 horas. O material foi cultivado em meio hidropônico, em bandejas com

sistema de arejamento com 20 fragmentos radiculares para cada tratamento, num total de 80 segmentos. Realizaram-se 4 (quatro) tratamentos, sendo os fragmentos cultivados por 180 dias em:

- 1 – água destilada;
- 2 – solução de Hoagland (pulso de 24 h suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP);
- 3 – água destilada (pulso de 24 h suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP);
- 4 – solução de Hoagland;

Também foram cultivadas 70 plantas inteiras, visando à propagação vegetativa. As plantas foram cultivadas em vasos de polietileno, com capacidade de 6 L, contendo uma mistura de solo, esterco e areia (na proporção 3:1:1), com irrigação a cada dois dias. As plantas foram cultivadas por 270 dias.

O material testemunho foi preparado segundo as normas de herborização e depositado no Herbário VIC, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa – UFV, sob registro de número 26.678.

Anatomia das gemas radiculares

Foram coletadas raízes com gemas adventícias, em diferentes estádios de desenvolvimento, para a realização dos estudos anatômicos, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Os segmentos com raízes gemíferas, diferenciadas *in vivo*, foram coletados e fixados em FAA₅₀ (Johansen, 1940) e submetidas a vácuo. As amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em parafina (Johansen, 1940). Foram obtidos cortes seriados transversais e longitudinais, com 10 µm de espessura, utilizando-se micrótomo rotativo LEICA RM 2155. Após a desparafinização, os cortes foram corados com safranina (em solução alcoólica 50%), durante 40 minutos, e azul de Astra, por 10 minutos (Gerlach 1969), e montados em bálsamo do Canadá.

Foram realizados testes com lugol, em fragmentos radiculares gemíferos não fixados, para a evidenciação de grãos de amido. As seções foram obtidas utilizando-se de um micrótomo de mesa (Ernst Leitz – Wetzlar).

As observações e os registros fotográficos foram realizados em um microscópio estereoscópio Olympus SZH e num microscópio Olympus AX70, com sistema U-Photo.

RESULTADOS

Aspectos da reprodução vegetativa

Psychotria ipecacuanha ocorre em formações do tipo “reboleiras” (Fig. 1). O sistema subterrâneo radicular atinge aproximadamente 20-40 cm de profundidade no solo. As observações realizadas no campo indicam que a espécie apresenta aspecto semidecidual, e de acordo com as condições do ambiente ocorre a perda parcial da parte aérea. As gemas radiculares são formadas na época de chuvas entre os meses de novembro a março. Em meio natural ocorre a proliferação de gemas adventícias formadas em raízes interligadas a planta de origem, ou partir de segmentos radiculares isolados que sofreram injúria mecânica.

Após escavação, observou-se que quando as gemas radiculares subterrâneas estão dispostas horizontalmente, seu desenvolvimento dá origem a um caule com regiões sinuosas paralelas a superfície do solo antes de emergir; quando dispostas verticalmente, originam caules eretos, que atingem a superfície do solo como visto na Fig. 2.

A regeneração da espécie é principalmente via raiz gemífera (Fig. 3, 4 e 5), entretanto, formam-se gemas axilares oriundas do sistema caulinar, situadas na região do nó. Geralmente, o sistema caulinar apresenta porções prostadas ao solo, das quais são originadas raízes adventícias, na região do entre-nó (Fig. 6). O caule aéreo em estágio secundário de crescimento apresenta estrutura típica com um córtex amplo, destacando-se sucessivos felogênios (Figs 8-10), originados por divisões tanto de células epidérmicas (Fig. 7) quanto de células subepidérmicas (Fig. 8). Na região onde são formadas as raízes adventícias, observa-se a presença de felogênio e do súber situados internamente ao colênquima (Fig. 8). Após a emergência das raízes adventícias, o colênquima e o súber são eliminados, promovendo uma descamação de todo o caule (Fig. 9). O sistema caulinar apresenta endoderme nítida com estrias de Caspary proeminentes (Fig. 11) e na epiderme foram observados tricomas tectores unisseriados (não documentado).

Os caules subterrâneos e aéreos, em estágio de desenvolvimento primário, possuem estrutura eustélica típica. No caule formado subterraneamente, a partir de gemas radiculares, destaca-se a presença de grande quantidade de amido localizada na região cortical (não documentado).

As raízes são protostélicas e poliarcas, apesar de serem adventícias, apresentam estrutura típica, com a ausência de medula, com o xilema ocupando a região central do órgão (Fig. 12), e muito cedo se estabelece o crescimento secundário (Fig. 13).

Propagação *in vivo*

Foram necessários aproximadamente 60 dias de cultivo hidropônico, para que as estacas radiculares produzissem gemas adventícias. Foram produzidas aproximadamente 12,5 gemas por segmento, nos cultivos em solução de Hoagland com a presença ou ausência de BAP. Nos tratamentos com água destilada e citocinina (2 mg L^{-1} de BAP) formou-se uma média de 5,5 de gemas por segmento, e no tratamento com apenas água destilada observou uma proporção de 8 gemas por segmento.

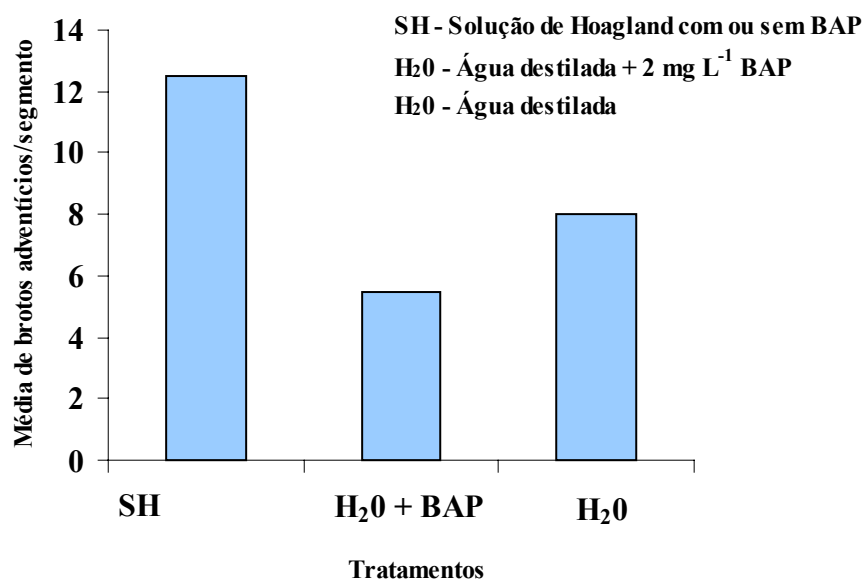


Figura 14: Representação gráfica da média de produção de brotos adventícios em segmentos radiculares de *P. ipecacuanha*, cultivados em meio hidropônico com sistema de arejamento em diferentes tratamentos, em local sombreado por 60 dias.

Nos tratamentos com BAP principalmente com água destilada, observou-se primeiramente a formação de raízes laterais. Em todos os tratamentos, as gemas adventícias distribuíram-se por todo o segmento radicular.

O cultivo hidropônico das estacas radiculares foi dificultado pela rápida decomposição. Observou-se que estacas radiculares menores que 5 cm (com aproximadamente 1cm) produziam gemas adventícias.

As plantas que foram cultivadas em vasos de polietileno apresentaram bom desenvolvimento e produção de gemas adventícias principalmente no sistema radicular. Após 8 meses de cultivo, ocorreu a produção de gemas neoformadas, já com expansão da parte aérea acima da superfície do solo, em 30% dos vasos.

Ontogenia das gemas radiculares

As gemas radiculares formam-se na região periférica da raiz em crescimento secundário (Fig. 15). As gemas radiculares apresentam desenvolvimento assincrônico observando-se gemas adventícias em vários estádios de desenvolvimento (Fig. 15) num mesmo segmento radicular.

As gemas radiculares se originam do felogênio cujas células se dividem nos planos anticlinal e periclinal, formando uma massa de células homogêneas e compactas, denominadas de meristemóides, que caracteriza o primeiro estágio de diferenciação e desenvolvimento das gemas radiculares (Fig. 14).

As células do domo apical são isodiamétricas, envoltas por uma camada com padrão de divisão predominantemente anticlinal. O desenvolvimento do meristema apical provoca o rompimento das camadas da periderme e as gemas providas de primórdios foliares em diferenciação, na superfície da raiz, tornam-se visíveis (Figs 15 e 16). Nos estádios mais tardios do crescimento definem-se os entrenós caulinares e é estabelecida a conexão do procâmbio do broto adventício, em desenvolvimento, com o sistema vascular da raiz (Fig. 17).

Desde os estádios iniciais do desenvolvimento das gemas, observa-se a presença de inúmeros idioblastos com ráfides (Fig. 18). Nos estádios de desenvolvimento mais tardio dos brotos adventícios formam os primórdios foliares (Fig. 19). Os primórdios foliares formados inicialmente originam as folhas diminutas e incolores subterrâneas; posteriormente se diferenciam folhas clorofiladas.

A reação ao lugol revelou a presença abundante de grãos de amido, principalmente no parênquima cortical da raiz (Fig. 20).

Figuras 1 a 6: Aspectos da reprodução vegetativa de *Psychotria ipecacuanha*. **1** - Vista geral de uma reboleira (Bar = 10 mm); **2** - Diferenças morfológicas nos caules oriundos dos brotos adventícios radiculares (Bar = 5 mm); **3** - Morfologia externa de segmento radicular evidenciando as gemas e brotos adventícios em diferentes estádios de desenvolvimento; **4** - Brotos adventícios emergidos em segmento radicular cultivado em solução nutritiva de Hoagland (Bar = 10 mm); **5** - Broto adventício com desenvolvimento do sistema radicular; **6** - Porção curva do entre-nó caulinar evidenciando o desenvolvimento de raízes adventícias (Bar = 15 mm); Re – reboleira; CD - caule sinuoso originado de uma gema radicular; CE - caule ereto; GR: gema adventícia radicular; RA - raiz adventícia; N - nó caulinar; EN – entre-nó caulinar. Br - broto adventício.

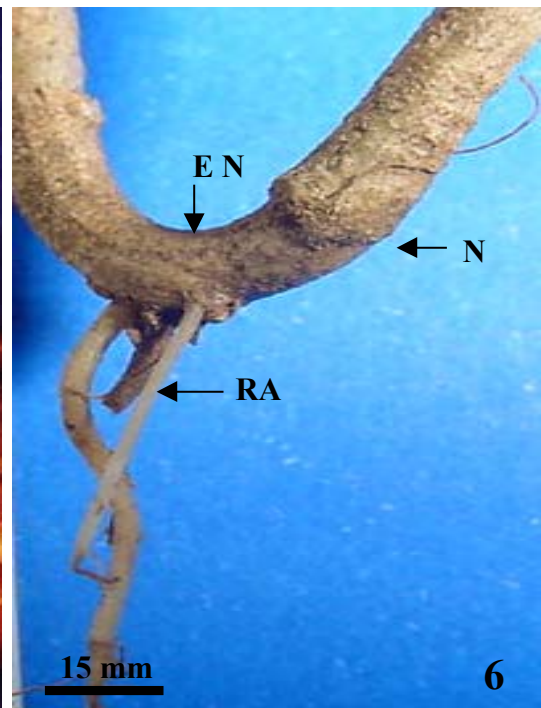
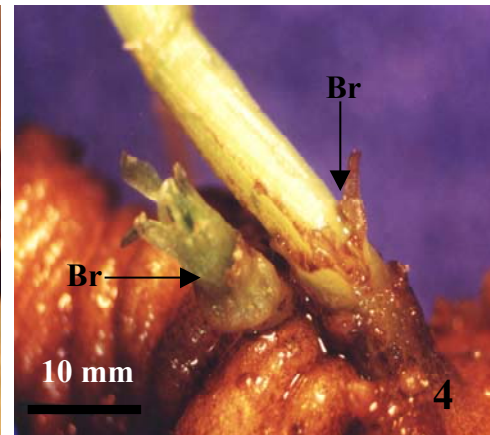
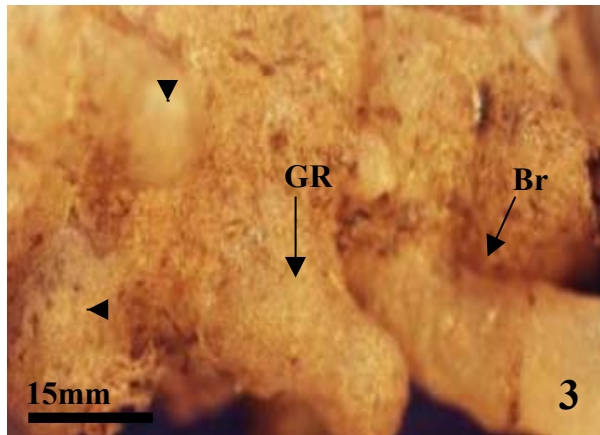
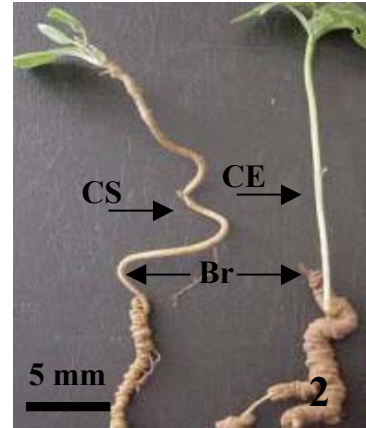
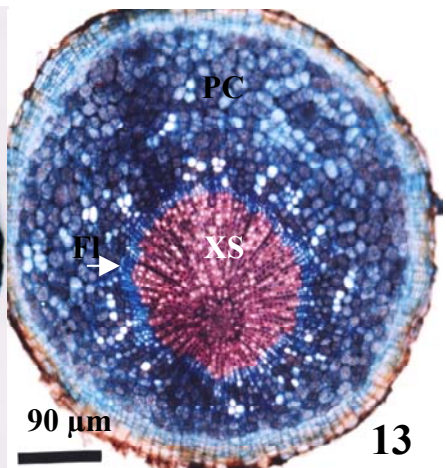
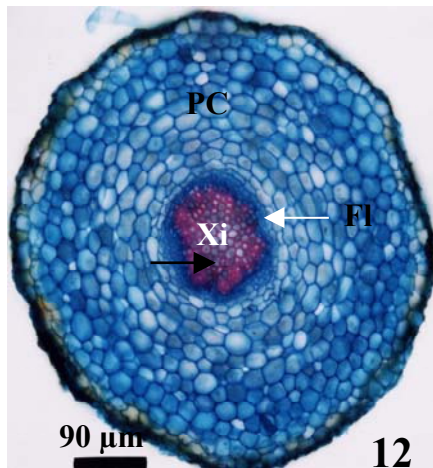
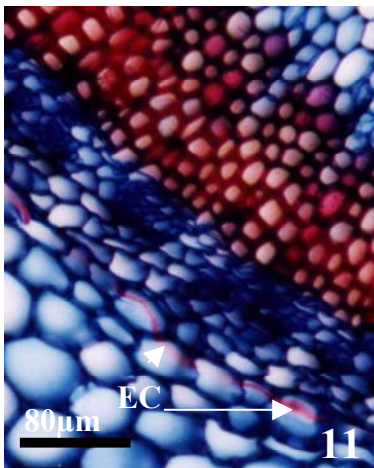
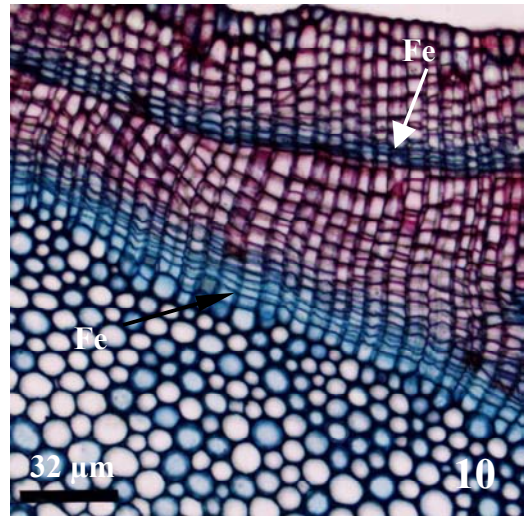
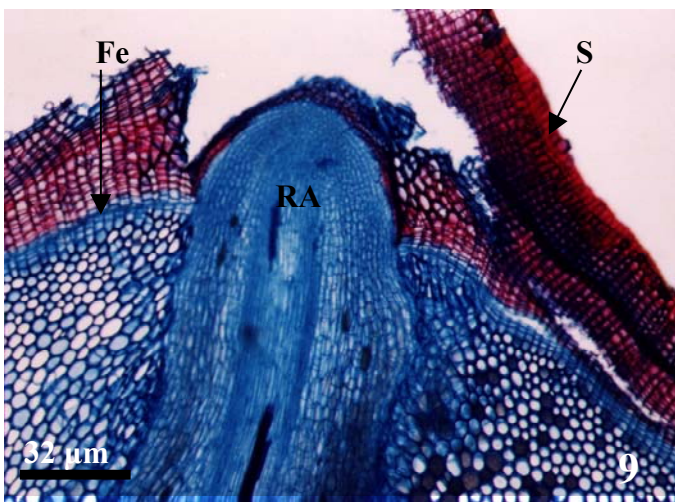
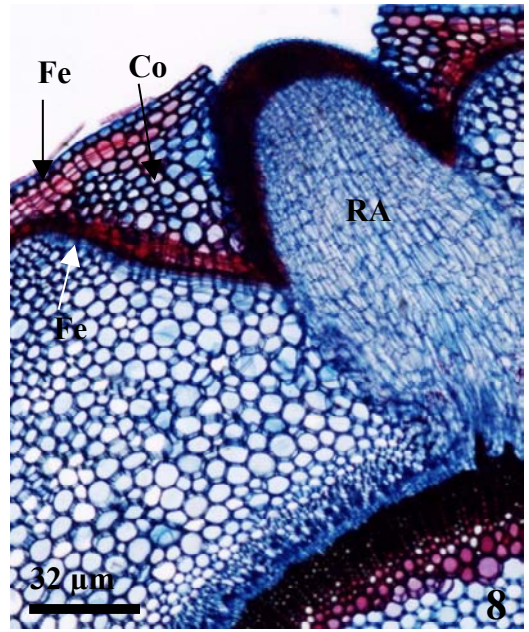
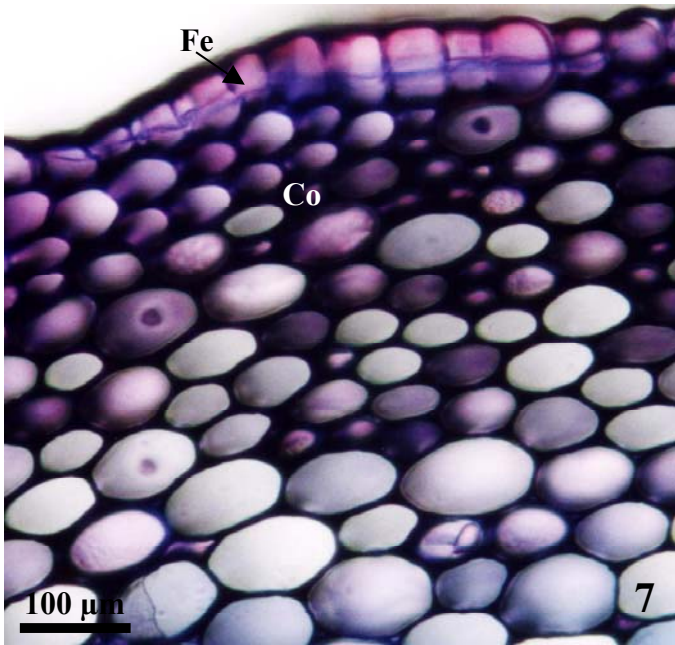
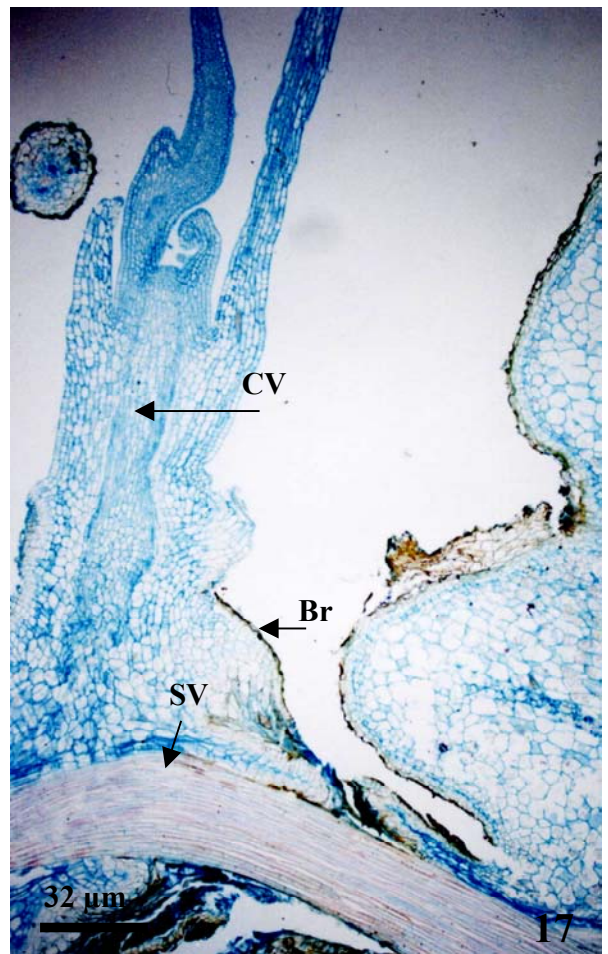
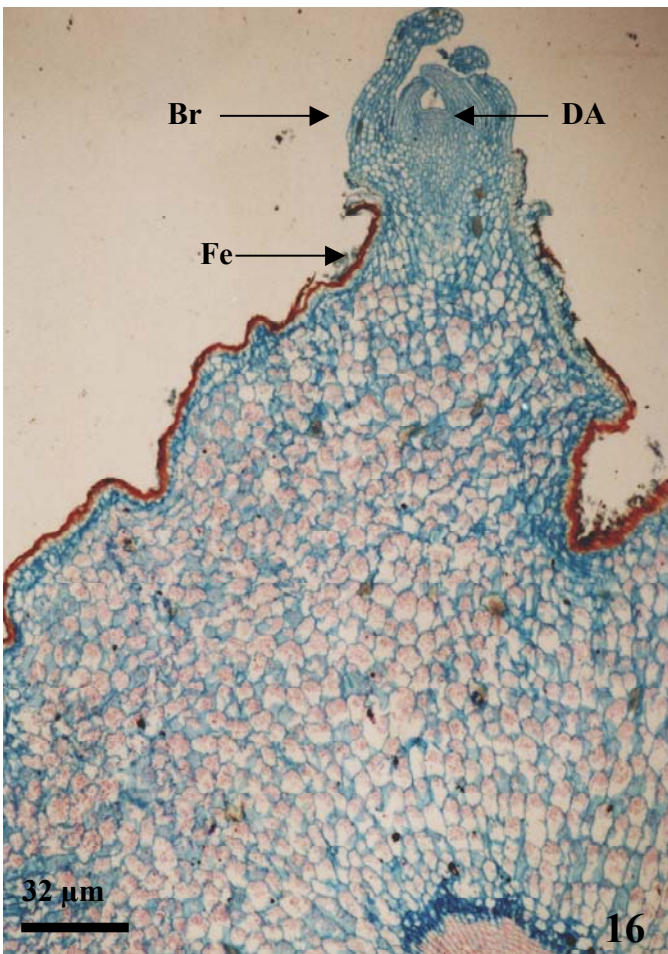
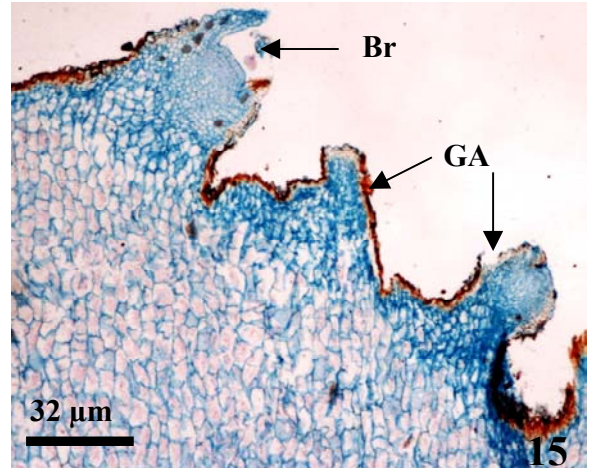
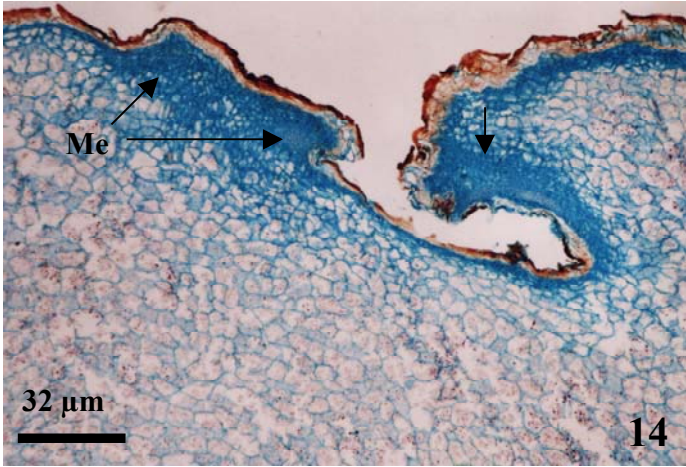


Figura 7 a 13: Cortes transversais do caule aéreo e de raízes adventícias de *Psychotria ipecacuanha*.

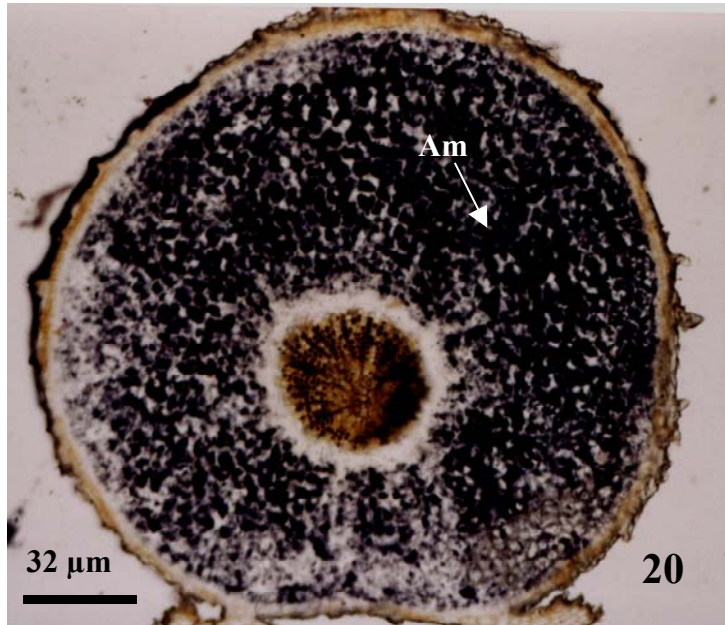
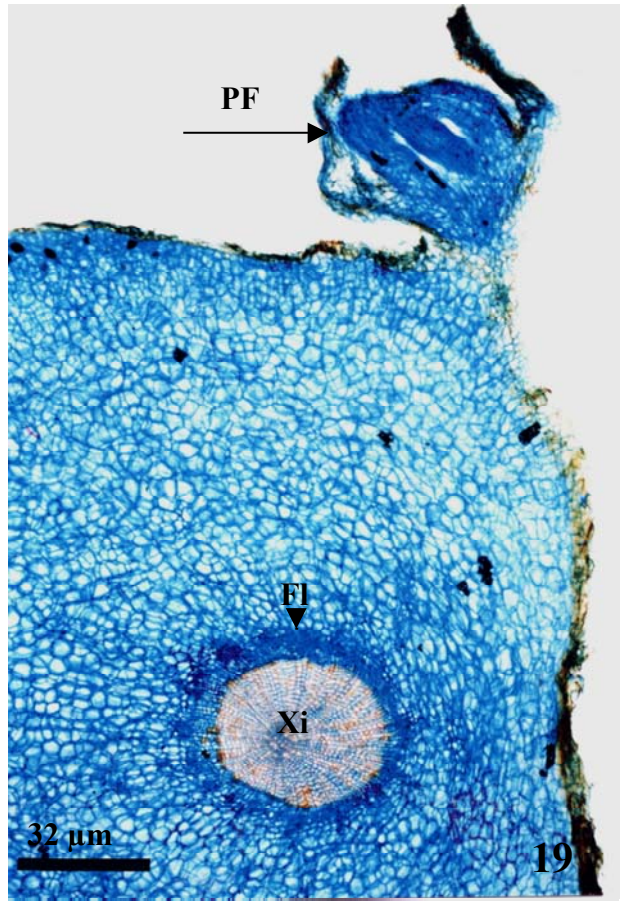
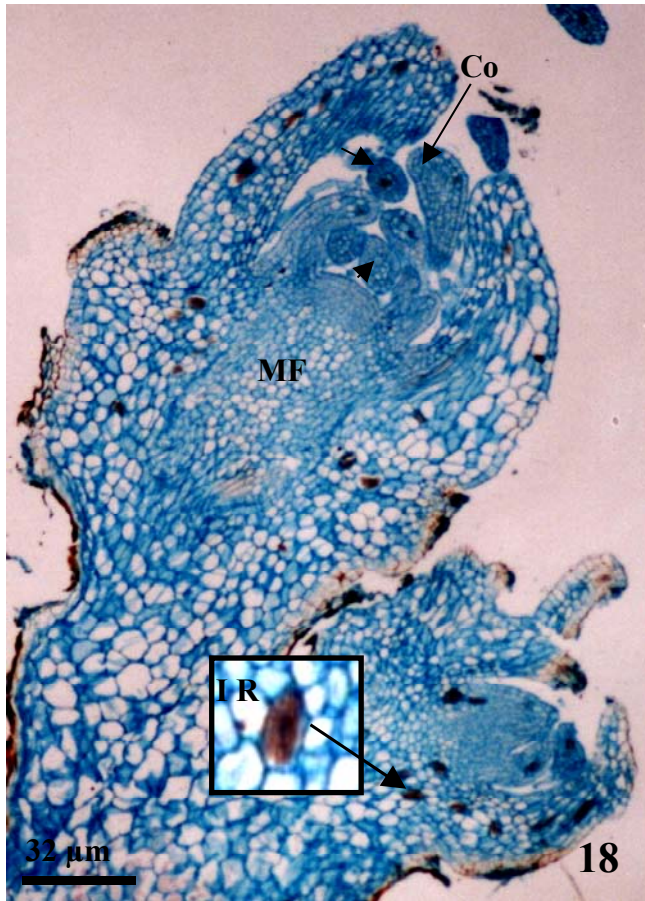
7 e 8 - Epiderme caulinar se dividindo periclinalmente originando o felogênio (Bar = 100 μm); **9** - Emergência de raiz adventícia em caule aéreo de *P. ipecacuanha*, felogênio situado subepidérmico internamente ao colênquima; **10** - Eliminação do colênquima e de camadas mais externas de súber após emergência da raiz adventícia. Barra = 32 μm . **11** - Formação de felogênios sucessivos no caule (Bar = 80 μm); **F** - Endoderme com estrias de Caspary. **12** - Raiz adventícia protostélica e poliarca com xilema ocupando a parte central do órgão; **13** - Raiz adventícia e crescimento secundário com periderme evidente. Barra = 90 μm . Co - colênquima; Fe - felogênios; EC - estrias de Caspary; Xi - xilema primário; XS - xilema secundário; S - súber; RA - raiz adventícia; PC - parênquima cortical.



Figuras 14 a 17: Ontogenia de gemas adventícias radiculares em *Psychotria ipecacuanha*. (14 - 16; cortes transversais; 17 - corte longitudinal) **14** - Início do desenvolvimento dos primórdios das gemas adventícias, na região periférica do felogênio com a formação dos meristemóides **15** - Diferentes estádios de desenvolvimento das gemas adventícias; **16** - Emergência de uma gema adventícia, já com os primórdios foliares, e eliminação da periderme; **17** - Sistema vascular dos brotos adventícios evidenciando a conexão com a raiz de origem. Barra = 32 μ m. Me -meristemóide; - GA - gema adventícia em diferentes estádios; Fe - felogênio; CV - conexão vascular; DA - domo apical; SV - sistema vascular da raiz gemífera; Am - amido.



Figuras 18 a 20: Ontogenia de gemas adventícias radiculares em *Psychotria ipecacuanha*. (cortes transversais). **18** - Região do domo apical com a presença de coléteres e idioblastos com ráfides; **19** - Gema adventícia na periferia de uma estrutura tipicamente radicular e a diferenciação dos primórdios foliares; **20** - Grãos de amido no parênquima cortical da raiz evidenciado pelo lugol. Barra = 32 μ m. Am - amido. Co - coléter; CV - conexão vascular; Fl - floema; IR - idioblastos com ráfides; MF - meristema fundamental; PF - primórdio foliar; SV - sistema vascular da raiz gemífera; Xi - xilema.



DISCUSSÃO

Informações sobre os processos envolvidos na formação de gemas adventícias são escassos na literatura. Neste contexto, o presente trabalho descreve pela primeira vez a ontogenia de gemas adventícias formadas em raízes gemíferas de *Psychotria ipecacuanha* e destaca os aspectos principais envolvidos na reprodução vegetativa da espécie.

A propagação vegetativa de *P. ipecacuanha* ocorre principalmente via raiz. Entretanto, gemas também são originadas no caule, o que também foi relatado por Pinto (1972), Alzugaray & Alzugaray (1988), Salick (1995) e Oliveira & Martins (1998).

O sistema subterrâneo radicular gemífero de *P. ipecacuanha* se encontra disposto no solo em profundidades de 20 a 40 cm. Em geral, sistemas gemíferos são encontrados na superfície do solo. Entretanto, Rizzini & Heringer (1966), em estudos de regeneração via raiz gemífera em regiões do cerrado, destacam que, dependendo da espécie, o sistema radicular gemífero pode apresentar-se disposto superficialmente ou se desenvolver em camadas mais profundas do solo.

P. ipecacuanha apresenta distribuição agregada, e o sistema subterrâneo, geralmente, encontra-se interligado formando as “reboleiras”. A propagação vegetativa possibilita a formação de “novos indivíduos” próximos à planta-mãe, podendo promover uma distribuição espacial agregada, semelhante ao descrito para *Machaerium stipitatum* e *Centrolobium tomentosum* (Penha, 1998; Rodrigues *et al.*, 1990). Os brotos oriundos de gemas adventícias que crescem próximos à planta-mãe, geralmente, permanecem conectados e formam parte integral da planta original (Hudson, 1955).

Para a propagação vegetativa da espécie, o cultivo de estacas radiculares em solução de Hoagland foi considerado o mais aconselhável, pois ocorre maior proliferação de gemas adventícias, e são assegurados os nutrientes básicos para o seu desenvolvimento. A utilização de citocinina é desnecessária, porque a espécie apresenta um grande potencial regenerativo. Porém, observou-se que este sistema de cultivo foi dificultado pela facilidade de decomposição das estacas radiculares (aproximadamente 50 %). Entretanto, após redução do tamanho das estacas radiculares provocada pela decomposição, fragmentos menores que 5 cm produziram gemas adventícias. Resultados similares foram obtidos por Peterson (1975) em cultivo de fragmentos radiculares da espécie herbácea *Hierancium florentinum*. O comprimento e o diâmetro dos fragmentos radiculares gemíferos podem

influenciar a capacidade organogenética na formação das gemas adventícias, entretanto, ocorrem variações entre as espécies (Peterson, 1975). A definição do comprimento da estaca radicular está correlacionada com a capacidade de armazenamento de substâncias de reservas em cada espécie, estas quando disponíveis proporcionam a manutenção no desenvolvimento inicial das gemas radiculares (Browse, 1979). O fato de estacas com tamanho inferior a 5 cm terem produzido gemas adventícias pode estar relacionado ao acúmulo de amido, característico das raízes de *P. ipecacuanha*.

De acordo com alguns autores (Gatoni, 1959; Chatterjee, 1993; Yoshimatsu & Shimomura, 1993), as dificuldades principais na viabilidade de cultivo de *P. ipecacuanha*, com finalidade comercial, estão relacionadas ao longo tempo de desenvolvimento, 3 a 4 anos para que ocorra acúmulo ideal dos alcalóides eméticos, e a perda da viabilidade da semente após estocagem. A reprodução vegetativa para a espécie é considerada a mais viável, sendo os fragmentos radiculares os mais indicados para a propagação *in vivo* (Pinto, 1972).

Os experimentos de cultivo hidropônico diferiram, principalmente, quanto ao tipo de órgão vegetativo obtido: nos fragmentos onde se utilizou fitoregulador primeiramente foram formadas raízes adventícias enquanto nos outros tratamentos originaram-se, primeiramente, gemas adventícias. Em *Hierancium florentinum* as citocininas exógenas influenciaram diretamente na indução de gemas adventícias (Peterson, 1975). No entanto, Montaldi (1937) relata que citocininas podem estimular a formação de brotos e/ou raízes adventícias, quando segmentos de raiz são excisados.

As gemas radiculares de *P. ipecacuanha* podem ser produzidas em fragmentos isolados de raiz ou naqueles interligados à planta de origem. A perda parcial da parte aérea ocorre naturalmente nos meses de baixo regime hídrico, e após passagem deste período, ocorre a propagação vegetativa por caule e raízes. Neste caso a sazonalidade influencia na indução de gemas adventícias, atuando como um estímulo à reprodução vegetativa.

Schier (1973) relata o papel da auxina como fator de inibição na produção de gemas radiculares, sendo assim para algumas espécies as gemas radiculares só se desenvolvem após seccionamento da parte aérea, pois há a remoção da dominância apical (Lacey & Johnston, 1990). Estas características foram confirmadas por Hayashi (1998) em *Machaerium stipitatum* e *Centrolobium tomentosum*. No presente estudo, em *P. ipecacuanha*, as gemas podem ser originadas, seja pelo seccionamento das raízes ou pela perda natural das folhas havendo, entretanto, a manutenção da gema apical. A perda parcial da parte aérea atua como um fator indutor da rebrota, a partir de raízes gemíferas, na dependência da taxa quantitativa da perda das folhas e do tempo de sua regeneração (Kefford & Caso, 1972; Schier, 1973; Peterson 1975).

De acordo com Peterson (1975), existe uma variação em relação aos tecidos radiculares envolvidos nos sítios de iniciação dos primórdios das gemas e os padrões de desenvolvimento variam dependendo da região da raiz onde ocorre a sua formação. O autor, com respaldo na literatura analisada, sugere 6 sítios de iniciação na formação das gemas radiculares: (1) periciclo (Taylor, 1926; Priestley & Swingle, 1929; Baskshi & Coupland, 1960; Myers *et al.*, 1964; Bonnet & Torrey, 1966; Peterson, 1975); (2) felogênio e outros tecidos derivados do periciclo (Baskshi & Coupland, 1959; Apezato-da-Glória & Estelita, 1995); (3) iniciação de gemas no córtex, relacionadas a emergência das raízes laterais (Baskshi & Coupland, 1960; Polowick & Raju, 1982); (4) iniciação de gemas no córtex não relacionado à emergência das raízes laterais (Wardlaw, 1953; Peterson, 1968; Bell, 1996); (5) ápice radicular (Peterson, 1970); (6) calo radicular (Priestley & Swingle, 1929; Lacey & Johnston, 1990; Bell 1996). As gemas radiculares em *P. ipecacuanha* são formadas na região mais periférica da raiz e se enquadram no tipo 2 - felogênio e outros tecidos derivados do periciclo. Apezato-da-Glória (1995) observou que a região de iniciação das gemas adventícias em *Mandevilla vellutina* e *M. illustris* é similar ao sítio de iniciação a *P. ipecacuanha*, como também foi verificado em *Machaerium schottiana* e *C. tomentosum* por Hayashi (1998).

Em *P. ipecacuanha* as gemas, apesar de se formarem em tecido mais superficial da raiz, devem ser consideradas endógenas, devido a sua origem ser oriunda de tecidos derivados do periciclo, de acordo com Priestley & Swingle (1929).

No caule de *P. ipecacuanha* a formação de sucessivos felogênios pode estar relacionada com a proteção dos primórdios de raiz adventícia, pois se originam sucessivas camadas de súber com posterior descamação. Na região de emissão de raízes adventícias, o felogênio funciona como uma camada protetora já com súber. Este evento é pouco comum dentre as espécies de dicotiledôneas. Outro aspecto relevante é a formação das raízes adventícias, com a ausência de medula, sendo que a sua presença, de acordo com Esau (1965), caracteriza morfológicamente esse tipo de raiz.

A formação dos meristemóides, nos estádios iniciais de desenvolvimento das gemas radiculares, também foi observada por Hayashi (1998) em *Machaerium stipitatum*.

Sucessivos eventos estão presentes nos processos morfogênicos envolvidos na formação de gemas, relacionadas a reprodução vegetativa. Wardlaw (1952) relata os principais eventos na formação de gemas em pteridófitas: (i) quebra da dominância apical, em consequência da remoção do meristema apical; (ii) divisão celular de células isoladas do meristema e a transmissão centrípeta de estímulos para o crescimento; (iii) produção de uma massa de tecido meristemático, podendo induzir a formação de uma ou mais gemas; (iv) organizações de gemas meristemáticas com disposição distal

consistindo de um grupo de células iniciais e a sua diferenciação em tecido vascular; (v) diferenciação mais ou menos conspícua na região central das células apicais, formando um sistema de segmentação apical regular; (vi) formação de primórdio foliar. Estes eventos descritos para pteridófitas foram também observados no desenvolvimento de gemas adventícias de *P. ipecacuanha*.

As injúrias mecânicas e a perda parcial da parte aérea, são mecanismos de indução da formação de gemas adventícias radiculares, em meio de cultivo. Aparentemente, ocorre um desequilíbrio na concentração e translocação de auxinas endógenas, produzidas na parte aérea, que proporciona maior concentração de citocininas endógenas, estimulando a formação de inúmeras gemas adventícias nas raízes de *Psychotria ipecacuanha*. As gemas adventícias radiculares de *P. ipecacuanha* foram classificadas como reparativas, desenvolvendo caules vigorosos como foi verificado no campo e em cultivo. De acordo com Sandberg (1951) as gemas adicionais são menos aptas a produzirem caules vigorosos do que nas gemas reparativas.

Nos primórdios das gemas radiculares, e em toda porção da raiz, há a presença de inúmeros idioblastos com ráfides. Entretanto, na região meristemática das gemas os idioblastos com as ráfides são mais abundantes. As ráfides, aparentemente, podem estar correlacionadas com a alta taxa metabólica nas raízes gemíferas. Na porção do domo apical estão localizados os coléteres, estruturas comuns na família Rubiaceae, como verificado na espécie *Dioidia virginiana* (Baird *et al.*, 1992).

O teste histoquímico, realizado nas raízes de *P. ipecacuanha*, revelou a presença abundante de amido o qual pode estar exercendo influente papel no estabelecimento e manutenção das gemas adventícias, mediante disponibilização de suprimento energético principalmente para os primórdios em desenvolvimento. Thorpe & Murashige, 1968, *apud* Kerbauy (1998), verificaram forte correlação entre o acúmulo de amido e a iniciação de gemas adventícias, em cultura *in vitro* de calos de fumo (*Nicotiana tabacum*), sendo assim, os autores inferem que o amido influencia diretamente no processo organogênico. Portanto, os compostos de reserva armazenados nas raízes gemíferas tornam-se disponíveis para o processo de iniciação e desenvolvimento de gemas radiculares (Apezzato-da-Glória, 2000). Hayashi (1998), estudando 8 espécies arbóreas com sistema subterrâneo gemífero, verificou que o amido é o composto de reserva predominante nestes sistemas.

CONCLUSÕES

A reprodução vegetativa em *Psychotria ipecacuanha* ocorre a partir do sistema subterrâneo radicular e caulinar.

A propagação via estacas radiculares em cultivo hidropônico principalmente em solução de Hoagland (12,5 brotos por segmento), foi considerada a mais recomendada, quando comparado com o cultivo em vasos.

Na análise anatômica do caule de *Psychotria ipecacuanha* destaca-se a formação de sucessivos felogênios, sendo a sua origem mista a partir de células epidérmicas e, ou, subepidérmicas.

As raízes adventícias não apresentam medula e estão localizadas na porção do entre-nós caulinares prostados ao solo.

O felogênio é o sítio de formação das gemas adventícias radiculares. Os eventos morfogênicos envolvidos nesta formação, iniciam-se com a divisão em vários planos das células do felogênio, e sua diferenciação formando os meristemóides.

As gemas radiculares em *Psychotria ipecacuanha* são do tipo reparativas e desenvolvem-se assincronicamente.

O composto de reserva predominante nas raízes gemíferas é o amido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZURAGAY, D. & ALZURAGAY, C. **Enciclopédia de plantas brasileiras**, São Paulo: Edt. Três, 1988, 300 p.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA M. E. M. Caracteres anatômicos da propagação vegetativa de *Mandevilla illustris* (Vell.) Woodson e de *M. vellutina* (Mart. Ex Stadelm) Woodson Apocynaceae. In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Ilha Solteira, **Anais Ilha Solteira: SBSP**, 1995, p. 5-13.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & ESTELITA M. E. M. The developmental anatomy of the subterranean system in *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and *M. vellutina* (Mart. Ex Stadelm.) Woodson (Apocynaceae). **Revista brasileira de Botânica**, v. 23, p. 27-35, 2000.

ASSIS, M. C. & GIULLIETTI, A. M. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de “ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 205-216, 1999.

BAIRD, J.H.; DUTE, R.R. & DICKENS, R. Ontogeny, anatomy, and reproductive biology of vegetative reproductive organs of *Dioidia virginiana* L. (Rubiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 153, p. 320-328, 1992.

BASKSHI, T.S. & COUPLAND, R.T. An anatomical study of the subterranean organs of *Euphorbia esula* in relation to its control. **Canadian Journal of Botany**, v. 37, p. 613-620, 1959.

BASKSHI, T.S. & COUPLAND, R.T. Vegetative propagation in *Linaria vulgaris*. **Canadian Journal of Botany**, v. 38, p. 243-249, 1960.

BASKIN, J.M. & BASKIN, C.C. Temperature relations for bud growth in the root geophyte *Pediomelul subacaule* and ecological implications. **Botanical Gazette**, v. **151**, p. 506-509, 1990.

BELL, A.D.; PATE, J.S. & DIXON, K.W. Relationships between fire response, morphology, root anatomy and starch distribution in south-west Australian Epacridaceae. **Annals of Botany**, v. **77**, p. 357-364, 1996.

BONNETT, H.T JR., & TORREY, J.G. Comparative anatomy of endogenous bud and lateral root formation in *Convulvulus arvensis* roots in vitro. **American Journal of Botany**, v. **53**, p. 496-507, 1966.

BROWNSE, P.M. **A propagação das plantas**. 2. ed., In.: Publicações Europa América, 1979, 229 p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier, 1999, 1119 p.

CAMINHA FILHO, A. A ipecacuanha *Evea ipecacuanha* (Brotero) Standley. **Boletim do Ministério da Agricultura** (Rio de Janeiro) v. **32**, p. 33-32, 1943.

CHARTEJEE, S.K. Domestication studies of some medicinally important exotic plants growing in Indian. **Acta Horticulturae**, v. **331**, p. 151-158, 1993.

ESAU, K. **Plant anatomy**. 2. ed., New York: John Wiley and Sons, 1965, 767 p.

FARMER JR. R.E. Aspen root sucker formation and apical dominance. **Forest Science**, v. **8**, p. 403-410, 1962.

GATTONI, L.A. **La raicilla a ipecacuanha**. Panamá: Ministerio da Agricultura, Comércio e Indústria, 1959, 32 p.

GERLACH, G. **Botanische microtechnik eine einfuhrung**. Stuttgart: George Thieme Verlag, 311 p. 1984.

GREIG, N., MAUSETH, J.D. Structure and function of dimorphic prop roots in *Piper auritum* L. **Bulletin of the Torrey Botanic Club**, v. **118**, p. 176-183, 1991.

HAYASHI, A. H. **Estudos anatômicos de raízes gemíferas de espécies arbóreas e arbustivas de um fragmento florestal em Campinas (SP)**. Piracicaba: ESALQ, 1998, 63 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", 1998.

HUDSON, J.P. Propagation of plants by root cuttings I. Regeneration raspberry root cuttings. **Journal of Horticultural Science**, v. **29**, p. 27-43, 1954.

HUDSON, J.P. Propagation of plants by root cuttings II. Seasonal fluctuation of capacity to regenerate from roots. **Journal of Horticultural Science**, v. **30**, p. 242-251, 1955.

JANZEN, D.H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1980, 79 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc. Graw Hill Book, 1940, 523 p.

KEFFORD, N.P. & CASO, O.H. Organ regeneration on excised roots of *Chondrilla juncea* and its chemical regulation. **Australian Journal o Biological Sciences**, v. **25**, p. 691-706, 1972.

KERBAUY, G. B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v. 1, Brasília: EMBRAPA, 1998, p. 161-181.

KORMANIK, P.P. & BROWN, C.L. Root buds and the development of roots suckers in sweetgum. **Forest Sciences**, v. **13**, p. 338-345, 1967.

LACEY, C.J. & JOHNSTON, R.D. Woody clumps and cumpwoods. **Australian Journal of Botany**, v. **38**, p. 299-334, 1990.

MONTALDI, E.R. Kinetin induction of bud differentiation on roots of entire plants. **Pflphysiology**, v. **67**, p. 43-44, 1937.

MYERS, G.A., BEASLEY, C. A., DERSCHEID, L.A. Anatomical studies of *Euphorbia esula* L. **Weeds**, v. **12**, p. 291-295, 1964.

OLIVEIRA, L. O., MARTINS, E. R. **O desafio das plantas medicinais brasileiras: I – o caso da poaia (*Cephaelis ipecacuanha*)**. Campos dos Goytacazes: UENF: FENORTE, 1998, 73 p.

PENHA, A.S. **Propagação vegetativa de espécies arbóreas a partir de raízes gemíferas: representatividade na estrutura fitossociológica e descrição os padrões de rebrota de uma comunidade florestal**. Campinas: UNICAMP, Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 1998.

PETERSON, R. L. The initiation and development of root buds. In: J. G., Torrey and D. T. Clarkson. **The development and function of roots**. New York: Academic Press, 1975, p. 125-161.

PETERSON, R. L. Bud on the roots of *Hieracium florentinum* (hawkweed). **Canadian Journal of Botany**, v. **49**, p. 53-54, 1970.

PINTO, C. M. D. A ipecacuanha. In: Simpósio Internacional sobre as plantas de interesse econômico de la Flora Amazônica IICA. Belém, 1972, p. 109-119.

POLOWICK, P.L., RAJU, M.V.S. The origin and development of root buds in *Asclepias syriaca*. **Canadian Journal of Botany**, v. **60**, p. 2119-2125, 1982.

PRIESTLEY, J.H., SWINGLE, C.F. Vegetative propagation from the standpoint of plant anatomy. **USDA Technical Bulletin**, v. **151**, p. 1-98, 1929.

RAJU, M.V. S. STEVES, T. A., COUPLAND, R. T. On the regeneration of root fragments of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Weed Research**, v. **4**, p. 2-11, 1964.

RAJU, M.V. S., COUPLAND, R. T. STEVES, T. A. On the occurrence of root buds on perennial plants in Saskatchewan. **Canadian Journal of Botany**, v. **44** (1), p. 235-247, 1966.

RIZZINI, C. T. & HERINGER, E. P. Studies on the underground organs of trees and shrubs from southern Brazilian savannas. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. **34**, p. 85-112, 1966.

RIZZINI, C. T. & HERINGER, E. P. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. **38**, p. 85-112, 1966.

RODRIGUES, R.R.. MATTHES, L.A.F., TORRES, R.B. Espécies arbóreas – distribuição agregada ou vegetativa?, In: Congresso Latino Americano de Botânica. Havana, 1990, **Resumos**, Havana, 5 ed., 1990, p. 112.

ROOD, S.B., HILLMAN, C., SANCHE, T., MAHONEY, J. Clonal reproduction riparian cottonwoods in southern Alberta. **Canadian Journal of Botany**, v. **72**, p. 1766-1774, 1994.

SALICK, J. Toward an integration of evolutionary ecology and economic botany: personal perspectives on plant/people interactions. **Annal of Missouri Botanical Garden**, v. **82**, p. 25-33, 1995.

SANDENBERG, D. **The regeneration of quaking aspen by root suckering**. Master (M.S.) Minnesota School of Forestry, University Minnesota of, 1951.

YOSHIMATSU, K. & SHIMOMURA, K. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) Micropropagation and the production of emetine and cephaeline. In: Bajaj Y. P. S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture Forestry – Medicinal and Aromatic Plants**, v. **21**, IV Berlin: Springer Verlag, p. 87-103, 1993.

WARDLAW, C.M. **Morphogenesis in plants**. London: Methuen & Co., Ltda.: John Wiley & Sons, Inc., 1ª ed., 1952, 176 p.

WITTRICK, V.B. Ueber Wurzelsprossen bei Krautartigen Gewachsen, mit besonderer Ruchischt auf ihre verschiedene biologische Bedeutung. **Botanical**, v. **17**, 227-232, 1884.

CAPÍTULO III

Organogênese *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae a partir de hipocótilos

RESUMO

P. ipecacuanha é considerada uma das espécies medicinais mais importantes da indústria de fármacos, sendo utilizada no combate da amebíase, como expectorante e emética. O objetivo do trabalho foi regenerar plantas cultivadas *in vitro* a partir de hipocótilos e descrever a ontogênese de gemas adventícias de *P. ipecacuanha*. A regeneração de *P. ipecacuanha* por meio de hipocótilos não é muito empregada, devido à espécie possuir baixo índice de germinação. Utilizou-se diferentes concentrações de BAP no cultivo de hipocótilo com polaridade invertida e segmentos de hipocótilo. A produção de brotos adventícios foi mais eficaz, em segmentos de hipocótilo cultivados na concentração entre 1 e 1,5 mg L⁻¹ de BAP. Nos hipocótilos invertidos ocorreu a produção de brotos mais vigorosos na região sub-epidérmica que não estava em contato com o meio de cultivo. A análise histológica confirmou a origem dos brotos adventícios por organogênese direta, a partir das camadas celulares superficiais do parênquima cortical do hipocótilo. A utilização de 1,5 mg L⁻¹ de AIB foi mais eficiente visando a rizogênese.

***In vitro* organogenesis from hypocotyl explants of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.)
Stokes – Rubiaceae**

ABSTRACT

Psychotria ipecacuanha is considered to be one of the most important medicinal species used by drug industry for healing amoebic, as well as expectorant and emetic properties. The objective of this work was to regenerate plants from *in vitro* grown hypocotyls and to describe the *P. ipecacuanha* adventitious bud ontogenesis. The organogenesis of *P. ipecacuanha* from hypocotyl explants is not frequent because of low germination index presented by the species. Different BAP concentrations were used for culturing inverted polarity hypocotyls and hypocotyl segments *in vitro*. The production of adventitious shoots was more efficient when hypocotyl segments were cultured in medium containing 1 to 1.5 mg L⁻¹ BAP. Vigorous shoots were observed on sub-epidermical regions of inverted polarity hypocotyls that were not in contact with the medium. Histological analysis corroborated to the observation of direct organogenesis origin of the adventitious shoot, which were produced from parenchyma superficial cell layers of the hypocotyls. Additionally, the use of different IBA concentrations was efficient for promoting rhizogenesis.

INTRODUÇÃO

Psychotria ipecacuanha é uma planta medicinal da família Rubiaceae, encontrada em subosques de florestas, com distribuição disjunta no Brasil, Colômbia e América Central (Assis & Giulietti, 1999). A planta é reconhecida mundialmente como uma das espécies medicinais mais importantes da indústria farmacêutica, por possuir em suas raízes alcalóides emetínicos, utilizados no combate da desenteria amebiana, como expectorante e emético (Pinto, 1976).

A propagação *in vitro* da espécie vem sendo bastante estudada (Ikeda *et al.*, 1988; Teshima *et al.*, 1988; Yoshimatsu & Shimomura, 1993; Veeresham *et al.* 1994; Lameira *et al.*, 1994; Cerdeira *et al.*, 1995; Costa, 1995), porém, ainda não foram estabelecidas as condições ideais, que garantam a viabilidade econômica desta técnica de cultivo. As plantas cultivadas *in vitro* produzem menor concentração dos alcalóides eméticos, e em proporções diferentes da planta em condições naturais (Jha *et al.*, 1991).

Diferentes tipos de explantes têm sido utilizados na cultura de tecidos de *P. ipecacuanha* como segmento nodal (Ikeda, 1988), segmento internodal (Yoshimatsu & Shimomura, 1993; Costa, 1995), segmento de raiz (Yoshimatsu & Shimomura, 1991) e cultura de calos a partir de hipocótilos (JHA *et al.*, 1988), visando a micropropagação em grande escala. Entretanto, não existe relato na literatura sobre a utilização de hipocótilos com polaridade invertida como fonte de explante, na indução de brotos adventícios.

O emprego de tecidos meristemáticos, de plântulas assépticas obtidas na cultura *in vitro*, na indução da organogênese tem sido relatado em diversas espécies vegetais como: *Capsicum annuum* L. (Valera-Montero & Ochoa-Alejo, 1992; Fontes, 1998); *Helianthus annuus* (Vesperinas, 1998); *Linum* (Gairi & Rashid, 2002); *Psidium guajava* (Singh *et al.*, 2002) e *Bixa orellana* L. cv. Bico de Pato (Paiva Neto, 2002). A organogênese é considerada um mecanismo capaz de reter a fidelidade clonal em várias espécies e possibilita maior produção de gemas adventícias.

O presente trabalho teve como objetivo regenerar plantas cultivadas *in vitro* a partir de hipocótilos e descrever a ontogênese de gemas adventícias de *P. ipecacuanha*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e estabelecimento de plântulas assépticas

Sementes de poaia (*Psychotria ipecacuanha*) foram coletadas de plantas adultas no campo, em fragmentos florestais no município de Barra do Bugres no Estado de Mato Grosso, localizada a 58° W a 57° 45' W e 14° 30' a 14° 45' S, nos meses de abril a junho de 2002.

As sementes foram desinfestadas por imersão em álcool etílico a 70° (v/v) por 1 minuto, em seguida imersas em água, deionizada e autoclavada, com 9 gotas de Tween 20, durante 15 minutos; logo após, foram colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%, por 30 minutos, e submetidas a 4 lavagens em água deionizada e autoclavada. Em capela de fluxo laminar, retirou-se mecanicamente o tegumento externo, com auxílio de um bisturi, sob lupa, para a quebra da dormência mecânica. Em seguida, procedeu-se nova desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,5 %, durante 15 minutos, seguido por 4 enxágües em água deionizada e autoclavada. O meio de cultura utilizado foi o contendo os sais básicos de MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido com metade da concentração (MS ½), acrescido de sacarose a 3,0 % (p/v), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, complexo vitamínico de White (10 mL L⁻¹) e 5 g L⁻¹ de ágar (Sigma Chemical Co., USA). O pH foi ajustado a 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. As sementes foram cultivadas em placas de Petri de poliestileno estéril (90 x 1,5 mm), vedadas com filme de PVC.

Hipocótilos com raízes e polaridade invertida (25-30 mm de comprimento) foram assepticamente removidos e inoculados verticalmente em frascos (250 mL), enquanto segmentos de hipocótilo (8-10 mm de comprimento) foram horizontalmente inoculados em placas de Petri descartáveis estéreis (90 x 15 mm). Nos dois tratamentos o meio para a indução de gemas adventícias consistiu dos sais básicos de MS (Murashige & Skoog, 1962), complexo vitamínico de White, sacarose a 3 % p/v, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0,1, ágar 6 g L⁻¹ (Sigma Chemical Co., USA) e suplementado com 0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹ de BAP (6 - benzilaminopurina). O meio foi vertido em frascos que foram vedados com filme plástico de PVC. As culturas foram mantidas sob irradiância de 24 μmol.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27 ± 2 ° C. A avaliação dos tratamentos ocorreu após 30 dias de cultivo.

Alongamento

Após a indução de brotos adventícios, hipocótilos com raízes e polaridade invertida (retornados a posição normal) e segmentos de hipocótilos foram inoculados em frascos (250 mL) contendo 30 mL de meio básico de MS, complexo vitamínico de White, sacarose a 3 % p/v, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0.1, ágar, 6 g L⁻¹ (Sigma Chemical Co., USA), e 3 mg L⁻¹ de GA₃. As culturas foram mantidas nas mesmas condições anteriormente descritas, com 20 dias de cultivo.

Rizogênese

Brotos adventícios (± 10 mm) originados dos explantes de hipocótilo, foram individualizados e inoculados em frascos (250 mL) contendo 30 mL de meio básico de MS, complexo vitamínico de White, sacarose a 3 % p/v, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, pH 5,7 ± 0.1, ágar, 6 g L⁻¹ (Sigma Chemical Co., USA), e suplementado com 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). As culturas foram mantidas no escuro com temperatura de 27 ± 2 °C. Foram inoculados 25 brotos adventícios com 5 repetições, estes foram avaliados após 30 dias de cultivo.

Análise histológica

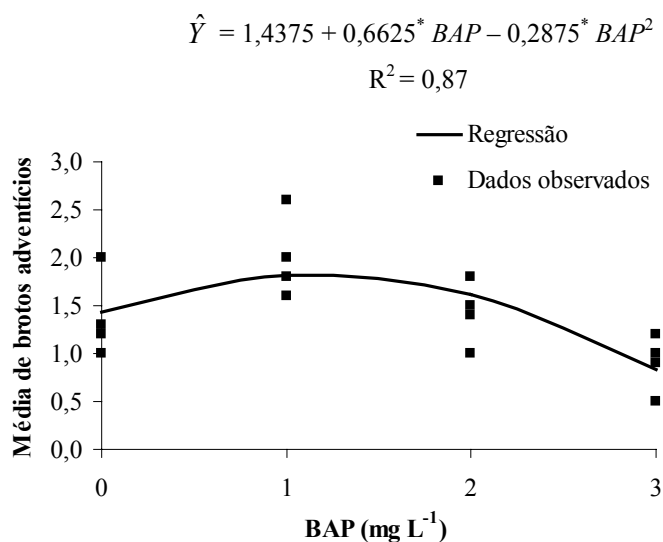
Os explantes de hipocótilos, após 30 dias de cultivo, foram fixados em solução de Craff (Berlyn & Miksche, 1976). Para melhor fixação, as amostras foram submetidas a vácuo para a retirada do ar contido nos espaços intercelulares. As amostras foram submetidas à desidratação em série etílica/butílica e incluídas em parafina (Johansen, 1940). Cortes seriados transversais e longitudinais, com 14 µm de espessura, obtidos utilizando-se micrótomo rotativo LEICA RM 2155, foram corados com safranina, em solução alcoólica 50%, durante 40 minutos, e azul de Astra, por 10 minutos, (Gerlach, 1969) e montados com bálsamo do Canadá. Foram realizados cortes a fresco com micrótomo de mesa (Ernst Leitz - Wetzlar) e montadas lâminas temporárias em glicerina após coloração dos cortes com safrablau.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 (quatro) repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão, em nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa SAEG.

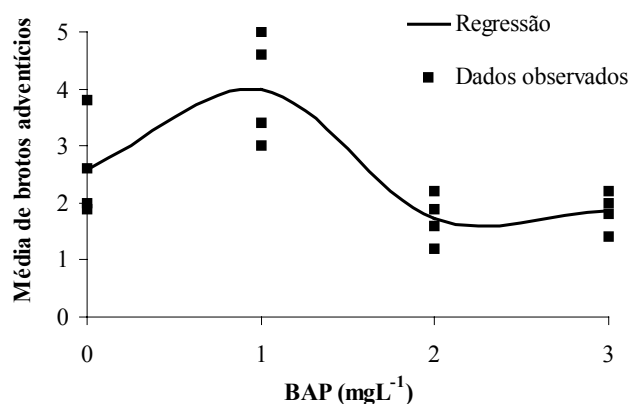
RESULTADOS

As concentrações de BAP influenciaram na produção de brotos adventícios em *P. ipecacuanha* (Figs 1 e 2).



(1)

$$\hat{Y} = 2,575 + 3,61389 * BAP - 2,20018 * BAP^2 + 0,01130 * BAP^3$$
$$R^2 = 0,61$$



(2)

Figuras 1 e 2: Representação gráfica da influência das concentrações de BAP na média de produção de brotos adventícios em hipocótilo de *P. ipecacuanha* após 30 dias de cultivo *in vitro*: **1** – Hipocótilos com polaridade invertida; **2** - Segmentos de hipocótilo.

Os segmentos de hipocótilo apresentaram máxima produção de brotos adventícios na concentração de 1 mg L⁻¹ BAP. Nas concentrações de 2 e 3 mg L⁻¹ BAP, observou-se um decréscimo acentuado, resultando em menor produção de brotos adventícios (Fig. 2).

O processo de organogênese, nos hipocótilos de *P. ipecacuanha*, iniciou-se após o 20º dia de cultivo, sem passar pela fase intermediária de calo (Fig. 3). Nos hipocótilos com a polaridade invertida formaram-se brotos adventícios a partir do tecido do explante, na região de contato com o meio de cultura (Fig. 5) em vários estádios de desenvolvimento. Ocorreu a organogênese na porção do hipocótilo fora de contato com o meio (Fig. 4) com a formação de brotos mais alongados.

A análise anatômica dos brotos adventícios, originados a partir de segmentos dos hipocótilos, com polaridade invertida, revela que ocorreu diferenciação por via direta. As gemas adventícias foram formadas na região do parênquima cortical após visível proliferação celular (Fig. 6). Nesta região, ocorrem tanto divisões anticlinais quanto periclinais, sendo estas predominantes no processo de formação de uma massa de células homogêneas, os meristemóides (Fig. 7), caracterizando o desenvolvimento do primórdio dos brotos adventícios. Com o desenvolvimento dos brotos adventícios observa-se a diferenciação da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio (Fig. 8). A partir desse último, elementos vasculares diferenciam-se rapidamente e a conexão vascular com o explante de origem se estabelece (Fig. 9) e são formados os primórdios foliares.

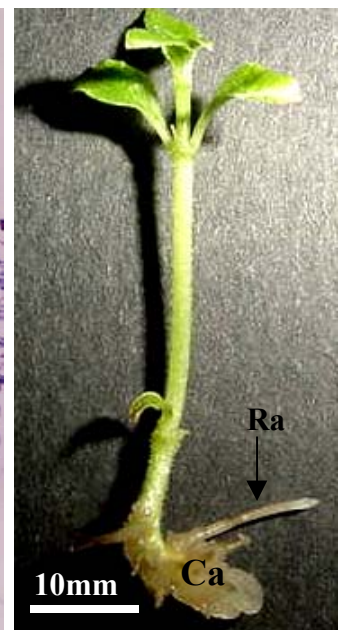
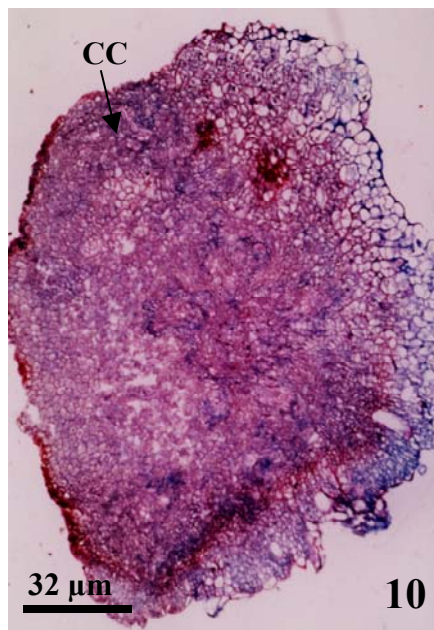
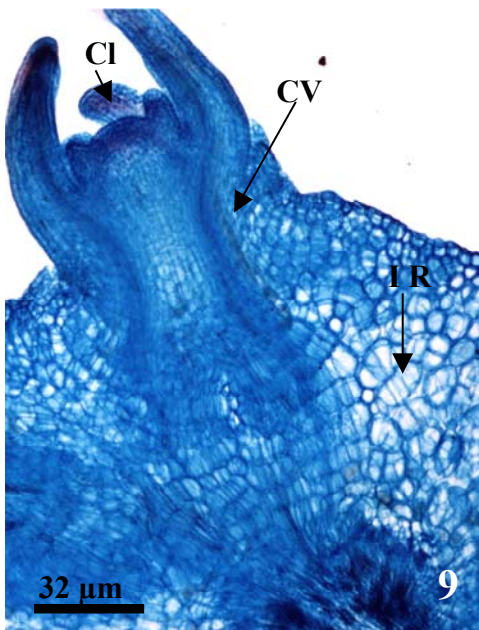
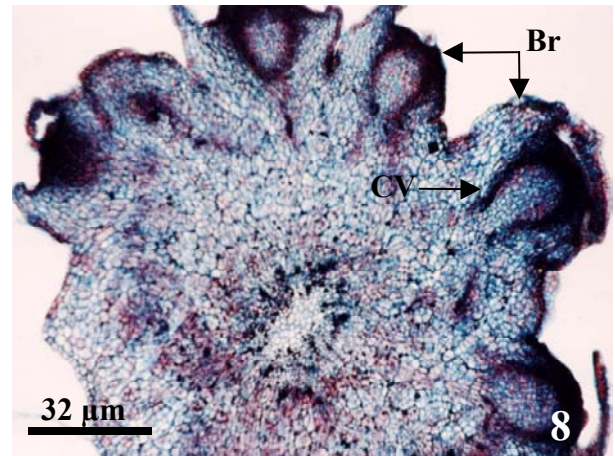
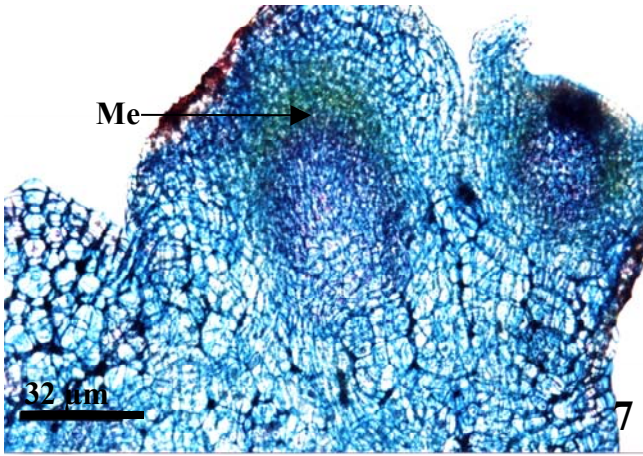
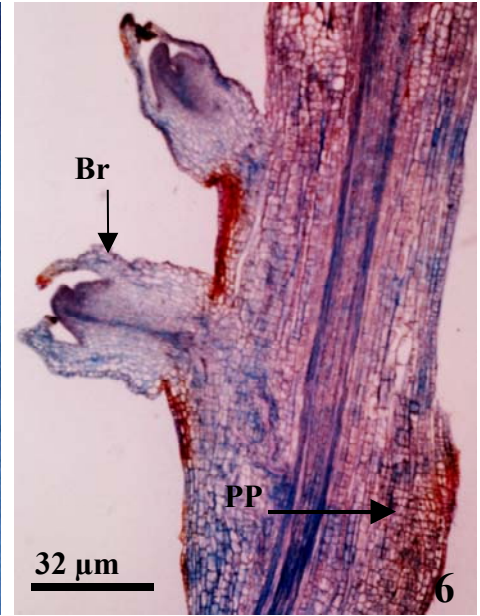
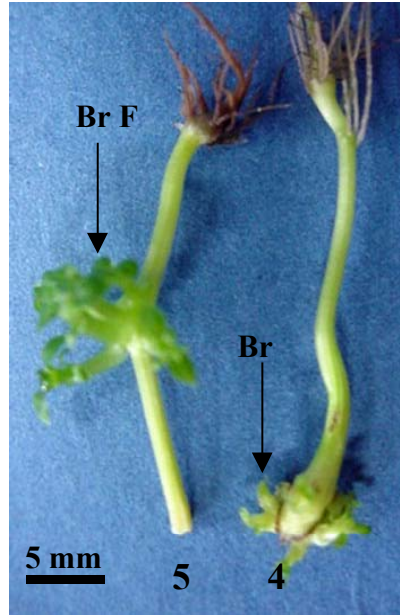
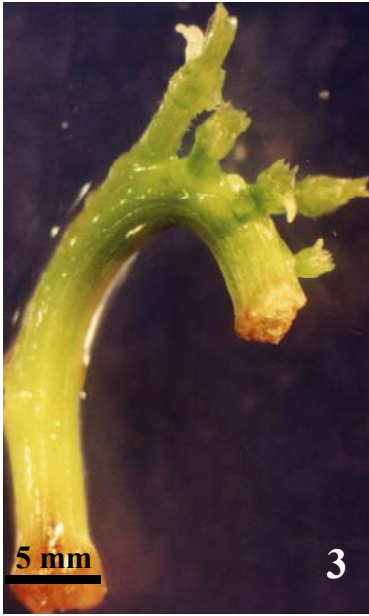
Desde os estádios iniciais do desenvolvimento das gemas, há a presença de idioblastos com ráfides por toda a brotação e amido disperso nas células do parênquima cortical. Próximos a região do domo apical dos brotos adventícios ocorre a presença de coléteres (Fig. 9), e na epiderme ocorre a presença de tricomas tectores unisseriados (não documentados).

As células do domo apical são isodiamétricas, envoltas por uma camada de células - a túnica, que apresenta padrão de divisão predominantemente anticlinal. No desenvolvimento mais tardio dos brotos adventícios há a formação dos primórdios foliares (Figs. 6 e 9) com estômatos do tipo paracítico.

Na extremidade distal dos segmentos de hipocótilo formou-se um calo cicatricial. Nessa região houve intensa proliferação de um parênquima, não regenerativo, constituído por células volumosas e vacuolizadas frouxamente organizadas, com citoplasma e núcleo pouco densos (Fig. 10).

As concentrações do regulador de crescimento testadas, mostraram-se eficientes na indução de rizogênese nos brotos adventícios, originados a partir de hipocótilo; entretanto, a utilização de 1,5 mg L⁻¹ de BAP promoveu maior percentual de rizogênese. Na porção basal do explante formou-se calejamento (Fig. 11). Observou-se a protusão das raízes após o 15º dia de cultivo.

Figuras 3 a 11: Análise histológica da organogênese *in vitro*, com a formação de brotos adventícios, em hipocótilo com polaridade invertida e segmentos de hipocótilo de *Psychotria ipecacuanha*. Cortes transversais. **3** - Formação de brotos adventícios em hipocótilo com a polaridade invertida na região fora de contato com o meio de cultura. **4** - Organogênese em hipocótilo com a polaridade invertida na região de contato direto com o meio de cultura; **5** - Organogênese direta em explante de hipocótilo. Barras = 5 mm. **6** - Brotos adventícios no segmento de hipocótilo e o início da formação de gema adventícia com a proliferação e expansão do parênquima cortical (PP); **7** - Formação dos meristemóides; **8** - Diferenciação das gemas adventícias em hipocótilo com polaridade invertida na extremidade em contato com o meio de cultura; **9** - Brotos com gema apical evidenciando coléter, formação dos primórdios foliares e diferenciação do sistema vascular de conexão com o órgão de origem, observar a presença de idioblastos com ráfides. **10** - Calo cicatricial, formado no local de secção do explante, com células não regenerativas. Barras = 32 µm. **11** - Broto adventício enraizado e base com calejamento. Barra = 10 mm. Br - broto adventício; Br F - brotação formada fora do meio de cultivo; Ca - calejamento; CC - calo cicatricial; Cl - coléter; CV - conexão vascular; I R - idioblasto com ráfides; Me - meristemóide; PF - primórdio foliar; PP - proliferação parenquimática; Ra - raiz adventícia; SV - Sistema vascular.



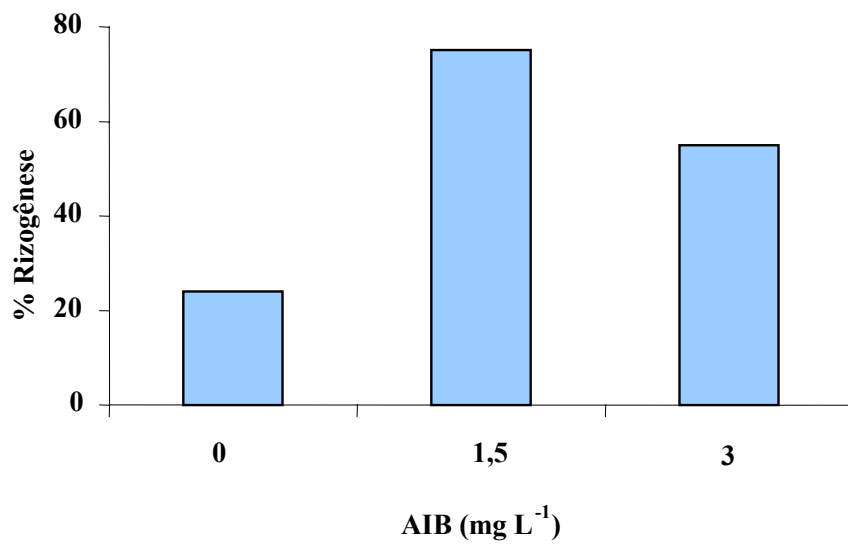


Figura 12: Representação gráfica da influência das concentrações de AIB no percentual de rizogênese em brotações adventícias de hipocótilos de *Psychotria ipecacuanha*, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

DISCUSSÃO

A utilização de explantes de hipocótilo com polaridade invertida, visando a regeneração *in vitro*, em *Psychotria ipecacuanha* está sendo relatada pela primeira. A organogênese nos explantes ocorreu por via direta, sem passar pela fase intermediária de calo. A análise anatômica confirma o tipo de organogênese, com gemas adventícias originadas das camadas periféricas do parênquima cortical.

A organogênese direta ocorre em tecidos que apresentam potencial morfogênico, mas que não se expressa na planta *in vivo* (Grattapaglia & Machado, 1998). Em *P. ipecacuanha*, a expressão morfogênica pode ser induzida em qualquer órgão vegetativo, via organogênese direta *in vivo* (dados não publicados), pois a espécie possui grande potencial de regeneração.

Yoshimatsu & Shimomura (1993), cultivando explantes de segmento internodal de *P. ipecacuanha*, indicam a importância da utilização de explantes oriundos de plântulas, principalmente, no estabelecimento da cultura *in vitro*, por ser material ideal para a micropropagação e manipulação genética (Singh *et al.*, 2002). A regeneração de plântulas *in vitro*, através da cultura de brotos adventícios, constitui-se em técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (França, 2001) e vem sendo frequentemente utilizada para a obtenção de clones que mantêm todas as características da planta mãe.

Em relação à fonte de explante, os hipocótilos com polaridade invertida resultaram em menor índice de produção de brotos adventícios, comparado com os obtidos nos segmentos de hipocótilo. A maior produção de brotos adventícios está relacionada a concentrações mais baixas de BAP, tendo em vista que nos dois tipos de explantes a maior concentração de BAP inibiu o desenvolvimento de brotos adventícios. A concentração de BAP mais baixa é vantajosa para o cultivo da espécie, por ser mais econômica e implicar em menor risco de variação somaclonal, que pode ser induzida pela alta concentração de regulador de crescimento no meio de cultivo.

Outro aspecto interessante, no tratamento com hipocótilo invertido, foi a produção de brotos adventícios produzidos fora do meio de cultura, mais alongados e vigorosos, do que os desenvolvidos em contato direto com o meio de cultura.

Comparativamente ao método de regeneração com hipocótilo invertido, o experimento com segmento de hipocótilo mostrou-se mais favorável, em função da maior produção de brotos

adventícios. Cabe salientar que os brotos produzidos, fora da região de contato com o meio de cultura, a partir de hipocótilo invertido desenvolveram-se mais vigorosos e sua disposição favorece a individualização. Sugere-se a utilização de segmento de hipocótilo como fonte de explantes, para a obtenção de brotos adventícios de *P. ipecacuanha*.

A menor frequência de organogênese em hipocótilo invertido pode ser atribuída, particularmente, à inversão de polaridade dos explantes, como visto em *Psidium guajava* (Singh, 2002). Entretanto, para *Capsium annuum* (Ochoa-Alejo, 1990; Fontes, 1998) e *Bixa orellana* (Paiva Neto, 2002) a utilização desse tipo de explante apresenta melhor produtividade de brotos adventícios.

De acordo com Sanago *et al.* (1995), a morfogênese *in vitro* é afetada pela seleção apropriada dos explantes e a determinação ideal dos reguladores de crescimento, principalmente as citocininas e auxinas; a interação desses dois fatores é determinante na obtenção de respostas satisfatórias.

A rizogênese nos brotos adventícios originados de hipocótilo nas concentrações utilizadas de AIB mostrou-se eficiente. Costa (1995) utilizando o mesmo regulador de crescimento para indução de rizogênese, em brotos adventícios provenientes da cultura *in vitro* de segmento internodal em *P. ipecacuanha*, obteve resultado similar para a rizogênese. De acordo com Assis & Teixeira (1998), o controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por substâncias reguladoras de crescimento, que podem promover ou inibir a rizogênese.

CONCLUSÕES

A organogênese na formação de brotos adventícios ocorreu de forma direta.

As gemas adventícias produzidas em hipocótilos com polaridade invertida fora do meio de cultivo apresentaram-se mais vigorosas.

Nos segmentos de hipocótilo obteve maior produção de brotos adventícios que nos hipocótilos invertidos.

A melhor concentração de BAP utilizada para a produção de brotos adventícios foi a de 1 mg L^{-1} .

A análise histológica confirmou a origem dos brotos adventícios por organogênese direta, a partir das camadas celulares superficiais do parênquima cortical do hipocótilo.

As concentrações de $1,5$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB foram consideradas eficazes, para a rizogênese, nos brotos adventícios produzidos dos explantes de hipocótilo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSIS, T.F & TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1, Brasília : EMBRAPA, 1998, p. 261-296.

BERLYN, G. P. & MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames, The Iowa States Press, 326 p., 1976.

BOND, J.E & ROOSE, M.L. Agrobacterium mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 229-234, 1998.

CERDEIRA, R. M. M. KRANS. J. V., FRANÇA, S. C. PEREIRA, A. M. S. Evaluation of emetine production in ipeca callus. **Ciência e Cultura**, v. 47, p. 76-78, 1995.

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

FONTES, M. A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplasto e transformação genética de pimentão (*Capsium sp.*)**. Viçosa: UFV, 167 p. 1998 Dissertação (Mestrado em Botânica) Universidade Federal de Viçosa, 1998.

FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. (Revisada) Porto Alegre: UFRS, 2001, p. 105-124.

GAIRI, APARNA & RASHID, A. In vitro stimulation of shoot-buds on hypocotyls of *Linum* seedlings, by flooding and etherel treatment of cultures. **Plant Science**, v. **163**, p. 691-694, 2002.

GRATTAPAGLIA, D. & ,ACHADO, M.A. Micropropagação. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v. 1, Brasília : EMBRAPA, 1998, p. 261-296.

GERLACH, G. **Botanische microtechnik eine einfuhrung**. Stuttgart: George Thieme Verlag, 311 p. 1984.

IKEDA, K. TESHIMA D. AOYAMA T, SATAKE M. SIMOMURA K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. **Plant Cell Reports**, v. **7**, p. 288-291, 1988.

JHA, S. *et al.* Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Planta Médica**, v. **54**, p. 505-506, 1988.

JHA, S. *et al.* Production of emetine and cephaeline from cell suspension and excised root cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Phytochemistry**, v. **30**, p. 3999-4003, 1991.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc. Graw Hill Book, 1940, 523 p.

LAMEIRA, O. A. COSTA, M. PINTO, J.E.P. The efficiency of shoot and plantled formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural** v. **24**, p.523-526, 1994.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. **15**, p. 473-497, 1962.

PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa: UFV, 105 p., 2002, Dissertação (Doutorado em Fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SANAGO, M.H.M.; MURCH, S.J; SLIMMON, T.Y. *et al.* Morphoregulatory role of thidiazuron: morphogenesis of root outgrowths in thidiazuron-treated (*Pelargonium x hortorum* Bailey). **Plant Cell Reports**, v. **15**, p. 205-211, 1995

SINGH, S.K.; MEGHWAL, P.R. *et al.* Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from in vitro germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. **Scientia Horticulturae**, v. **20**, p. 213-221, 2002.

TESHIMA, D. IKEDA; K. STAKE, M. AOYAMA; T. SHIMOMURA, K. Production of emetic alkaloid by in vitro culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. **Plant Cell Reports**, v. **7**, p. 278-280, 1988.

VALERA-MONTERO, L.L & OCHOA-ALEJO, N. A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. **Plant Science**, v. **84**, p. 215-219, 1992.

VEERESHAM, C. KOKATE, C. VENKATESHWARLU, V. Influence of precursors on production of isoquinoline alkaloids in tissue cultures of *Cephaelis ipecacuanha*. **Photochemistry**, v. **35**, p. 947-949, 1994.

VESPERINAS, E.S. In vitro root induction in hypocotyls and plumule explants of *Helianthus annuus*. **Environmental and Experimental Botany**, v. **39**, p. 271-277, 1998.

YOSHIMATSU, K., SHIMOMURA, K. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) Micropropagation and the production of emetine and cephaeline. In: Bajaj Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture Forestry – Medicinal and Aromatic Plants**, v. **21**, IV Berlin: Springer Verlag, p. 87-103, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS

A remoção do tegumento das sementes favoreceu a germinação com menor período de tempo, resultando em 84,17% de sementes germinadas, após o qual foi observado o desenvolvimento normal das plântulas.

A adição de ácido giberélico 3 mg L^{-1} de GA_3 , ao meio de cultura, aumentou o tempo necessário para germinação e mostrou-se eficiente apenas no alongamento do estágio I de desenvolvimento das plântulas.

A reprodução vegetativa em *Psychotria ipecacuanha* ocorre a partir do sistema subterrâneo radicular e caulinar. A propagação via estacas radiculares em cultivo hidropônico, principalmente em solução de Hoagland (12,5 brotos por segmento), foi considerada a mais recomendada.

Na análise anatômica do caule de *Psychotria ipecacuanha* destaca-se a presença de sucessivos felogênios, originados a partir de células epidérmicas e, ou, subepidérmicas. As raízes adventícias não apresentam medula e estão localizadas na porção dos entre-nós caulinares, prostrados ao solo.

O felogênio é o local de formação das gemas adventícias radiculares. Os eventos morfogenéticos envolvidos nesta formação, iniciam-se com a divisão em vários planos das células do felogênio, e sua organização em meristemóides. As gemas radiculares em *Psychotria ipecacuanha* são do tipo reparativas e desenvolvem-se assincronicamente. O composto de reserva predominante nas raízes gemíferas é o amido.

A organogênese nos segmentos de hipocótilos ocorreu de forma direta. As gemas adventícias produzidas em hipocótilos com polaridade invertida fora do meio de cultivo apresentaram-se mais vigorosas.

Nos segmentos de hipocótilo obteve maior produção de brotos adventícios que nos hipocótilos invertidos; a concentração de 1 mg L^{-1} de BAP foi a mais eficaz na indução de brotos adventícios

As concentrações de $1,5$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB induziram a rizogênese nas brotações provindas de explantes de hipocótilo, sendo a de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ mais eficiente.