



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**LYANNA HELLEN SÁENZ RAMÍREZ**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, VIABILIDADE DAS SEMENTES E ANÁLISE  
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CALOS DE *Himatanthus sucuuba* Wood.**

**MANAUS**  
**2019**

**LYANNA HELLEN SÁENZ RAMÍREZ**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, VIABILIDADE DAS SEMENTES E ANÁLISE  
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CALOS DE *Himatanthus sucuuba* Wood.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio**

**Co-Orientadora: Dra. Maria da Glória Gonçalves de Melo**

**MANAUS  
2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S127p Sáenz-Ramírez, Lyanna Hellen  
Propagação in vitro, viabilidade das sementes e análise fitoquímica dos extratos de calos de Himatanthus sucuuba Wood. / Lyanna Hellen Sáenz-Ramírez. Manaus : [s.n], 2019.  
88 f.: color.; 21 cm.

Dissertação - PGSS - Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Paulo de Tarso Barbosa Sampaio  
Coorientador: Maria da Glória Gonçalves de Melo

1. Espécie medicinal. 2. tetrazólio. 3. fitorreguladores. 4. metabólitos secundários. 5. Amazônia. I. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio (Orient.). II. Maria da Glória Gonçalves de Melo (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título.

CRB-11/463

**LYANNA HELLEN SÁENZ RAMÍREZ**

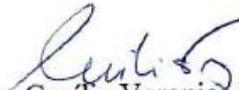
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO*, VIABILIDADE DAS SEMENTES E ANÁLISE  
FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS DE CALOS DE *Himatanthus sucuuba* Wood.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação: 18/02/2019

Banca examinadora:

  
Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio  
CPF: 075964132-34

  
Dra. Cecília Verônica Nunez  
CPF: 219674728-50

  
Dra. Maria Astrid Rocha Liberato  
CPF: 279.680.112-72

**MANAUS**

**2019**

### **Dedico**

De maneira especial a minha mãe Angélica, porque ela foi a base principal para a construção da minha vida profissional, sua força de vontade e dedicação para fazer as coisas me transmitiram desejos de superação.

Sua ajuda tem sido fundamental, você esteve comigo mesmo nos momentos mais difíceis, me motivando e me ajudando ao máximo que podia. Muito obrigada meu amor Reynaldo.

A meu pai e todos os meus irmãos por ser o apoio moral.

*Seja você a mudança que você quer ver no mundo.*

Mahatma Gandhi

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir-me alcançar esta etapa importante na minha vida. Agradeço por guiar meu caminho e confortar meu coração.

A Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) por brindar-me a oportunidade de continuar estudando e realizar meus sonhos de ser pesquisadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela oportunidade do desenvolvimento profissional no Ensino Superior.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Ao Dr. Paulo de Tarso, pela orientação, compreensão e apoio durante o período do mestrado.

À Dra. Angela Maria Imakawa, pela sua amizade e apoio em tudo momento, pela constante companhia nas atividades de laboratório e seus conselhos para continuar no caminho certo.

À Dra. Maria da Glória Gonçalves de Melo pela ajuda e orientação, e disponibilidade dos materiais para análises da viabilidade das sementes.

À Dra. Angela Maria da Silva Mendes pelo assessoramento durante a realização dos testes de viabilidade das sementes.

À Dra. Suely Costa pela ajuda e apoio durante as análises estatísticas.

À Dra. Cecilia Veronica Nunez, por brindar-me a oportunidade de trabalhar no laboratório de bioprospecção, e compartilhar o seu conhecimento.

À Katiane Pereira de Souza pela coleta das sementes.

Um agradecimento especial a minha mãe, pela base moral e amor que direciona o meu caminhar pois suas infinitas virtudes e seu grande coração me fazem admirá-la cada dia mais. A meu pai que graças a ele foi possível descobrir minha paixão pela natureza.

Ao meu noivo Reynaldo, pela compreensão e apoio neste caminhar.

A minha amiga Ana Luisa, e em especial a David pela ajuda brindada no Laboratório de Bioprospecção. A todos os amigos e familiares que direta e indiretamente apoiaram e cooperaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

Estudos da viabilidade e vigor de sementes armazenadas, propagação *in vitro* e indução de calos friáveis de explantes foliares e caulinares de *H. sucuuba* foram os objetivos deste trabalho. Para a avaliação das sementes foi realizado o pré-condicionamento retirando o tegumento e endosperma de 50 sementes. O tetrazólio na concentração a 0,075% permitiu avaliar 70% de viabilidade em sementes armazenadas e a germinação resultou em 78% das quais 47% desenvolveram plântulas normais e 31% plântulas anormais. Ambos testes mostraram a viabilidade das sementes após 14 meses de armazenamento. O meio de cultura mais eficiente para o crescimento de sementes foi o MS suplementado com AIA (5,0 mg.L<sup>-1</sup>) resultando em 80% de germinação e plântulas com 5,97 cm de altura e 4,2 segmentos nodais. A combinação BAP+AIA (0,1+8,0 mg.L<sup>-1</sup>) estimulou 100% de brotações e 30% de enraizamento dos segmentos nodais e diferenciou-se dos demais tratamentos. As plântulas micropropagadas e aclimatadas *ex vitro* no substrato terra vegetal apresentaram crescimento em altura (8,41cm) e diâmetro do caule (2,2mm) após 90 dias no viveiro. A partir de explantes foliares e caulinares foram obtidos calos friáveis formados durante o cultivo em meio MS com adição de 2,4-D + TDZ (1,0+1,5 mg.L<sup>-1</sup>), sendo que explantes foliares induziram 73,33% de calos friáveis no escuro, enquanto explantes caulinares com 2,4-D + TDZ (4,0+2,0 mg.L<sup>-1</sup>) induziram 76,67% de calos friáveis na presença de luz. Os extratos metanólicos obtidos de calos friáveis foram analisados em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H). A análise permitiu observar a presença de substâncias fenólicas (por meio da intensificação das manchas quando a placa foi revelada com NP-PEG e a presença de sinais entre 6 e 8 ppm no espectro de RMN de <sup>1</sup>H), açúcares (pela presença de sinais entre 3 e 4 ppm no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e os sinais anoméricos em 4,09 ppm (*d*, *J* = 8 Hz, açúcar com configuração beta) e 5,16 ppm (*d*, *J* = 3,5 Hz, açúcar com configuração alfa). Também há indícios de terpenoides (manchas arroxeadas quando a placa foi revelada com anisaldeído e sinais em 5,3 ppm e singletos entre 0,6 e 1 ppm presentes no espectro de RMN de <sup>1</sup>H). Sementes de *H. sucuuba* podem ser armazenadas e mantem a viabilidade. Quanto a micropropagação ainda são necessários estudos com reguladores de crescimento que otimizem o enraizamento *in vitro*. Foi comprovado que calos friáveis podem ser produzidos tanto por explantes foliares quanto caulinares e ambos apresentam produção de metabólitos secundários, embora seja maior em maior quantidade nos calos friáveis de explantes foliares.

**Palavras Chave:** Espécie medicinal, tetrazólio, fitoreguladores, metabólitos secundários, Amazônia.

## ABSTRACT

Studies of the viability and vigor of stored seed, *in vitro* propagation and induction of friable calli from *H. sucuuba* foliar and stem explants were the objectives of this work. For the seed evaluation was carried out the preconditioning removing the tegument and endosperm of 50 seeds. The tetrazolium at 0.075% concentration allowed to evaluate 70% of viability in stored seeds and germination resulted in 78% being 47% developed normal seedlings and 31% abnormal seedlings. Both tests showed seed viability after 14 months of storage. The most efficient culture medium for seed growth was MS supplemented with AIA ( $5.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) resulting in 80% germination and seedlings with 5.97 cm in height and 4.2 nodal segments. The combination of BAP + AIA ( $0.1 + 8.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) stimulated 100% sprouting and 30% rooting of the nodal segments and differed from the other treatments. The micropropagated and acclimated seedlings *ex vitro* in the substrate plant soil showed growth in height (8.41 cm) and stem diameter (2.2 mm) after 90 days in the nursery. Friable calli from foliar and stem explants those were formed during cultivation in MS medium with 2,4-D + TDZ addition ( $1.0 + 1.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) induced 73.33% of friable calli from foliar explants in the dark, while 2,4-D + TDZ ( $4.0 + 2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) induced 76.67% of friable calli from stem explants in the presence of light. Methanolic extracts obtained from friable calli were analyzed by comparative thin layer chromatography (CCDC) and by nuclear magnetic resonance of hydrogen ( $^1\text{H NMR}$ ). The analysis allowed to observe the presence of phenolic substances (by intensifying the spots when the plate was revealed with NP-PEG and the presence of signals between 6 and 8 ppm in the  $^1\text{H NMR}$  spectrum), sugars (by the presence of signals between 3 and 4 ppm in the  $^1\text{H NMR}$  spectrum and the anomeric signals in 4.09 ppm ( $d, J = 8 \text{ Hz}$ , sugar with beta configuration) and 5.16 ppm ( $d, J = 3.5 \text{ Hz}$ , sugar with alpha configuration). There are also evidence of terpenoids (purple spots when plaque was developed with anisaldehyde and signals at 5.3 ppm and singlets between 0.6 and 1 ppm present in the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum). Seeds of *H. sucuuba* can be stored and maintain viability. Regarding micropropagation, studies with growth regulators that optimize *in vitro* rooting are still necessary. It has been proven that friable calli can be produced by foliar and stem explants and both present secondary metabolite production, although there is larger quantities from friable calli of foliar explants.

**Keywords:** Medicinal species, tetrazolium, phyto regulators, secondary metabolites, Amazon.

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEORICO

Tabela 1. Classificação taxonômica da planta *Himatanthus sucuuba* Wood. ....19

### CAPITULO I

Tabela 1. Pré-condicionamento em sementes de *H. sucuuba* submetidas a diferentes períodos de imersão em água destilada para a remoção do tegumento e endosperma. ....40

Tabela 2. Viabilidade e vigor (%) das sementes de *H. sucuuba* Wood., avaliadas pelo teste de tetrazólio a 0,075% e teste de germinação. ....44

### CAPITULO II

Tabela 1. Interação de BAP com as auxinas AIA, 2,4-D e ANA em meio MS para a indução de enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *H. sucuuba* Wood. ....53

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de AIA, ANA e AIB na germinação média de sementes por tratamento aos 60 dias de inoculação em meio MS, e crescimento *in vitro* das plântulas avaliado aos 5 meses: altura, número de segmentos nodais e número de brotos de *H. sucuuba*. ....55

Tabela 3. *H. sucuuba* após 60 dias de inoculação em meio MS suplementado com BAP em interação com AIA, 2,4-D e ANA. B- brotações, C- calos, E- enraizamento .....57

### CAPITULO III

Tabela 1. Tratamentos para indução de calos em explantes foliares de *H. sucuuba* .....72

Tabela 2. Efeito da interação de 2,4-D com BAP e TDZ na sobrevivência (S), presença de calo (C), textura (T) e cor, avaliado após 30 dias do cultivo *in vitro* para indução de calos de explantes foliares de *H. sucuuba*. ....75

Tabela 3. Efeito dos reguladores de crescimento na sobrevivência, calo e textura de diferentes explantes de *H. sucuuba* cultivados na luz e escuro, após 30 dias. ....77

Tabela 4. Massa dos calos e rendimento dos extratos metanólicos obtidos de explantes foliares e caulinares no cultivo *in vitro* de *H. sucuuba*. ....79

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEORICO

Figura 1. Detalhes da espécie em estudo <i>H. sucuuba</i> Wood. A - árvore com 15 m de altura; B - disposição das folhas e posição da inflorescência; C - detalhe da flor; D - fruto folículo maduro e sementes aladas.....	20
Figura 2. Estruturas químicas dos iridóides: (A) plumericina e (B) isoplumericina isolados de <i>H. sucuuba</i> Wood. ....	22
Figura 3. Estruturas químicas dos triterpenos: (A) cinamato de lupeol; (B) cinamato de $\alpha$ -amirina e (C) acetato de lupeol isolados de <i>H. sucuuba</i> .....	22
Figura 4. Procedimentos realizados para a obtenção de plantas a partir da técnica da micropropagação. ....	24

### CAPITULO I

Figura 1. Aspectos morfológicos da semente de <i>Himatanthus sucuuba</i> Wood. A - aspecto geral, B - aspectos do tegumento, endosperma e embrião, C - detalhe do embrião. al - ala, co - cotilédone, ehr - eixo hipocótilo-radícula, em - embrião, en - endosperma, hi - hilo, ra - rafe, te - tegumento. ....	39
Figura 2. Embriões de <i>H. sucuuba</i> , após 90 minutos de imersão em diferentes concentrações de soluções de tetrazólio. A - concentração de 0,025%, B - concentração de 0,075%, C - concentração de 0,100%. ....	41
Figura 3. Padronização das classes de viabilidade das sementes de <i>H. sucuuba</i> , submetido ao teste de tetrazólio, na concentração de 0,075%, em temperatura de 40 °C por 90 minutos. A - Classe 1: sementes viáveis e vigorosas. B - Classe 2: sementes viáveis e vigorosas. C - Classe 3: sementes viáveis e não vigorosas. D - Classe 4: sementes inviáveis. E - Classe 5: sementes inviáveis. F - Classe 6: sementes inviáveis.....	42
Figura 4. Viabilidade das sementes de <i>H. sucuuba</i> , submetido ao teste de tetrazólio, na concentração de 0,075%, em temperatura de 40 °C por 90 minutos.....	43
Figura 5. Aspectos morfológicos das plântulas de <i>H. sucuuba</i> , após 25 dias da sementeira. A - plântula normal, B - plântulas anormais. eo - eófilo, hp - hipocótilo, pc - paracotilédone, rp - raiz primária, rs - raiz secundária.....	45

## CAPITULO II

- Figura 1. Cultivo *in vitro* de *H. sucuuba*. A-Sementes germinadas após 20 dias de cultivo; B-Plântulas desenvolvidas após 90 dias da germinação; C-Plântulas não desenvolvidas após 90 dias da germinação. ....56
- Figura 2. Brotações de *H. sucuuba* a partir de segmentos nodais, inoculados em meio MS, com BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup> suplementado com diferentes concentrações de AIA, 2,4-D e ANA após 45 dias de cultivo. A-T1, sem brotações; B-brotações nas interações BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+AIA; C- calos formados na interação BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+2,4-D; D- calos e rizogênese formados na interação BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+ANA. ....58
- Figura 3. Enraizamento de segmentos nodais de *H. sucuuba* cultivados em meio MS, aos 5 meses de cultivo. A-Segmento nodal com brotação e sem raiz (controle), B-Segmento nodal com raízes e brotações. ....59
- Figura 4. Plântulas de *H. sucuuba* enraizadas *in vitro* e preparadas para o transplante nos substratos e aclimatação em viveiro. ....61
- Figura 5. Sobrevivência de plântulas de *H. sucuuba* em dois tipos de substratos (terra vegetal e vermiculita), após 30, 60 e 90 dias de aclimatação em viveiro.....61
- Figura 6. Crescimento em altura e diâmetro das plantas de *H. sucuuba* avaliados aos 30, 60 e 90 dias de idade, durante as etapas de aclimatação em viveiro em função dos tratamentos terra vegetal e vermiculita. ....63
- Figura 7. Comparação de crescimento das plantas propagadas *in vitro* de *H.sucuuba* aos 60 e 90 dias do período de aclimatação em viveiro. A-terra vegetal; B-vermiculita.....63

## CAPITULO III

- Figura 1. Procedimento para preparação de explantes foliares de *H. sucuuba*. A-Retirada de folhas de plântula cultivada *in vitro*; B-Corte dos explantes foliares; C-Inoculação dos explantes em frascos com meio de cultura MS. ....72
- Figura 2. Fluxograma geral da preparação do extrato .....73
- Figura 3. Aspecto visual dos calos induzidos a partir de explantes foliares de *H. sucuuba* após 30 dias nos diferentes balanços hormonais (mg.L<sup>-1</sup>). A- Controle; B- T2: 2,4-D + BAP (2,0+2,0); C- T3: 2,4-D + BAP (2,0+4,0); D- T4: 2,4-D + BAP (4,0+2,0); E- T5: 2,4-D + BAP (4,0+4,0); F- T6: 2,4-D + TDZ (2,0+2,0); G- T7: 2,4-D + TDZ (2,0+4,0); H-T8: 2,4-D + TDZ (4,0+2,0); I- T9: 2,4-D + TDZ (4,0+4,0). A barra representa 1 cm. ....76
- Figura 4. Aspecto de calos desenvolvidos a partir de explantes foliares e caulinares de *H. sucuuba* cultivados em meio MS após 30 dias de cultivo, sob luz e escuro. A- Calo do

explante foliar, B- Calo do explante caulinar, C- Calo do explante foliar, D- Calo do explante caulinar.....	78
Figura 5. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis cultivados <i>in vitro</i> de explantes caulinar (T1) e foliar (T3) de <i>H. succuba</i> .....	80
Figura 6. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados <i>in vitro</i> de <i>H. succuba</i> com revelador de iodo e NP-PEG.....	81
Figura 7. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados <i>in vitro</i> de <i>H. succuba</i> com revelador de FeCl <sub>3</sub> .....	81
Figura 8. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados <i>in vitro</i> de <i>H. succuba</i> . .....	82
Figura 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato metanólico (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da cultura de calos friáveis de explantes foliares de <i>H. succuba</i> .....	83
Figura 10. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato metanólico (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) da cultura de calos friáveis de explantes foliares de <i>H. succuba</i> .....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
AIA	Ácido 3-indol-acético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
EST	Escola Superior de Tecnologia
IBA	Ácido 3-indol-butírico
LCTV	Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais
MS	Murashige&Skoog (1962)
NaOCl	Hipoclorito de sódio
TCT	Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio
TDZ	Tidiazuron
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LABB	Laboratorio de Bioprospecção e Biotecnologia
MeOH	Metanol
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1. Família Apocynaceae .....	18
2.1.1 Gênero <i>Himatanthus</i> .....	18
2.1.2. <i>Himatanthus sucuuba</i> .....	18
2.2. Descrição botânica.....	19
2.3. Distribuição .....	20
2.4. Fenologia .....	21
2.5. Usos e importância .....	21
2.6. Teste de Tetrazólio .....	23
2.7. Propagação <i>in vitro</i> .....	23
2.7.1. Generalidades .....	23
2.7.2.Meios de cultura .....	25
2.7.3.Reguladores de crescimento vegetal.....	25
2.8. Cultura de calos .....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>32</b>
<b>AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES ARMAZENADAS DE</b> <i>Himatanthus sucuuba</i> Wood .....	<b>32</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>33</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>34</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
2.1. Local do experimento .....	36
2.2. Coleta de sementes .....	36
2.3. Aspecto morfológico das sementes .....	36
2.4. Teste de tetrazólio.....	37
2.4.1. Pré-condicionamento .....	37
2.4.2. Exposição dos embriões à solução de tetrazólio .....	37
2.5. Teste de germinação .....	38

2.6. Delineamento experimental e análise estatística .....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
3.1. Aspecto morfológico das sementes .....	38
3.2. Teste de tetrazólio.....	39
3.2.1. Pré-condicionamento.....	39
3.2.2. Coloração das sementes.....	41
3.3. Teste de germinação .....	43
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>48</b>
PROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATAÇÃO DE PLANTULAS DE <i>Himatanthus</i> <i>sucuuba</i> Wood.....	48
<b>RESUMO.....</b>	<b>49</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>50</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
2.1. Local do experimento .....	52
2.2. Efeito das concentrações e tipos de auxinas no crescimento <i>in vitro</i> .....	52
2.3. Efeito da interação de BAP com auxinas no crescimento e enraizamento <i>in vitro</i> dos segmentos nodais.....	53
2.4. Aclimação das plântulas originadas do cultivo <i>in vitro</i> .....	54
2.5. Delineamento experimental e análise estatística .....	54
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
3.1. Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no crescimento <i>in vitro</i> .....	54
3.2. Efeito da interação de BAP com auxinas no crescimento e enraizamento <i>in vitro</i> dos segmentos nodais.....	57
3.3. Aclimação das plantas micropropagadas.....	60
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>67</b>
ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CALOS DE <i>Himatanthus sucuuba</i> E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS.....	65
<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>69</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
2.1. Local do experimento .....	71
2.2. Efeito de 2,4-D em interação com TDZ e BAP na indução de calos friáveis em explantes foliares .....	71
2.3. Efeito dos reguladores de crescimento na presença ou ausência de luz para indução de calos friáveis .....	72
2.4. Extração dos calos friáveis .....	73
2.5. Análise cromatográfica dos extratos.....	73
2.6. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (RMN).....	73
2.7. Delineamento experimental e análise estatística .....	74
<b>3. RESULTADOS E DISCUSÃO .....</b>	<b>74</b>
3.1. Efeito de 2,4-D em interação com TDZ e BAP na indução de calos friáveis em explantes foliares .....	74
3.2. Efeito dos reguladores de crescimento na presença ou ausência de luz para indução de calos friáveis .....	77
3.3. Extração dos calos friáveis de explante foliar e caulinar.....	79
3.4. Análise cromatográfica dos extratos metanólicos .....	80
3.5. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (RMN).....	82
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>88</b>

## INTRODUÇÃO

A floresta amazônica apresenta altos índices de biodiversidade de espécies medicinais (RODRIGUES e ALMEIDA, 2010). Dentre essas espécies, destaca-se *Himathantus sucuuba* Wood, a qual tem despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido à produção de látex, que apresenta propriedades terapêuticas, ação anti-inflamatória, analgésica (MIRANDA et al., 2000), efeito cicatrizante e atividade antibacteriana (RIBEIRO et al., 1999; SILVA et al., 1998; VILLEGAS et al., 1997), além de possuir substâncias químicas previamente isoladas que comprovaram atividade anticancerígena (SOARES et al., 2010). Devido a seu grande valor medicinal vê-se a necessidade de estudos que permitam a multiplicação de genótipos dessa espécie.

Uma das técnicas de multiplicação de plantas é a micropropagação ou cultura de tecidos vegetais que visa à produção de um grande número de mudas de qualidade em curto espaço de tempo (JUNGHANS e SOUZA, 2013). No entanto, a propagação *in vitro* ainda carece do desenvolvimento de protocolos de micropropagação para espécies florestais brasileiras, dentre elas as medicinais (OLIVEIRA et al., 2013).

Uma das peculiaridades da micropropagação é a possibilidade de maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro*, com a adição de reguladores de crescimento e de substâncias orgânicas, os quais em baixas concentrações, promovem, inibem, ou modificam o crescimento quando cultivados *in vitro*. Por esse motivo, existe a necessidade de definir o tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura, os quais são fatores determinantes no desenvolvimento *in vitro* (HARTMANN et al., 2004).

A germinação de sementes é o primeiro estágio de desenvolvimento das plantas e o principal meio de propagação da maioria das espécies vegetais (FERREIRA e BORGUETTI, 2004). Em um programa de produção de mudas de qualidade, outro parâmetro importante a ser considerado é a avaliação da qualidade fisiológica de sementes e, atualmente o teste de tetrazólio fornece resultados rápidos em um período de tempo relativamente curto e são os mais demandados para as tomadas de decisão nas diferentes etapas do processo produtivo (PINHO et al., 2011).

Nesse contexto, aprofundamos os estudos sobre viabilidade de sementes e propagação *in vitro* de *H. sucuuba* estabelecendo um protocolo que permita clonar plantas com propriedades fitoterapêuticas atribuídas aos compostos químicos que podem ser extraídos de uma produção clonal de material geneticamente selecionado *in vitro*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Família Apocynaceae

A família Apocynaceae está incluída filogeneticamente na ordem Gentiales e subclasse Asteridae, sendo consideradas como espécies de dicotiledôneas bem evoluídas e são caracterizadas normalmente pela presença de látex. Essa família contém aproximadamente 5.100 espécies distribuídas em 450 gêneros, sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos frequentes em regiões temperadas. Na flora brasileira são catalogadas mais de 400 espécies distribuídas em 41 gêneros, sendo 32 deles encontrados apenas na Amazônia (PEREIRA et al., 2007). Esta família pode ser considerada uma das mais importantes fontes de constituintes químicos utilizados na medicina moderna (JUDD et al., 2009).

#### 2.1.1 Gênero *Himatanthus*

O gênero *Himatanthus* foi descrito por Willdenow e é composto por espécies nativas de América do Sul. As espécies descritas estão dispersas na zona tropical desde a latitude 10° N até o trópico de Capricórnio. Existem 13 espécies descritas para esse gênero, sendo elas: *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson, *H. attenuatus* (Benth) Woodson, *H. bracteatus* (A. DC.) Woodson, *H. drasticus* (Mart.) Plumel, *H. fallax* (Mull. Arg.) Plumel, *H. lancifolius* (Mull. Arg.) Woodson, *H. abovatus* (Mull. Arg.) Woodson, *H. plagedaenicus* (Mart.) Woodson, *H. semilunatus* Margr, *H. speciosus* (Mull. Arg.) Plumel, *H. stenophyllus* Plumel, *H. sucuuba* (Spruce) Woodson, e *H. tarapotensis* (K. Schum.) Plumel (PLUMEL, 1991).

#### 2.1.2. *Himatanthus sucuuba*

Conforme o sistema de classificação de Cronquist de 1981 segue o enquadramento taxonômico de *Himatanthus sucuuba* Wood na Tabela 1, conhecida popularmente como: sucuba-verdadeira, sucuba, janaguba agoniada sucova, sucuuba da Amazônia, anaguba, arapue, bellaco-caspi, bellaku-caspi, caracucha, caracuchu, caracuchu blanco, ceneiwe, sanago, socoba (OLIVEIRA et al., 2013; PLUMEL, 1991).

Tabela 1. Classificação taxonômica da planta *Himatanthus sucuuba* Wood.

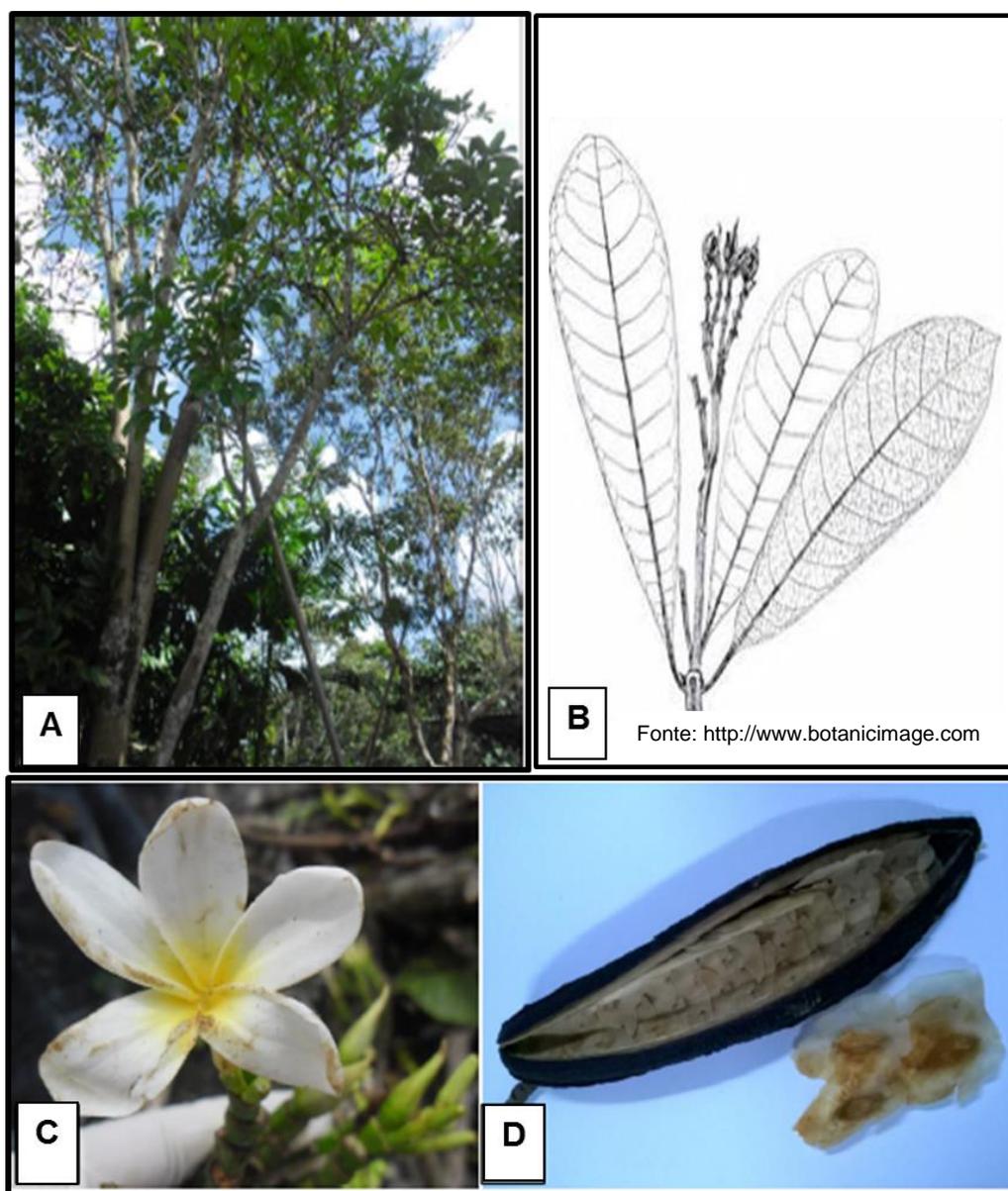
Taxonomia	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Classe</b>	Dicotyledonae
<b>Subclasse</b>	Asteridae
<b>Ordem</b>	Gentianales
<b>Família</b>	Apocynaceae
<b>Espécie</b>	<i>Himatanthus sucuuba</i>

Fonte: Cronquist (1981).

## 2.2. Descrição botânica

Apresenta árvores que podem atingir de 8 a 20 metros de altura, lactescentes, com troncos vultuosos e casca gretada, folhas de 13-25 cm de comprimento por 8-15 cm de largura, simples, alternas espiraladas, glabras coriáceas e de margens inteiras (Figura 1), (PLUMEL, 1991; SPICHIGER e GENÈVE, 1989). Além disso, possui flores brancas em campânulas de base amarela, os frutos são alongados e verdes quando imaturos, e marrons escuros quando maduros, são deiscentes e com numerosas sementes elipsoides secas, envoltas por uma ala membranosa circular bem desenvolvida, esta estrutura reveste inteiramente a semente a protegendo (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 1. Detalhes da espécie em estudo *H. succuuba* Wood. A - árvore com 15 m de altura; B - disposição das folhas e posição da inflorescência; C - detalhe da flor; D - fruto folículo maduro e sementes aladas.



Figuras A, C e D (Autor: Souza, 2017).

### 2.3. Distribuição

O gênero *Himatanthus* possui distribuição restrita, sendo nativo na América do Sul, cresce em terra firme na região amazônica (SPINA, 2004). A distribuição geográfica de *H. succuuba* vai desde o sudeste do Brasil até a Guiana Francesa, Suriname e Guiana (PLUMEL, 1991). No Brasil ocorre nos estados de Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Rondônia, Maranhão, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 2013). No entanto, esta espécie se distribui predominantemente na bacia

amazônica, habitando significativamente em ambiente de terra firme (PLUMEL, 1991), e sujeita a períodos prolongados de saturação de água no solo e ambientes alagados, ocorrendo em regiões de várzea baixa, onde se desenvolve nos dois ambientes em áreas abertas de bordas de florestas, apresentando sistema de adaptação a diferentes ambientes (FERREIRA et al., 2005; 2006).

#### **2.4. Fenologia**

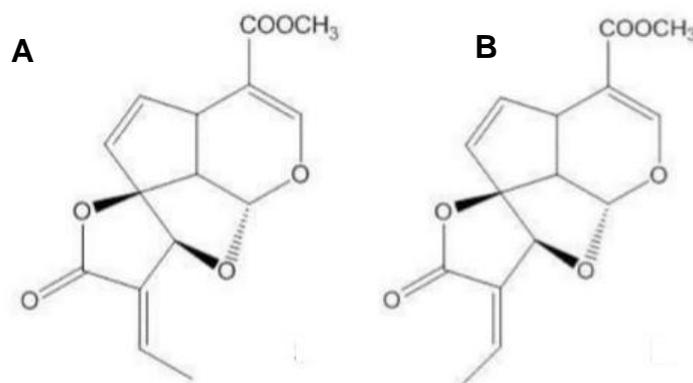
Conforme observações fenológicas, espécies deste gênero apresentam florescência entre os meses de janeiro a maio e de agosto a novembro, e frutificam nos meses de janeiro, março, agosto e novembro (CAMPOS e FARINACCIO, 2011). A dispersão de *H. sucuuba* ocorre por sementes aladas levadas pelo vento (PLUMEL, 1991), e por hidrocoria, onde a estrutura que reveste inteiramente as sementes as protege e facilita a sua dispersão pela água (FERREIRA et al., 2005).

#### **2.5. Usos e importância**

*H. sucuuba* possui a madeira leve, indicada para obras internas em construção civil, para confecção de embalagens, brinquedos e para cabos de ferramentas e instrumentos agrícolas, bem como lenha para carvão (LORENZZI, 1998). A casca do tronco é popularmente usada para o tratamento de gastrite, úlceras de estômago, hemorróidas (VAN DEN BERG, 1984). O látex da planta possui propriedades terapêuticas, tendo recebido atenção na medicina popular para o tratamento de várias moléstias, sendo usado principalmente em emplastos, no tratamento de fraturas e indicada como antireumático, antifúngico e anticancerígeno (SILVA et al., 1998; VILLEGAS et al., 1997). As substâncias químicas mais isoladas dessa planta são iridoídes, encontrados no caule e no látex, como plumericina e isoplumericina, apresentou atividade contra o carcinoma nasofaringe epidermóide humano (PERDUE e BLOMSTER, 1978) (Figura 2).

Na Amazônia peruana é utilizada para hérnias, furúnculos e tumores (SILVA et al., 2003), e no tratamento de leishmaniose cutânea (CASTILLO et al., 2007). Estudos feitos no Brasil afirmam que o látex possui atividade comprovada, com uma potente atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, um agente causador da leishmaniose cutânea (SOARES et al., 2010).

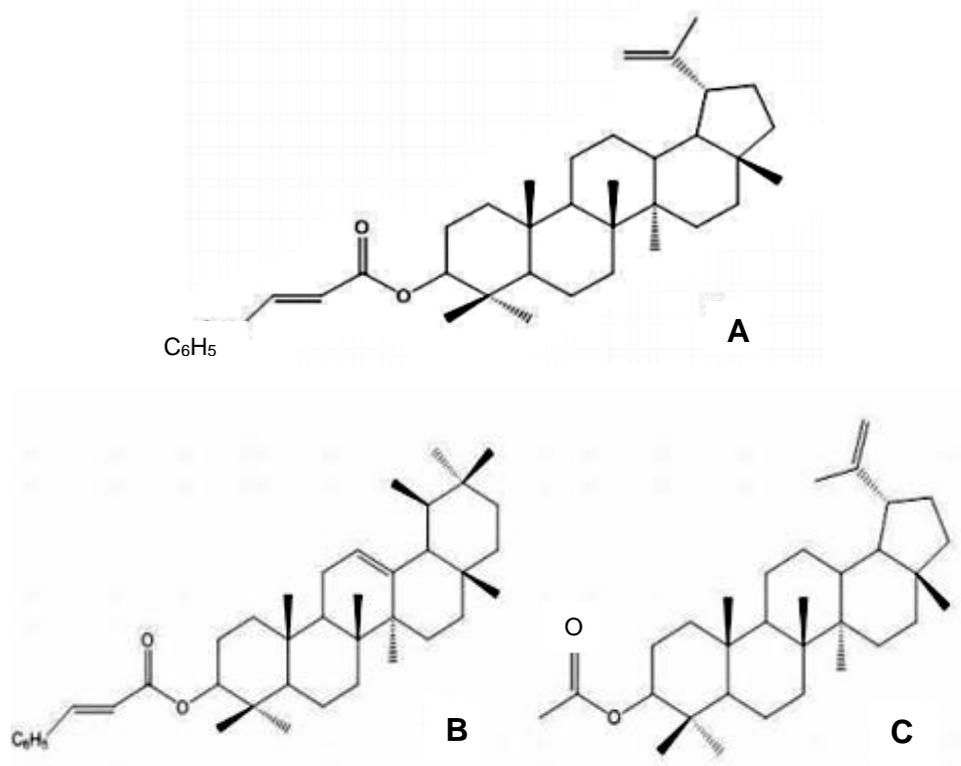
Figura 2. Estruturas químicas dos iridóides: (A) plumericina e (B) isoplumericina isolados de *H. sucuuba* Wood.



Fonte: Miranda et al. (2000).

Extraídos da casca e do látex estão os triterpenos isolados, cinamato de lupeol, cinamato de  $\alpha$ -amirina, cinamato de  $\beta$ -amirina e acetato de lupeol (Figura 3), que possuem atividades antiinflamatória e analgésica (MIRANDA et al., 2000).

Figura 3. Estruturas químicas dos triterpenos: (A) cinamato de lupeol; (B) cinamato de  $\alpha$ -amirina e (C) acetato de lupeol isolados de *H. sucuuba*.



Fonte: Silva et al. (1998).

## **2.6. Teste de Tetrazólio**

O teste de tetrazólio se baseia na atividade de um grupo de enzimas (desidrogenases), do ácido málico as quais reduzem o sal de tetrazólio (Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio ou TCT) nas mitocôndrias durante o ciclo de Krebs para trifenilformazan nos tecidos vivos (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS, 1983; BRASIL, 2009). Como esta reação se processa no interior das células vivas e as substâncias não se difundem, há nítida distinção dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não se colorem.

Dentre os diversos testes para determinação do potencial fisiológico adotado pelo controle de qualidade da indústria sementeira no Brasil, o teste de tetrazólio tem se destacado, devido à sua rapidez, precisão e também pelo grande número de informações fornecidas pelo mesmo (FRANÇA NETO, 1981; FRANÇA NETO et al., 1988).

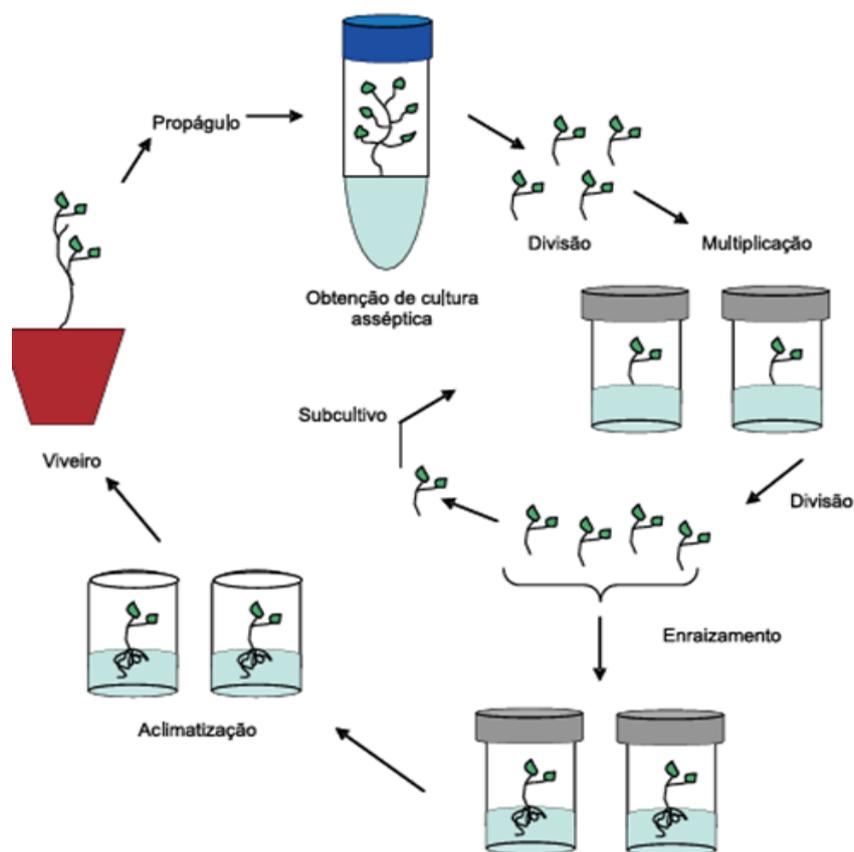
Para a interpretação do teste de tetrazólio, é fundamental conhecer as diferentes estruturas da semente em análise. Se a importância e a função de cada estrutura não forem conhecidas, as colorações das reações não terão sentido (MARCOS FILHO, 2005).

## **2.7. Propagação *in vitro***

### **2.7.1. Generalidades**

A cultura de tecidos vegetais é o conjunto de técnicas utilizadas para o cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais visando produzir uma nova planta (Figura 5) (CARVALHO et al., 2011; RIBEIRO et al., 2010). A capacidade de regeneração das células para formar uma planta completa é um fenômeno denominado totipotência, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à formação de um novo indivíduo (RODRÍGUEZ, 1987; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Figura 4. Procedimentos realizados para a obtenção de plantas a partir da técnica da micropropagação.



Fonte: Ribeiro et al, 2010.

As técnicas de cultivo *in vitro* apresentam importância prática para área agrícola e florestal, e tem como um dos principais objetivos, oferecer uma alternativa para a manipulação de plantas, inclusive em nível molecular. Além disso, tem se destacado na propagação comercial de plantas, no melhoramento genético, na resistência às doenças, no manejo, no intercâmbio e na conservação de germoplasma, assim como na produção industrial *in vitro* de metabólitos secundários e em outras aplicações com pesquisas na área de fisiologia vegetal (JUNGHANS e SOUZA, 2013). Também oferece uma alternativa para a propagação de espécies que apresentam propriedades medicinais com valor farmacológico reconhecido (LIMA et al., 2007).

Considerando a propagação comercial de espécies de interesse econômico, a cultura de tecidos de plantas é uma técnica de propagação recomendada quando se objetiva a manutenção de determinada característica e a produção de mudas de alta qualidade livres de doenças e pragas (TEIXEIRA et al., 2008).

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende de vários fatores como: estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de cultura,

condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, meio de cultura, entre outros (CARVALHO et al., 2006; GONZALES et al., 2004; QUISEN e ANGELO, 2008).

### **2.7.2.Meios de cultura**

O meio deve conter todas as fontes de micro e macronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento, além de fontes de carbono e oxigênio para que a planta possa se desenvolver como se estivesse em condições naturais, apesar de que quando cultivada *in vitro*, esta deve ser heterotrófica e apresentar tamanho limitado (TORRES et al., 1998). Quanto aos nutrientes, baseiam-se nas exigências de crescimento e desenvolvimento das plantas, com algumas modificações para atender às necessidades específicas das condições *in vitro* (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Não existe, ainda, um meio de cultura específico adequado para um gênero, espécie, híbrido ou clone. Em geral, é difícil explicar porque em certas combinações de componentes do meio e condições de cultivo os resultados têm sido bem sucedidos para algumas espécies de plantas, enquanto que para outras não se tem logrado êxito (FRÁGUAS et al., 2003; VENTURA, 2007).

A composição dos meios de cultura basais utilizados na micropropagação varia de acordo com a espécie e as diferentes etapas do processo, ou seja, assepsia, multiplicação e enraizamento *in vitro* (QUISEN e ANGELO, 2008). Segundo Torres et al. (1998), há inúmeras formulações dos meios de cultura, não existindo um meio padrão, embora o mais amplamente difundido seja o meio idealizado por Murashige e Skoog (MURASHIGE & SKOOG, 1962), conhecido mundialmente como meio MS. O MS é um meio quimicamente definido, de sais inorgânicos, vitaminas, carboidrato e agente gelificante. É universalmente usado especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas e caracteriza-se pela elevada concentração em sais minerais (QUISEN e ANGELO, 2008).

### **2.7.3.Reguladores de crescimento vegetal**

Reguladores de crescimento são substâncias orgânicas que, em baixas concentrações, promovem, inibem ou ainda modificam o crescimento do vegetal. Na cultura de tecidos vegetais, o uso destas substâncias aumenta a possibilidade quase absoluta do controle de crescimento e desenvolvimento das plantas, o qual seria quase impossível sem a adição dos reguladores de crescimento ao meio de cultura, pois eles direcionam o metabolismo do explante para o processo desejado (PASQUAL et al., 1997). A combinação ótima de auxinas

e citocininas varia entre diferentes espécies e, até mesmo entre cultivares dentro de uma mesma espécie (MALAURE et al., 1991).

As auxinas são utilizadas para induzir o desenvolvimento de nós, raízes e formação de calos, sendo que as mais utilizadas no cultivo *in vitro*, são: ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (CARVALHO, 1999).

As citocininas estimulam a divisão celular e em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; e as mais freqüentes, são: kinetina (KIN), zeatina (uma citocinina natural), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA) e 6-(g,g-dimetilaliminol) purina (2iP) (CARVALHO, 1999).

As giberelinas induzem o crescimento de nós e de meristemas ou gemas *in vitro*; podem, também, romper a dormência de embriões isolados ou gemas e inibir a formação de brotos ou raízes adventícias. Dentre as giberelinas, o ácido giberélico (GA3) é o mais usualmente empregado (CARVALHO, 1999).

## 2.8. Cultura de calos

Calo é um grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (TORRES et al., 2000). O calo é uma resposta comum quando um tecido cultivado *in vitro* passa por injúrias físicas ou químicas, podendo se diferenciar em órgãos ou tecidos. Para a indução de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante (HANDRO, W.; FLOH, 1990). Mas é necessário saber que nem todas as células de um explante formam calo com facilidade ou produzem o metabólito de interesse, por isso a escolha do explante é fundamental para um bom resultado, no entanto, é sabido que, os tecidos jovens são mais adequados que os adultos (PINTO e LAMEIRA, 2001).

Segundo (CALDAS et al., 1998) para que a cultura de calos obtenha sucesso, quase sempre é necessária a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura, para suprir possíveis deficiências dos teores de fito-hormônios nos explantes. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio de cultura promovem a formação de calos, mas este efeito varia em função do balanço hormonal endógeno de cada espécie (PIERIK, 1990).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Estabelecer protocolos para determinar a viabilidade de sementes, propagação *in vitro*, aclimação *ex vitro* das plântulas e indução de calos friáveis de *Himatanthus siccuba*.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar a viabilidade e vigor das sementes pelo teste de tetrazólio de *H. siccuba*;
- Determinar os aspectos morfológicos das sementes e plântulas;
- Avaliar o tipo de regulador de crescimento vegetal e sua concentração na multiplicação e enraizamento *in vitro*, e estabelecer a aclimação das plântulas em viveiro;
- Determinar o regulador de crescimento e a concentração para indução de calos friáveis originados de explantes foliares e caulinares;
- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos de calos friáveis.

#### 4. REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Journal of seed technology. 1983, p. 80–90.

BRASIL. Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, p. 365, 2009.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 87–132.

CAMPOS, D. A.; FARINACCIO, M. A. *Himatanthus* (Apocynaceae): reconhecimento das espécies, informações fenológicas e distribuição do gênero em Sergipe. **X Congresso de Ecologia do Brasil**, p. 1–2, 2015.

CARVALHO, A.C.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.; LEMOS, E.E.; SOUZA, F.V.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 7, p. 30–60, 2011.

CARVALHO, J.; SILVA, M.M.; MEDEIROS, M. J. Fatores Inerentes à micropropagação. **Embrapa algodão**, p. 1–30, 2006.

CARVALHO, J. M. Técnicas de micropropagação. **Embrapa algodão**, p. 40, 1999.

CASTILLO, D.; AREVALO, J.; HERRERA, F.; RUIZ, C.; ROJAS, R.; RENGIFO, E.; VAISBERG, A.; LOCK, O.; LEMESRE, J. L.; GORNITZKA, H.; SAUVAIN, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 410–414, 2007.

FERREIRA, C.; PIEDADE, M. T.; PAROLIN, P.; BARBOSA, K. M. Tolerância de *Himatanthus sucuuba* Wood . ( Apocynaceae ) ao alagamento na Amazônia Central 1. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 3, p. 425–429, 2005.

FERREIRA, C. DA S.; PIEDADE, M. T. F.; BONATES, L. C. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento , nas várzeas da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 413–418, 2006.

FRÁGUAS, C.; VILLA, F.; SOUZA, A. DE. **Crescimento in vitro de plântulas de orquídea oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana***. **Revista Ceres**, 2003. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/CERES/revistas/V50N292P25903.pdf>>

FRANÇA NETO, J.B.; GERALDO PEREIRA, L. A.; PEREIRA DA COSTA, N.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; ASSIS HENNING, A. Metodologia do teste de tetrazólio em semente de soja. **EMBRAPA-CNPq**, p. 12–13, 1988.

FRANÇA NETO, J. D. B. Principios do teste de tetrazolio para a semente de soja. 1. v. 3, p. 1–8, 1981.

GONZALES, S. R.; LOZANO, J.G.; ROJAS, H. J. Propagación asexual de plantas: conceptos basicos y experiencias com especies amazónicas, p. 55., 2004.

GRENAND, P.; MORETI, C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. **Brittonia**, v. 57, n. 3, p. 295–296, 1987.

HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP7/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 203–2012.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. ; DRIVER, F.T.; GENEVE, R. L. Plant propagation: Principles and practices. p. 880, jan. 2004.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S. ; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Sistemática vegetal um enfoque filogenético. p. 632, 2009.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, S. A. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. p. 407, 2013.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 669–671, 2007.

LORENZI; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no brasil. Nativas e exóticas. p. 94–95, 2002.

MALAURE, R. S.; BARCLAY, G.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. The production of novel plants from florets of *chrysanthemum morifolium* using tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, v. 139, p. 14–18, 1 nov. 1991.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. In: Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 495.

MIRANDA, A. L.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L. ; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E. .; DA CUNHA PINTO, A. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 284–286, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, v. 15, p. 473–497, 1962.

OLIVEIRA, L. S. DE; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013.

PERDUE, G. P.; BLOMSTER, R. N. South American plants III: Isolation of fulvoplumierin from *Himatanthus sucuuba* (M. Arg.) Woodson (apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 9, p. 1322–1323, 1978.

PEREIRA, MARIA DE M.; JÁCOME, R. L.; ALCÂNTARA, A. F.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 970–983, 2007.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. [s.l.] Ediciones Mundi-Prensa, 1990.

PINHO, D. S.; BORGES, E. E. DE LIMA.; CARVALHO, A. P. V. .; CORTE, V. B. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da vianilidade de sementes de angico. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 2011, n. 67, p. 269–272, 2011.

PINTO, J.E.B.P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

PLUMEL, M. M. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae): révision taxonomique. *Bradea* : boletim do Herbarium Bradeanum. p. 118, 1991.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. DA S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus/Embrapa, 2008. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/665576>>

RIBEIRO, J. E.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. In: Manaus: INPA, 1999. p. 799.

RIBEIRO, J.M.; BASTOS, D.C.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, E.A.G.; PINTO, M. S. T. Produção de mudas micropropagadas de videira, mangueira e goiabeira. p. 22, 2010.

RODRÍGUEZ, J. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento de plantas. **Sitientibus**, v. 4, p. 121–125, 1987.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p.333-340, 2010.

SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: **Introdução à micropropagação de plantas**. [s.l.] Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 79–98.

SANTOS, A. C.B.; SILVA, M. A. P. .; SANTOS, M. A.F.; LEITE, T. R. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 442–458, 2013.

SILVA, J. R. D. A.; AMARAL, A. C. F.; SIANI, A. C. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba* : Latex macromolecule , microelements and Carbohydrates. **SciELO**, v. 33, n. 1, p. 105–110, 2003.

SILVA, J. R. DE A. et al. Triterpenic esters from *Himatanthus sucuuba* (SPRUCE) WOODSON. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 24–26, 1998.

SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L. S.; DELORENZI, JAN C.; SILVA, J. R. A.; FREIRE DE LIMA, L.; FALCÃO, C. A. B.; PINTO, ANGELO C.; ROSSI BERGMANN, B.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 173–177, 2010.

SPICHIGER, R.; GENÈVE, C. ET JARDIN BOTANIKES DE LA VILLE DE. Contribución a la flora de la Amazonia peruana: los árboles del Arboletum Jenaro Herrera. n. v. 1, p. 359, 1989.

SPINA, A. P. **Estudos taxonômico, micro-morfológico e filogenético do gênero *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae: Rauvolfioideae-Plumerieae)**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiología Vegetal. **Fisiología Vegetal**, p. 536,537, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 375–378, 2006.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação in vitro de *Eucalyptus pellita* L. **Ciencia Florestal**, v. 18, n. 2, p. 185–191, 2008.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SA, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**, 2000.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. In: **Meios nutritivos**. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998. p. 104.

VENTURA, G. M. Cultivo in vitro de orquídeas do grupo *Cattleya* em diferentes meios de cultura e irradiâncias. p. 122, 2007.

VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193–200, 1997.

## **CAPÍTULO I**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES  
ARMAZENADAS DE *Himatanthus sucuuba* Wood**

## **Avaliação da viabilidade e vigor de sementes armazenadas de *Himatanthus sucuuba* Wood**

Lyanna Hellen Sáenz Ramírez<sup>1</sup>, Angela Maria da Silva Mendes<sup>2</sup>, Angela Maria Imakawa<sup>1</sup>, Maria da Glória Gonçalves de Melo<sup>1</sup>, Paulo de Tarso Barbosa Sampaio<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Universidade do Estado do Amazonas*, <sup>2</sup>*Universidade Federal do Amazonas*,  
<sup>3</sup>*Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.*

### **RESUMO**

*Himatanthus sucuuba* é uma espécie arbórea que ocorre principalmente em ambientes de terra firme e várzea na região Amazônica. O objetivo do trabalho foi determinar métodos de pré-condicionamento e a concentração adequada da solução de tetrazólio para a avaliação da qualidade de sementes de *H. sucuuba*. Os tratamentos pré-condicionantes para a retirada do tegumento e endosperma foram avaliados em 50 sementes embebidas em 200 mL de água destilada para cada período de 4, 8, 12 e 14 horas a 25 °C. As concentrações da solução de tetrazólio testadas foram 0,025%, 0,075% e 0,100%, e as sementes foram mantidas em estufa a 40 °C por 90 minutos na ausência de luz. O tratamento de pré-condicionamento mais eficiente, foi a embebição em água por 8 horas. A concentração de tetrazólio 0,075% foi a mais adequada e apresentou 70% de viabilidade das sementes desta espécie. O teste de germinação resultou em 78% de sementes germinadas, das quais 47% desenvolveram plântulas normais e 31% plântulas anormais. Ambos testes mostraram que as sementes permaneceram viáveis após 14 meses de armazenamento.

**Palavras-chave:** Qualidade de sementes, análise de sementes, espécie medicinal, germinação, tetrazólio.

**ABSTRACT**

*Himatanthus sucuuba* is a tree species that occurs mainly in terra firme and lowland environments in the Amazon region. Its seeds are ellipsoids, winged and scattered by the wind. The objective of this work was to determine preconditioning methods and the adequate concentration of the tetrazolium solution to evaluate the quality of *H. sucuuba* seeds. The preconditioning treatments for tegument and endosperm removal were evaluated in 50 seeds soaked in 200 ml of distilled water for each period of 4, 8, 12 and 14 hours at 25 °C. The concentration of the tetrazolium solution tested were 0.025%, 0.075% and 0.100%, and of seeds were maintained in an oven at 40 °C for 90 minutes in the absence of light. The most efficient pretreatment was imbibition in water for 8 hours. The tetrazolium concentration at 0.075% was the most adequate and indicated 70% viability of the seeds of this species. The germination test resulted in 78% of germinated seeds, of which 47% developed normal seedlings and 31% abnormal seedlings. Both tests showed that the seeds remained viable after 14 months of storage.

**Key words:** Seed quality, seed analysis, medicinal species, germination, tetrazolium.

## 1. INTRODUÇÃO

A propagação de *H. sucuuba* é realizada, principalmente, via sexuada, o que torna fundamental a avaliação da qualidade de suas sementes de maneira rápida e eficiente (FERREIRA et al., 2004). As informações sobre a qualidade fisiológica de sementes florestais desta espécie são escassas, tanto para os diversos fins de sua utilização, como para sua própria preservação (MONDO et al., 2008).

O teste de germinação, método mais tradicionalmente utilizado para a análise da qualidade de sementes, determina a proporção de sementes capazes de produzir plântulas normais sob condições favoráveis de temperatura, luz, umidade, aeração e substrato (BRASIL, 2009). Entretanto a demora na obtenção dos resultados resulta numa séria limitação ao processo de tomada de decisões na indústria de sementes (FRANÇA NETO et al., 1997).

Outro método que vem sendo utilizado com êxito para avaliar a qualidade de sementes de espécies florestais é o teste de tetrazólio que mostra-se como uma alternativa promissora pela qualidade e rapidez na determinação da viabilidade e do vigor da semente. Além disso permite identificar danos mecânicos, danos causados por insetos, por secagem e deterioração por umidade (FERREIRA et al., 2004).

A avaliação da qualidade fisiológica é um parâmetro importante a ser considerado em um programa de produção de sementes e, atualmente, testes que fornecem resultados em período de tempo relativamente curto são os mais demandados para agilizar as diferentes etapas do processo produtivo, especialmente na fase de pós-colheita (BHERING et al., 2005).

Apesar da sua importância, pela rapidez e precisão na determinação da viabilidade e do vigor, o teste de tetrazólio tem seu uso ainda restrito a poucas espécies agrícolas como soja – *Glycinemax* (KRYZANOWSKI et al., 1999), abóbora – *Cucurbita moschatae* abobrinha - *Cucurbita pepo* (BARROS, 2002) melancia – *Citrullus lunatus* (BHERING et al., 2005), café - *Coffea arábica* (VIEIRA et al., 1998). Conforme (RODRIGUES e SANTOS, 1998), o teste de tetrazólio não é muito difundido entre espécies perenes, como florestais e frutíferas, embora apresente excelentes condições para ser utilizado rotineiramente, uma vez que muitas dessas necessitam de um longo período para germinarem.

Em espécies florestais, vêm sendo realizado para *Tabebuia serratifolia* (OLIVEIRA et al., 2004), *Schizolobium parahyba* (FERREIRA et al., 2007), *Parkia velutina* (MENDES et al., 2009), *Aspidosperma pyrifolium* (BELARMINO, 2012), *Tabebuia roseoalba* (ABBADE e TAKAKI, 2014), porém para espécies da família Apocynaceae são muito escassas. Com o aumento da demanda por sementes de espécies florestais, para atividades de recuperação de áreas degradadas ou reflorestamento para outros fins, de acordo com a legislação vigente, a utilização de testes rápidos para a comercialização dessas sementes será intensificada.

Diante da inexistência de informações sobre análise de sementes armazenadas de *H. succuuba*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade e vigor das sementes pelo teste de tetrazólio.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) – Manaus, Amazonas.

### **2.2. Coleta de sementes**

A área de coleta dos frutos situa-se no Ramal do Brasileirinho (2°95'99" S, 59°86'20" W), onde os frutos foram coletados diretamente das árvores em julho de 2016. As amostras do material vegetal foram identificadas e catalogadas, e encontram-se depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, sob o nº 276673. Os frutos foram transportados para o Laboratório de Sementes Florestais da EST, e foram deixados na bancada a 25 °C até a abertura do fruto. Após a extração de forma manual, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em câmara fria a 10 °C. As sementes utilizadas nos experimentos estavam armazenadas por 14 meses.

### **2.3. Aspecto morfológico das sementes**

A caracterização morfológica foi realizada com uma amostra aleatória de 30 sementes; sendo as características internas e externas observadas em maiores detalhes, com auxílio de estereomicroscópio; para a descrição foram empregadas as terminologias mais

utilizadas nos estudos de morfologia (BARROSO et al, 2004), abrangendo consistência, cor e superfície do tegumento, posição dos apêndices (hilo, micrópila, rafe e ala) dos aspectos externos e, internos, consistência, coloração, tipo e forma do endosperma e embrião (cotilédones, eixo hipocótilo-radícula e plúmula).

## **2.4. Teste de tetrazólio**

### **2.4.1. Pré-condicionamento**

Para facilitar a penetração da solução de tetrazólio nos tecidos do embrião foi necessário retirar o tegumento das sementes. Para isto, foram testados quatro tempos de submersão das sementes em água destilada, com o objetivo de facilitar a remoção do tegumento das sementes sem causar injúrias ao embrião. Foram utilizadas 200 sementes, cujas alas foram retiradas manualmente e em seguida as sementes foram imersas em água destilada, por períodos de 4, 8, 11 e 14 horas a 25 °C, e para cada tratamento utilizaram-se quatro subamostras de 50 sementes. Decorrido cada período de imersão, o tegumento e endosperma foram cuidadosamente retirados com auxílio de estilete e computados, em porcentagem, a quantidade de embriões com injúrias, causada pela manipulação.

### **2.4.2. Exposição dos embriões à solução de tetrazólio**

Após definição do melhor tratamento de pré-condicionamento, foram utilizados 40 embriões, divididos em quatro repetições de 10, submetidos a três concentrações da solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio. Em cada repetição, os embriões foram imersos em 40 mL da solução, nas concentrações de 0,025%, 0,075% e 0,100% para cada tratamento. Para a definição da temperatura e tempo de coloração, foi tomado como base o trabalho de Mendes et al. (2009), que indicam a temperatura de 40 °C, no escuro por duas horas. Então, nessa condição, os embriões foram monitorados a cada 30 minutos; quando observado que os embriões submetidos à menor concentração atingiram uma coloração que pudesse ser avaliada, o experimento foi encerrado.

Após finalizar o período de coloração, os embriões foram lavados em água corrente e mantidos submersos até o momento da avaliação. Os embriões foram seccionados longitudinalmente entre os cotilédones, sem causar dano ao eixo embrionário. Para caracterizar os níveis de viabilidade e vigor, os embriões foram separados em seis classes, por meio da observação da intensidade e uniformidade da coloração, presença de áreas brancas leitosas, aspecto dos tecidos e localização destas características em relação às áreas

essenciais ao crescimento. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes viáveis e inviáveis nas diferentes classes.

## **2.5. Teste de germinação**

O teste de germinação foi feito para comparar a viabilidade das sementes com o teste de tetrazólio. A germinação foi realizada em câmara de germinação BOD a 30 °C, sob luz branca constante e fotoperíodo de 16 horas. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, sendo que as alas foram retiradas manualmente, de acordo com as recomendações de Ferreira et al. (2006), ecolocadas para germinar em substrato de folhas de papel filtro autoclavado (6 camadas), em bandejas de vidro (31x22x4 cm) e umedecido com água destilada no volume 2,5 vezes o peso do papel seco. O critério adotado para avaliar a viabilidade das sementes foi a emissão da raiz primária (5mm) e, para avaliar o vigor, a formação de plântulas normais (desenvolvimento de raízes, alongamento do hipocótilo, expansão das folhas cotiledonares e gema apical perceptível). A germinação foi acompanhada diariamente e os dados foram expressos em porcentagem.

## **2.6. Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para testar o grau de significância entre o pré-condicionamento, as concentrações de tetrazólio e o teste de germinação. Para as médias significativas foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SPSS - PASW Statics 18.

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Aspecto morfológico das sementes**

Na condução e interpretação do teste de tetrazólio, é necessário o conhecimento dos aspectos morfológicos das sementes. Na literatura científica foi encontrada apenas a descrição das sementes de uma espécie do gênero *Himatanthus* (AMARO et al., 2006), portanto, houve a necessidade de caracterizar de forma detalhada as sementes de *H. sucuuba*.

As sementes maduras de *H. sucuuba* são aladas, com ala periférica circular, de coloração perolada e consistência papirácea (Figura 1-A), que se rasga e desprende com facilidade. O núcleo seminífero é elíptico com tegumento rígido de consistência lenhosa, testa de textura levemente áspera e coloração marrom claro; observa-se a rafe linear rígida, proeminente e centralizada em uma das faces da semente; o hilo é discreto, proeminente e situa-se na base da rafe (Figura 1-B); a micrópila não foi visualizada.

Na maturidade, a semente apresenta reserva endospermática; o endosperma é branco, delgado, contínuo e recobre todo o embrião, de consistência carnosa (Figura 1-B). O embrião é axial, foliáceo, oval, branco (Figura 1-B), com eixo hipocótilo-radícula cilíndrico, longo, exposto aos lóbulos cotiledonares e, plúmula indiferenciada (Figura 1-C).

Figura 1. Aspectos morfológicos da semente de *Himatanthus sucuuba* Wood. A - aspecto geral, B - aspectos do tegumento, endosperma e embrião, C - detalhe do embrião. al - ala, co - cotilédone, ehr - eixo hipocótilo-radícula, em - embrião, en - endosperma, hi - hilo, ra - rafe, te - tegumento.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

### 3.2. Teste de tetrazólio

#### 3.2.1. Pré-condicionamento

A estrutura do tegumento da semente, tipo de reserva e embrião são aspectos importantes para o correto manuseio da semente durante a condução do teste de tetrazólio. Inicialmente, para o preparo da semente para o teste de tetrazólio é necessário o pré-umedecimento da semente. Esse preparo, segundo BRASIL (2009), tem por objetivo hidratar as sementes e ativar o sistema enzimático, permitindo o desenvolvimento de coloração adequada para a interpretação dos resultados; além disso, sementes pré-umedecidas são geralmente menos susceptíveis a danos, durante o seu preparo para o teste, do que sementes secas.

O primeiro passo no pré-condicionamento da semente de *H. sucuuba*, foi a retirada da ala; esta foi retirada manualmente com facilidade. O segundo passo foi a retirada do tegumento; este se apresenta rígido e provavelmente com pouca permeabilidade à água, sendo, portanto, necessário a retirada do mesmo, após imersão em água. O terceiro passo foi a remoção do endosperma, pois este poderia ser uma barreira à penetração da solução do tetrazólio no embrião; sua remoção foi feita ao mesmo tempo da retirada do tegumento.

O período de imersão em água por 4 horas não foi satisfatório, devido à dificuldade na remoção do tegumento e endosperma, causando um maior número de embriões com danos mecânicos; esse tempo de imersão não promoveu o amolecimento do tegumento. Enquanto que 8, 12 e 14 horas de imersão não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1), sendo esses tempos, suficiente para o amolecimento do tegumento, o que facilitou sua retirada completa junto com o endosperma, sem danos ao embrião. Mesmo não apresentando diferenças significativas com 12 e 14 horas, a imersão por 8 horas mostrou-se a mais adequada; as sementes apresentaram tegumento mais maleável, portanto, ocorreu embebição e o embrião foi hidratado. Em 12 e 14 horas de imersão ocorreu excessiva absorção de água, as sementes estavam com aspecto túrgido e o endosperma amolecido.

Tabela 1. Pré-condicionamento em sementes de *H. sucuuba* submetidas a diferentes períodos de imersão em água destilada para a remoção do tegumento e endosperma.

Tempo de imersão (horas)	Sementes (%)	
	Danificadas	Não danificadas
4	78 a	22 b
8	34 b	66 a
12	34 b	66 a
14	30 b	70 a
Media	44	56

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

De acordo com Costa et al. (2007), a imersão direta das sementes em água não deve ser feita por período de tempo excessivo, pois pode acarretar problemas devido à redução na disponibilidade de oxigênio para as sementes, comprometendo a sua qualidade e, conseqüentemente, podendo levar à obtenção de resultados incorretos.

Com os resultados obtidos, pode-se verificar que o pré-condicionamento das sementes de *H. sucuuba* em água por 8 horas, foi suficiente para que as atividades metabólicas do embrião fossem restabelecidas, visto que permitiu a coloração adequada dos

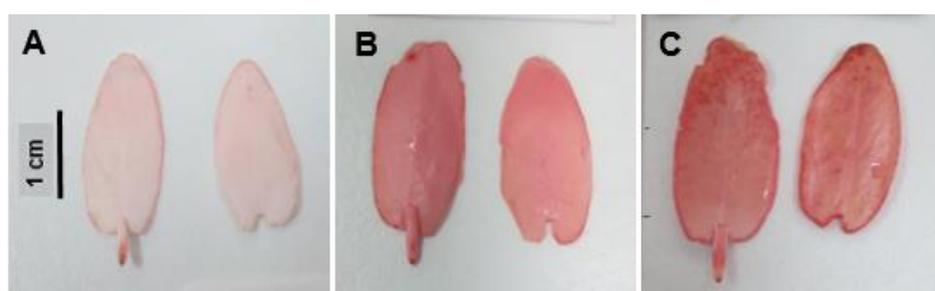
tecidos quando em contato com a solução de tetrazólio. Normalmente, a absorção de água para reativação das atividades metabólicas das sementes ocorre entre 8 e 16 horas de embebição (MARCOS-FILHO, 2015).

Observa-se na literatura, que para sementes aladas, há a necessidade de retirar o tegumento, para facilitar a condução do teste, mesmo que as espécies apresentem permeabilidade nos envoltórios da semente, como por exemplo em *Tabebuia roseoalba* (ABBADE e TAKAKI, 2014) e *Tabebuia serratifolia* (SILVA et al., 2011), nos quais o pré-condicionamento ocorreu com a imersão em água por 12 horas.

### 3.2.2. Coloração das sementes

Em relação à coloração, foi observado que 90 minutos, na temperatura de 40 °C, é suficiente para ocorrer a coloração, na menor concentração. Porém, os embriões submetidos às concentrações de tetrazólio a 0,025% e 0,100% apresentaram respectivamente, coloração fraca e intensa, dificultando a interpretação dos resultados (Figura 2A e C). No entanto, na concentração de 0,075%, ocorreram os melhores resultados em termos de intensidade e uniformidade da coloração e além disso, economicamente é mais viável (Figura 2B). Portanto, a concentração de 0,075% foi definida como adequada para avaliar a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis dos embriões de *H. sucuuba*.

Figura 2. Embriões de *H. sucuuba*, após 90 minutos de imersão em diferentes concentrações de soluções de tetrazólio. A - concentração de 0,025%, B - concentração de 0,075%, C - concentração de 0,100%.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

Barros et al. (2010), avaliando sementes de *Hancornia speciosa*, da mesma família da espécie estudada, verificaram que a coloração mais adequada para avaliar pelo teste de tetrazólio, foi obtida quando as sementes foram imersas em solução a 0,075% por 60 a 90 minutos a 40 °C, no escuro. Sousa et al. (2017), também definiram para sementes de *Poincianella pyramidalis*, a concentração da solução de tetrazólio de 0,075% e tempo de

coloração em 90 minutos, por apresentar o maior número de sementes coloridas, possibilitando a avaliação da viabilidade e vigor, além da observação de todas as estruturas do embrião.

É importante observar, que além dessa vantagem da facilidade de observação dos tecidos, as menores concentrações são mais indicadas, por apresentarem menor custo com a quantidade em uso do sal de tetrazólio, em comparação com as concentrações maiores. Da mesma forma como observado por SOUSA et al. (2017), os resultados desse trabalho contradizem as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), que indicam concentrações de aproximadamente 0,5 a 1,0% da solução de tetrazólio e períodos de coloração de 6 a 24 horas, para a maioria das espécies florestais. Esse fato reitera a importância da adequação do teste de tetrazólio para as espécies nativas.

Definida a concentração do tetrazólio a 0,075%, as sementes de *H. sucuuba* foram avaliadas e classificadas quanto a sua viabilidade e vigor, utilizando-se como critérios as partes afetadas e a intensidade de coloração nos tecidos do embrião. Por essas características foi possível separar seis classes, cujos exemplos podem ser observados na Figura 3.

Figura 3. Padronização das classes de viabilidade das sementes de *H. sucuuba*, submetido ao teste de tetrazólio, na concentração de 0,075%, em temperatura de 40 °C por 90 minutos. A - Classe 1: sementes viáveis e vigorosas. B - Classe 2: sementes viáveis e vigorosas. C - Classe 3: sementes viáveis e não vigorosas. D - Classe 4: sementes inviáveis. E - Classe 5: sementes inviáveis. F - Classe 6: sementes inviáveis.

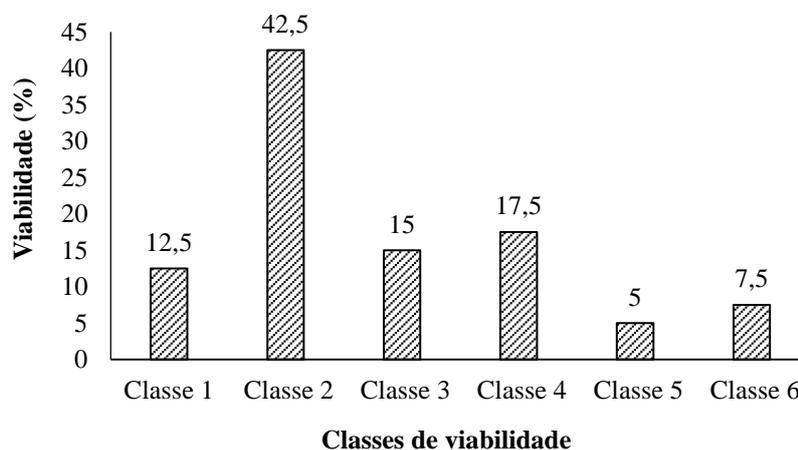


Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

Classe 1: sementes viáveis e vigorosas: apresentaram uma coloração uniforme rosa brilhante, com tecidos de aspecto normal e firme (Figura 3A). Classe 2: sementes viáveis e vigorosas, semelhante a anterior só que com pequenas manchas superficiais avermelhadas nos cotilédones e do eixo hipocótilo-radícula (Figura 3B). Classe 3: sementes viáveis e não vigorosas; apresentam coloração branco leitoso menor que 50% nos cotilédones ou tecidos em deterioração e, extremidade da radícula com coloração vermelha intenso (Figura 3C). Classe 4: sementes inviáveis, cotilédones com mais de 50% de coloração branco leitoso e eixo hipocótilo-radícula deteriorado (Figura 3D). Classe 5: sementes inviáveis, eixo hipocótilo-radícula completamente vermelho carmim intenso ou descolorido, independente dos aspectos dos cotilédones (Figura 3E). Classe 6: sementes inviáveis, embrião totalmente branco apresentando tecidos flácidos, caracterizando tecido morto e, embrião de coloração vermelho intenso, caracterizando estágio avançado de deterioração (Figura 3F).

Com base nessa classificação, foi observado que as sementes de *H. succuba* do lote avaliado pelo teste de tetrazólio, apresentaram 70% de viabilidade (classes 1 a 3), sendo que 55% estavam dentro das classes viáveis e vigorosas, classes 1 e 2 (12,5 e 42,5%, respectivamente) (Figura 4).

Figura 4. Viabilidade das sementes de *H. succuba*, submetido ao teste de tetrazólio, na concentração de 0,075%, em temperatura de 40 °C por 90 minutos.



### 3.3. Teste de germinação

Comparativamente, os resultados obtidos entre os testes de germinação (78%), critério emissão de raiz e de tetrazólio (70%), critério de viabilidade, demonstraram que as sementes de *H. succuba* apresentam boa qualidade fisiológica após 14 meses de armazenamento em câmara fria. Para o parâmetro de vigor, os resultados do teste de

germinação demonstraram valores próximos ao teste de tetrazólio, pois foi observado que 47% das sementes desenvolveram plântulas normais, enquanto que no teste de tetrazólio 55% das sementes se mostraram viáveis e vigorosas. Portanto, 22% de sementes mortas pelo teste de germinação e 30% de sementes inviáveis pelo teste de tetrazólio (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidade e vigor (%) das sementes de *H. sucuuba* Wood., avaliadas pelo teste de tetrazólio a 0,075% e teste de germinação.

Tratamentos	Característica	
	Viabilidade* (%)	Vigor** (%)
Tetrazólio	70	55
Germinação	78	47

\* Teste de tetrazólio (até classe 3). Característica de germinação (emissão de raíz).

\*\* Teste de tetrazólio (até classe 2). Característica de germinação (Formação de plântula).

Geralmente os resultados do teste de tetrazólio, se aproximam do teste de germinação ou os valores de tetrazólio são maiores Oliveira et al. (2006). De acordo com Ferreira et al. (2004), em estudos de espécies florestais as quais possuem germinação desuniforme, as médias de viabilidade entre ambos os testes diferiram em 10%.

O conhecimento dos aspectos morfológicos das sementes e plântulas é fundamental para avaliar a qualidade de um lote de sementes. A germinação das sementes *H. sucuuba* pelo critério emissão da radícula ocorreu em média, 15 dias após semeadura e a formação da plântula epígea fanerocotiledonar, ocorreu em média aos 25 dias após a semeadura. Os cotilédones apesar de não serem armazenadores, tem função de extrema importância para o estabelecimento da plântula (paracotilédones) (Figura 5A); observa-se que as reservas endospermáticas, são totalmente exauridas com a liberação do tegumento. Então, tanto o eixo hipocótilo-radícula, quanto os cotilédones injuriados podem formar plântulas anormais, comumente no sistema radicular e nas folhas cotiledonares (Figura 5B). Essas características indicam que os testes de tetrazólio e germinação combinados, concordam quanto aos resultados de viabilidade e vigor das sementes, ou seja, dependendo do dano causado ao embrião pode-se desenvolver plântula normal ou plântula anormal, característica esta reportada no teste de germinação, de um lote de sementes (BRASIL, 2009).

Figura 5. Aspectos morfológicos das plântulas de *H. sucuba*, após 25 dias da sementeira. A - plântula normal, B - plântulas anormais. eo - eófilo, hp - hipocótilo, pc - paracotilédone, rp - raiz primária, rs - raiz secundária.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L. 2018.

Dessa maneira, pode-se afirmar que os parâmetros estabelecidos para o teste de tetrazólio, são eficientes para avaliar a viabilidade de sementes de *H. sucuba*, já que se observou similaridade entre os resultados obtidos pelos testes de germinação e tetrazólio. Portanto, em caso de necessidade, para se determinar a viabilidade das sementes, sugere-se o uso do teste de tetrazólio, uma vez que os resultados são obtidos mais rápidos em relação aos testes de germinação.

#### 4. CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio na concentração de 0,075% a 40 °C durante 2 h é indicado para avaliar a viabilidade das sementes de *H. sucuba*.

Foi comprovado que sementes armazenadas em câmara fria, a 10 °C permaneceram viáveis e vigorosas por 14 meses.

## 5. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; TAKAKI, M. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith - bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. **Revista Árvore**, v. 31, n. 2, p. 54–62, 2014.
- AMARO, M.S.; MEDEIROS FILHO, S.M.; GUIMARÃES, R.M.; TEÓFILO, E.M. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (MART.) PLUMEL. – APOCYNACEAE). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n.1, p.63-71, 2006.
- BARROS, D. I.; BRUNO, R. L. A.; NUNES, H. V.; BHERING, M. C. Teste de tetrazólio em sementes de Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista ACTA Tecnológica**, v. 5, n. 2, p. 18–31, 2010.
- BARROS, D. I. **Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abóbora e abobrinha**. Viçosa: (Dissertação mestrado), 2002.
- BARROSO, G. M. et al. Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, 2004. 443 p.
- BELARMINO, K. DA S. **Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2012.
- BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F.; BARROS, D. I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, p. 176–182, 2005.
- BRASIL. Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, p. 365, 2009.
- COSTA, N.P.; FRANÇA-NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja - Série Sementes. *Circular Técnica*, n.39, 2007. 8p.
- FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L.; TONETTI, O. A.; DAVIDE, A. C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake - Leguminosae Caesalpinioideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes** 2, v. 29, n. 3, p. 83–89, 2007.
- FERREIRA, R. A.; DAVIDE, A. C.; MOTTA, M. S. Vigor e viabilidade de sementes de *Senna multijuga* ( Rich .) Irwin et Barn . e *Senna macranthera* ( Collad .) Irwin et Barn ., num banco de sementes em solo de viveiro. **Revista Brasileira de Semente**, v. 26, n. 1, p. 24–31, 2004.
- FERREIRA, C.S.; PIEDADE, M.T.F.; BONATES, L.C. Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, v.36, n.4, p. 413-418, 2006.
- FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; COSTA, N. P. Avaliação da suscetibilidade de cultivares de soja ao dano de embebição no teste padrão de germinação. **EMBRAPA - Soja**, v. 7, p. 127, 1997.

KRYZANOWSKI, F. C. K.; VIEIRA, R. D. DE B.; FRANÇA NETO, J. Vigor de sementes: conceitos e testes. In: **Vigor de sementes: conceitos e testes**. [s.l.] ABRATES, Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, Comitê de Vigor de Sementes, 1999.

MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, v.72, n.4, p.363-374, 2015.

MENDES, A. M.; BASTOS, A. A.; MELO, M. G. 2009. Padronização do teste de tetrazólio em sementes de *Parkia velutina* Benoist (Leguminosae – Mimosoideae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 823-828.

MONDO, V. H.; BRANCALION, P. H. .; CICERO, S. M.; NOVEMBRE, A. D; NETO, D. D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 177–183, 2008.

OLIVEIRA, L.; CARVALHO, M. M.; GUIMARÃES, R. M.; MASETTO, T. E. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl. E. T. impetiginosa (Martius Exa. P. de Candolle) Standley - (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 138–143, 2004.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Arvore**, v. 30, n. 1, p. 25–32, 2006.

RODRIGUES, F.C.M.; SANTOS, N. R. F. Teste de tetrazólio. In: **Manual da análise de sementes florestais**. Campinas: Fundação Cargil, 1998. p. 100.

SILVA, D.G.; CARVALHO, M.L.M.; NERY, M.C.; OLIVEIRA, L.M.; CALDEIRA, C.M. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. *Cerne*, v.17, n.1, p.1-7, 2011.

SOUSA, D.M.M.; BRUNO, R.L.A.; SILVA, K.R.G.; TORRES, S.B.; ANDRADE, A.P. Viabilidade e vigor de sementes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz pelo teste de tetrazólio. *Revista Ciência Agronômica*, v.48, n.2, p.381-388, 2017.

VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; VON PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, R.J.; OLIVEIRA, J. A. **Testes rápidos para determinação da viabilidade e da incidência de danos mecânicos em sementes de caféiro**. Lavras: [s.n.]. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000144&pid=S1413-7054201200040000500023&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000144&pid=S1413-7054201200040000500023&lng=en)>. Acesso em: 18 dez. 2018.

## **CAPÍTULO II**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE PLANTULAS DE**

***Himatanthus sucuuba* Wood**

## Propagação *in vitro* e aclimação de plântulas de *Himatanthus sucuuba* Wood

Lyanna Hellen Sáenz Ramírez<sup>1</sup>, Angela Maria Imakawa<sup>1</sup>, Suely de Souza Costa<sup>2</sup>, Maria da Glória Gonçalves de Melo<sup>1</sup>, Paulo de Tarso Barbosa Sampaio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas,

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolo para otimizar a propagação *in vitro* de *H. sucuuba*. As sementes foram imersas em solução de Cabrio Top (Piraclostrobina) 1% (v/v) por uma hora em agitador magnético e depois em solução de NaOCl diluída a 0,10% (v/v) durante 30 minutos sob agitação, seguido de imersão em álcool 70% por 1 minuto e, ao final do processo as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água destilada estéril. As sementes foram inoculadas em meio MS suplementados com as auxinas AIA, ANA e AIB, nas concentrações de 0,0; 1,0; 3,0; 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando 10 tratamentos com 3 repetições de 10 sementes (n=30). Foi observado que o meio MS suplementado com AIA (5,0 mg.L<sup>-1</sup>) resultou em 80% de germinação e plântulas com 5,97 cm de altura e 4,2 segmentos nodais. Para estimular o enraizamento, os segmentos nodais foram cortados e inoculados em meio MS acrescido de BAP (0,1 mg.L<sup>-1</sup>) e em interação com as auxinas AIA, 2,4-D e ANA, nas concentrações de 0,0; 3,0; 5,0 e 8,0 mg.L<sup>-1</sup> e, mantidos em sala de crescimento a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16 h. Aos 60 dias foram avaliados porcentagem de germinação, número de brotos por gema, presença de calos e enraizamento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e 3 repetições de 10 explantes (n=30). A combinação BAP+AIA (0,1+8,0 mg.L<sup>-1</sup>) apresentou os melhores resultados com 100% de brotações, 40% de formação de calos e 30% de enraizamento. Para a aclimação foram utilizadas 40 plântulas enraizadas *in vitro* que foram transplantadas em dois tipos de substratos (terra vegetal e vermiculita), sendo aclimatadas inicialmente no viveiro com tela sombrite de 70% por um período de 30 dias, posteriormente foi diminuído o sombreamento para 50% até os 90 dias. O substrato vermiculita apresentou 80% de sobrevivência, porém terra vegetal apresentou maior crescimento em altura (8,41cm) e diâmetro do caule (2,2mm).

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos, reguladores de crescimento, enraizamento *in vitro*, espécie medicinal, sucuuba.

## ABSTRACT

The objective of this work was to develop an adequate protocol to optimize the *in vitro* propagation of *H. sucuuba*. For germination, seeds collected in July 2016 were used, which were washed with five drops of neutral ODD® detergent and rinsed twice in running water. For disinfection, they were immersed in 1% (v/v) Cabrio Top solution for one hour on a magnetic stirrer and then in NaOH solution diluted 0.10% (v/v) for 30 minutes with stirring 70% alcohol immersion for 1 minute and at the end of the process the seeds were rinsed four times with sterile distilled water and inoculated in MS medium supplemented with the auxins AIA, ANA and AIB, at concentrations of 0.0; 1.0; 3.0; 5.0 mg/L<sup>-1</sup>. The experimental design was completely randomized, using 10 treatments with 3 replicates of 10 seeds (n = 30). The best treatment was obtained with AIA (5.00 mg.L<sup>-1</sup>), which resulted in 80% germination, 5.97 cm height and 4.2 nodal segments. For the rooting experiment, nodal segments obtained from *in vitro* germinated seedlings were harvested and inoculated in MS medium supplemented with BAP (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) and in interaction with auxins AIA, 2,4 -D and ANA at concentrations of 0.0; 3.0; 5.0 and 8.0 mg.L<sup>-1</sup>. After inoculation the nodal segments were kept in a growth room at 25 ± 2 °C, with photoperiod of 16 h. At 60 days, germination percentage, number of buds per shoot, callus presence and rooting were evaluated. The design was completely randomized, with factorial arrangement of 3x3 and a control group, totaling 10 treatments with 3 replicates (n = 30). The BAP + AIA combination (0.1 + 8.0 mg.L<sup>-1</sup>) presented the best results with 100% shoots, 40% callus formation and 30% rooting. For acclimatization, 40 *in vitro* rooted seedlings were transplanted on two types of substrates (vegetal soil and vermiculite), being initially acclimatized in the nursery with glass bottle cover for 15 days and 70% sobriety screen for 30 days and, the shading was then decreased to 50% up to 90 days. The vermiculite substrate had 80% of survival, but vegetal soil presented higher growth in height (8.41cm) and diameter of the stem (2.2mm).

**Key words:** Tissue culture, growth regulators, *in vitro* rooting, medicinal species, *sucuuba*.

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Himatanthus sucuuba* é de grande interesse na economia regional, especialmente pelo valor fitoterápico atribuído ao látex, cascas e folhas que são utilizados na medicina popular como antitumoral, antifúngico, antianêmico, vermífugo e no tratamento de gastrites e artrites (MIRANDA et al., 2000). O extrativismo praticado de maneira indiscriminada nas populações de plantas medicinais no Brasil promove tanto a destruição do seu habitat como a erosão genética das espécies, o que indica a necessidade da obtenção de mudas para o cultivo comercial e para programas de melhoramento genético, por meio de técnicas da biotecnologia vegetal (BENEDITO et al., 2012).

A propagação *in vitro* visa à produção de mudas com qualidade fitossanitária em curto espaço de tempo e cultivadas em área física reduzida, garantindo um material vegetal de qualidade superior, além da propagação clonal, o qual a torna uma ferramenta poderosa para os programas de melhoramento florestal (JUNGHANS e SOUZA, 2013). Além disso, é uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, principalmente para espécies medicinais nativas com valor farmacológico reconhecido (LIMA et al., 2007).

O sucesso de um protocolo de propagação *in vitro* pode ser influenciado por diversos fatores: como o estado fisiológico da planta matriz, a coleta de explantes e sementes, a esterilização dos meios de cultura, as condições de incubação, a manipulação de subculturas, o uso de reguladores de crescimento, o meio de cultura, dentre outros (GONZALES et al., 2004). Além disso, depende do tipo e da concentração de reguladores de crescimento, os quais se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro* (MOREIRA DIAS et al., 2001).

A composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento, sendo as auxinas e as citocininas as classes de hormônios vegetais mais utilizadas na cultura de tecidos (GEORGE e SHERRINGTON, 1984). O tipo e a concentração de reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* (HARTMANN et al. 2002).

No entanto, existe uma carência de protocolos de micropropagação de espécies florestais brasileiras, incluindo as medicinais (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). Após desenvolver técnicas para a multiplicação da espécie medicinal de interesse, pode-se

proceder à etapa de enraizamento *in vitro* para a posterior aclimatização e comercialização das mudas produzidas (MORAIS et al., 2012).

Alguns trabalhos já foram realizados para a propagação *in vitro* de *H. sucuuba*, porém não foram desenvolvidos protocolos adequados para otimizar a produção dessa espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar a germinação e o enraizamento de segmentos nodais de *H. sucuuba* utilizando diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento. Assim como estabelecer uma metodologia de aclimatação apropriada para plântulas provenientes do cultivo *in vitro*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Viveiro da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) - Manaus. Para os experimentos foram utilizadas sementes de *H. sucuuba* armazenadas por 14 meses.

### **2.2. Efeito das concentrações e tipos de auxinas no crescimento *in vitro***

Para avaliar o efeito das auxinas na germinação foram testados 10 tratamentos com 3 repetições de 10 sementes (n=30). As sementes foram lavadas com cinco gotas de detergente ODD<sup>®</sup> neutro, seguido de outros dois enxágues em água corrente. Depois foram submetidas à desinfestação por imersão em solução Cabrio Top (Piraclostrobina) 1% (v/v) por uma hora em agitador magnético, segundo metodologia de SOUZA (2017). A seguir em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à desinfestação por imersão em solução de NaOCl diluída a 0,10% (v/v) durante 30 minutos sob agitação, seguido de imersão em álcool 70% por 1 minuto. Ao final do processo, as sementes foram enxaguadas quatro vezes com água destilada autoclavada (SOUZA, 2017).

Após a desinfestação das sementes, estas foram colocadas para germinar em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS acrescidos de 30,0 g/L de sacarose e 7,0 g/L de ágar-ágar com pH ajustado para 6,0 e suplementados com as auxinas AIA, ANA e AIB, nas concentrações de 0,0; 1,0; 3,0; 5,0 mg/L. Em seguida, foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de  $2.0 \times 10^7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ , provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W), a  $25 \pm 2$  °C, com  $60 \pm 5\%$  de umidade relativa. Aos 60 dias foi avaliada a porcentagem de germinação, e após 90 dias, a

multiplicação da parte aérea foi avaliada com os seguintes parâmetros: altura da parte aérea, número de segmentos nodais e número de brotos.

### 2.3. Efeito da interação de BAP com auxinas no crescimento e enraizamento *in vitro* dos segmentos nodais

Segmentos nodais de *H. succuba* livres de contaminação foram obtidos de plântulas oriundas da germinação *in vitro* de sementes. Foram utilizados em 10 tratamentos com 3 repetições (n=30). O material asséptico foi cortado em segmentos de 1 cm e inoculados em câmara de fluxo laminar, individualmente, em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio de cultura MS acrescido de 30,0 g/L de sacarose e 7,0 g/L de ágar-ágar com pH ajustado para 6,0. Foi adicionada a citocinina BAP como regulador de crescimento a 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, conforme Souza (2017), em combinação com as auxinas AIA, 2,4-D, e ANA, nas concentrações de 0,0; 3,0; 5,0 e 8,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 1).

Tabela 1. Interação de BAP com as auxinas AIA, 2,4-D e ANA em meio MS para a indução de enraizamento *in vitro* de segmentos nodais de *H. succuba* Wood.

Tratamento	Regulador de crescimento	Concentrações (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de unidades experimentais/tratamento
T1	Controle	0,0	30
T2	BAP + AIA	0,1 + 3,0	30
T3		0,1 + 5,0	30
T4		0,1 + 8,0	30
T5		0,1 + 3,0	30
T6	BAP + 2,4-D	0,1 + 5,0	30
T7		0,1 + 8,0	30
T8		0,1 + 3,0	30
T9	BAP + ANA	0,1 + 5,0	30
T10		0,1 + 8,0	30

Após a inoculação os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento a 25±2 °C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 2.0x10<sup>7</sup> µE.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-2</sup>, provenientes de lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W). Após 60 dias foram avaliados porcentagem, número de brotos por gema, presença de calos e enraizamento.

#### **2.4. Aclimação das plântulas originadas do cultivo *in vitro***

Para a aclimação foram utilizadas 40 plântulas transplantadas em dois tipos de substratos: T1 - terra vegetal (terriço + terra compostada +palha de arroz) e T2 - vermiculita, sendo cada tratamento composto por duas repetições de dez plântulas. Os substratos foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. As plântulas com raízes obtidas da propagação *in vitro*, foram lavadas duas vezes com água destilada até se retirar totalmente os resíduos de meio de cultura, depois foram transplantadas nos substratos em bandejas de polietileno com células individuais de 34 x 21 x 6 cm (comprimento, largura e altura).

Após o transplante para as bandejas, as plântulas foram individualmente cobertas com frascos de vidro transparente por 15 dias e permaneceram no viveiro com tela sombrite 70% por 30 dias. Posteriormente, por mais 60 dias consecutivos foram aclimatados com tela sombrite 50%. As plantas foram molhadas diariamente por sistema de aspersão. Ao final do experimento foram avaliadas a taxa de sobrevivência, altura (cm), diâmetro do caule (mm) e o desenvolvimento das raízes.

#### **2.5. Delineamento experimental e análise estatística**

A normalidade dos dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os tratamentos foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido por teste de Tukey. Todos os testes foram analisados ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram conduzidas no programa MINITAB 18.

Os dados de aclimação foram analisados utilizando o programa Sigma Plot V. 14 o modelo foi ajustado em um polinômio de segundo grau.

### **3. RESULTADOS E DISCUÇÃO**

#### **3.1. Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxinas no crescimento *in vitro***

Para promover a germinação *in vitro* de *H. succuba*, as concentrações dos reguladores de crescimento apresentaram diferença significativa em todos os tratamentos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de AIA, ANA e AIB na germinação média de sementes por tratamento aos 60 dias de inoculação em meio MS, e crescimento *in vitro* das plântulas avaliado aos 5 meses: altura, número de segmentos nodais e número de brotos de *H. succuba*.

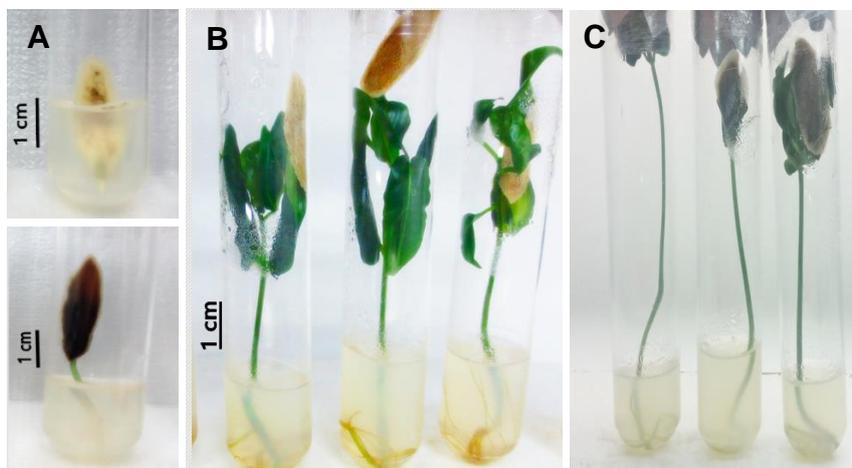
Tratamento	Reguladores de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )	Germinação (%) <sup>*</sup>	Altura (cm)	Número de segmentos nodais <sup>**</sup>	Número de brotos
T1	0,0	40,0 abc	3,83 bc	1,00 d	1,00 a
T2	AIA (1,0)	73,33 a	5,69 ab	2,53 ab	1,00 a
T3	AIA (3,0)	66,67 ab	5,73 ab	2,17 abc	1,17 a
T4	AIA (5,0)	80,00 a	5,97 a	4,23 a	1,00 a
T5	ANA (1,0)	16,67 c	4,30 abc	1,17 cd	1,00 a
T6	ANA (3,0)	10,00 c	3,58 c	1,33 bcd	1,00 a
T7	ANA (5,0)	10,00 c	4,25 abc	1,17 cd	1,00 a
T8	AIB (1,0)	13,33 c	4,39 abc	1,44 bcd	1,00 a
T9	AIB (3,0)	26,67 bc	4,51 abc	1,17 cd	1,00 a
T10	AIB (5,0)	20,00 c	5,63 ab	2,00 bcd	1,17 a

\* Dados transformados para asen  $(x/100)^{1/2}$ ; \*\* LogNatural(1+x)

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao 5%

Os tratamentos acrescidos de ANA e AIB, apresentaram germinação tardia e não uniforme a partir de 30 dias, em comparação com o AIA que iniciou aos 16 dias, promovendo as melhores taxas de germinação em todas as concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>), sendo obtido melhor resultado no T4: AIA 5,0 mg.L<sup>-1</sup> com 80% de germinação (Figura 1A). Após 90 dias de cultura, a parte aérea se desenvolveu com altura média de 5,97 cm e número de segmentos nodais de 4,23, produzindo mudas com raízes e brotos totalmente desenvolvidos (Figura 1B). Os outros tratamentos apresentaram alongamento excessivo do hipocótilo interrompendo o crescimento e a formação dos segmentos nodais (Figura 1C). Souza (2017), obteve 90% de germinação de sementes após 45 dias de inoculação em meio MS sem adição de hormônios, sendo que nenhuma das plântulas germinadas *in vitro* apresentaram desenvolvimento adequado, o que corrobora os resultados obtidos e demonstra a necessidade do uso de reguladores de crescimento para a multiplicação de *H. succuba* na propagação *in vitro*.

Figura 1. Cultivo *in vitro* de *H. sucuuba*. A-Sementes germinadas após 20 dias de cultivo; B-Plântulas desenvolvidas após 90 dias da germinação; C-Plântulas não desenvolvidas após 90 dias da germinação.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

Para outras espécies da família Apocynaceae, Cordeiro et al. (2014), obteve 61% de germinação em sementes de *Mandevilla moricandiana*, após 3 meses de cultivo em meio MS sem adição de hormônios, sendo que as plântulas desenvolveram a parte aérea, mas as raízes não se formaram. Ferreira et al. (2006), verificou que a germinação de sementes de *H. sucuuba* em condições naturais, ocorreu em um período de 15 dias, o que se assemelha com o resultado obtido neste estudo da germinação *in vitro* para a espécie, porém o desenvolvimento da plântula ocorre de maneira lenta. ÖZ et al.(2008) verificou que sementes de *Amsonia orientalis* quando inoculadas em meio MS sem reguladores de crescimento possuem germinação lenta e desuniforme, e uma frequência de germinação em torno de 15%.

Em estudos de germinação de *Hancornia speciosa* Gomes sob diferentes condições de cultura *in vitro*, Lemos (2003) alcançou 62% e, Sousa et al. (2005) obteve 70% em meio MS sem reguladores de crescimento. Pinheiro et al. (2001) obtiveram, aproximadamente, 75% de germinação em meio MS suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA3. Desta maneira pode-se corroborar a importância da adição de reguladores de crescimento no meio MS para a germinação e o posterior desenvolvimento das plântulas.

### 3.2. Efeito da interação de BAP com auxinas no crescimento e enraizamento *in vitro* dos segmentos nodais

No experimento utilizando diferentes combinações e concentrações da citocinina BAP com diferentes auxinas, observou-se que as variáveis avaliadas apresentaram diferenças significativas. Em relação ao número de brotos, o melhor resultado foi obtido BAP + AIA (0,1+3,0 mg.L<sup>-1</sup>) que apresentou 1,25 brotos por explante, seguido de BAP + AIA (0,1+8,0 mg.L<sup>-1</sup>) com 1,15. Entretanto quanto ao desenvolvimento da altura do broto, diferindo dos demais tratamentos, obteve-se o maior comprimento com a utilização de AIA na concentração de 8,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3).

Tabela 3. *H. succuba* após 60 dias de inoculação em meio MS suplementado com BAP em interação com AIA, 2,4-D e ANA. B- brotações, C- calos, E- enraizamento

Tratamento	Reguladores de crescimento (mg/L <sup>-1</sup> )	B*	C	E	Nº de brotos **	Altura do broto (cm)
		%				
T1	Controle	76,6 b	6,67 c	0,0 c	1,03 b	0,42 b
T2	BAP+AIA (0,1 + 3,0)	100 a	20,0 bc	20,0 ab	1,25 a	0,68 ab
T3	BAP+AIA (0,1 + 5,0)	85 ab	20,0 bc	10,0 bc	1,00 b	0,73 ab
T4	BAP+AIA (0,1 + 8,0)	100 a	40,0 b	30,0 a	1,15 ab	1,25 a
T5	BAP+2,4-D (0,1 + 3,0)	0,0 c	100,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b
T6	BAP+2,4-D (0,1 + 5,0)	0,0 c	100,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b
T7	BAP+2,4-D (0,1 + 8,0)	0,0 c	100,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b
T8	BAP+ANA (0,1 + 3,0)	6,5 c	90,0 a	0,0 c	0,1 c	0,7 ab
T9	BAP+ANA (0,1 + 5,0)	5,0 c	95,0 a	0,0 c	0,05 c	0,4 ab
T10	BAP+ANA (0,1 + 8,0)	0,0 c	90,0 a	0,0 c	0,0 c	0,0 b

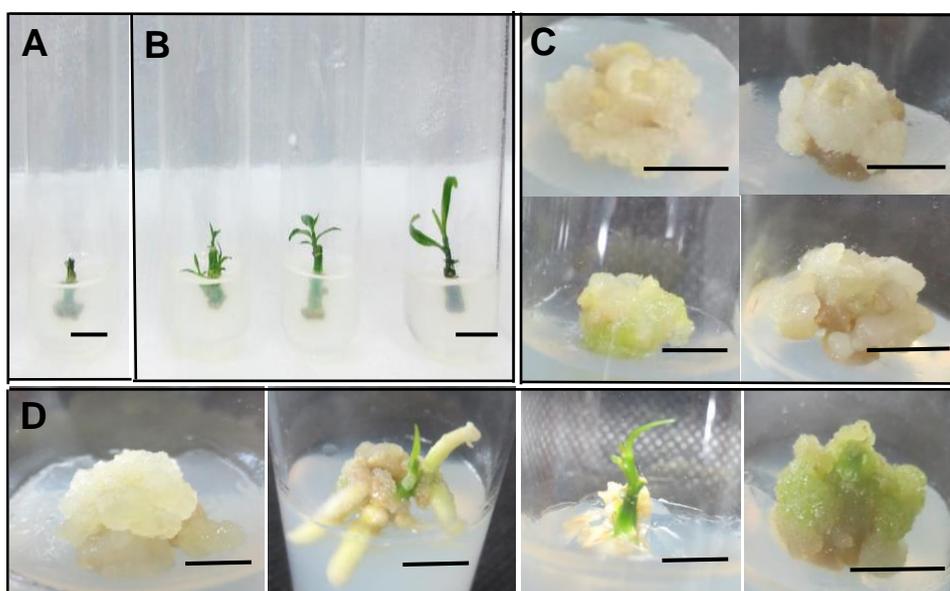
\* Dados transformados para asen  $(x/100)^{1/2}$ ; \*\* LogNatura(1+x)

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao 5%

Os tratamentos que responderam com a maior formação de brotações, foram BAP + AIA (0,1+3,0 mg.L<sup>-1</sup>) e BAP + AIA (0,1+8,0 mg.L<sup>-1</sup>), em ambos apresentando 100% de brotações, seguido de BAP + AIA (0,1+5,0 mg.L<sup>-1</sup>) com 85%, e o controle com 76,6% (Figura 2 A,B). A interação de BAP + 2,4-D em todos os tratamentos obteve-se 0% de brotações, devido ao fato dos segmentos nodais formarem 100% de calos (Figura 2C). Observou-se, ainda, que a interação favoreceu a formação de calos com diferenças na

pigmentação e a presença de calos friáveis, nos segmentos nodais. A interação BAP + ANA resultou em baixa porcentagem de brotações, além de apresentar rizogênese (Figura 2D). Este comportamento pode ser atribuído ao balanço hormonal entre as concentrações utilizadas de auxina e citocinina que poderiam ter favorecido a calogênese, interferindo diretamente no desenvolvimento de brotos e da parte aérea.

Figura 2. Brotações de *H. sucuuba* a partir de segmentos nodais, inoculados em meio MS, com BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup> suplementado com diferentes concentrações de AIA, 2,4-D e ANA após 45 dias de cultivo. A-T1, sem brotações; B-brotações nas interações BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+AIA; C- calos formados na interação BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+2,4-D; D- calos e rizogênese formados na interação BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup>+ANA.



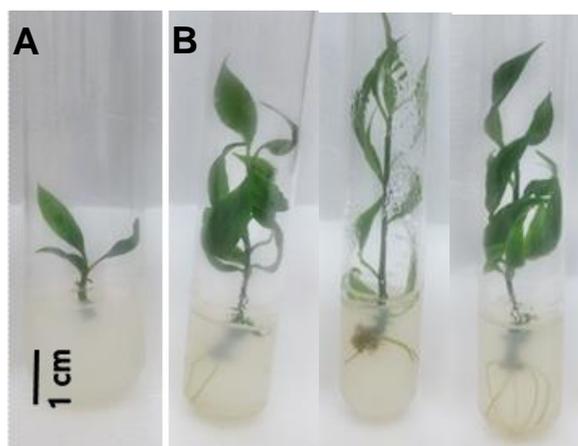
Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

A formação de calos nos explantes, seja este do tipo segmento nodal ou ápice caulinar, é muito comum em espécies lenhosas (SOARES et al., 2007). Grattapaglia et al. (1998) afirmam que, quantidades excessivas de auxina podem causar a formação de calos nos explantes, comprometendo a rizogênese e o crescimento de partes aéreas. Nesse sentido, pode-se inferir que as respostas obtidas no presente estudo corroboram aos realizados por de Oliveira et al. (2016) e ÖZ et al. (2008) com a espécie *Hancornia speciosa* Gomes e *Amsonia orientalis* Decne, respectivamente, ao afirmarem que a combinação de BAP + ANA utilizadas em segmentos nodais, fomenta a elevada formação de calos. Verma et al. (2012), constataram que, a interação de BAP + ANA (0.5 + 1.0mg.L<sup>-1</sup>) promoveu 59,0% de calos em explantes foliares de *Catharanthus roseus*.

Brum et al. (2002) observaram melhores os resultados para o comprimento das brotações e número total de brotos de *Ficus carica* L., quando utilizaram BAP. Singh et al. (2011), constataram que a interação de BAP + AIA (1,5 + 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) promoveu 86% de brotações. Entretanto, neste mesmo experimento foram obtidos baixos índices de brotações na interação de BAP + ANA. Resultados similares foram encontrados por De Oliveira et al. (2016) e Harisaranraj et al. (2009), que, ao estudarem o efeito conjugado de BAP e ANA em explantes de *Hancornia speciosa* Gomes e *Rauvolfia tetraphylla* respectivamente, verificaram que a interação promoveu o baixo índice de brotações nos explantes, e além disso, essas brotações não se desenvolveram satisfatoriamente. De acordo com Chenget al. (2013), a interação entre baixas concentrações de auxinas e concentrações mais elevadas de citocininas pode favorecer a indução de brotações, por estimular mais ainda as divisões celulares, fato que não aconteceu com *H. sucuuba*.

Os tratamentos que apresentaram formação de raízes e mostraram diferença significativa foram somente a interação de BAP + AIA, nas concentrações 0,1 + 3,0 mg.L<sup>-1</sup>; 0,1 + 5,0 mg.L<sup>-1</sup>; 0,1 + 8,0 mg.L<sup>-1</sup> resultaram em 10%, 20% e 30% de enraizamento aos 5 meses de cultivo, respectivamente (Figura 3B), e nenhum outro explante dos demais tratamentos apresentaram raízes (Figura 3A).

Figura 3. Enraizamento de segmentos nodais de *H. sucuuba* cultivados em meio MS, aos 5 meses de cultivo. A-Segmento nodal com brotação e sem raiz (controle), B-Segmento nodal com raízes e brotações.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L.(2018).

Resultados diferentes foram observados por Cordeiro et al. (2014) em *Mandevilla guanabara*, quando ao inocular segmentos nodais em meio MS sem adição de hormônios obtiveram 51% de enraizamento. Esses resultados mostram a necessidade de um balanço citocinina/auxina adequado para o enraizamento dos segmentos nodais de *H. succuba*.

Soares et al. (2007) relataram que as doses de ANA utilizadas para a formação de raízes em brotações de *Hancornia speciosa* Gomes, cultivadas *in vitro*, não proporcionou enraizamento. As respostas das auxinas, no entanto, não são universais. Certas espécies, principalmente as lenhosas, enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo na presença de auxinas (ROHR, 1987). Na iniciação de culturas lenhosas é comum a ocorrência de compostos fenólicos, mesmo quando se empregam tecidos muito jovens como plântulas geradas por germinação *in vitro*, que podem estar ligadas a processos de regulação do crescimento, especialmente às auxinas, que dependendo da concentração endógena no tecido induzem a síntese desses compostos (TEIXEIRA, 2006).

Souza (2017), em estudos com a mesma espécie, constatou que a adição de BAP a 0,1 mg.L<sup>-1</sup> promoveu significativamente o número de brotações, porém sem a formação de raízes. Por outro lado, testou auxinas AIA, ANA e AIB e obteve a formação de raízes após 45 dias, sendo que a utilização de AIA nas concentrações de 3,0 e 5,0 mg/L<sup>-1</sup>, resultou em 10,33% e 20%, respectivamente, ambos considerados muito baixos. Os resultados demonstram e confirmam a essencialidade da interação de reguladores de crescimento para a eficiência na multiplicação de explantes de *H. succuba*.

### **3.3. Aclimação das plantas micropropagadas**

A aclimação é um procedimento crítico de todo protocolo de micropropagação. Se as condições ambientais e a elaboração do substrato não forem cuidadosamente controladas, corre-se o risco de perder grande quantidade de plantas e, conseqüentemente frustrar todo o trabalho de meses (ROCHA, 2013).

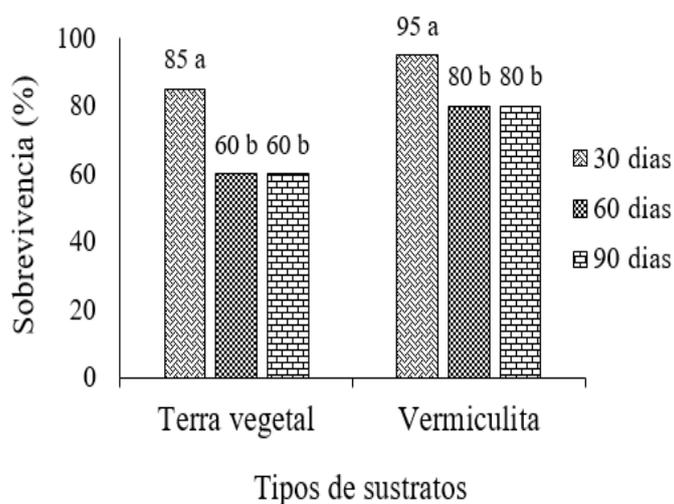
Os resultados de plântulas enraizadas *in vitro* (Figura 4) foram analisados estatisticamente e revelou que houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os substratos avaliados, quanto à porcentagem de sobrevivência após 30, 60 e 90 dias do transplante. O substrato vermiculita proporcionou o maior percentual de sobrevivência (80%), porém somente houve diferença significativa no primeiro mês. Ainda verificou-se que o menor percentual de sobrevivência ocorreu no substrato terra vegetal (60%). Além disso pode-se verificar uma queda da sobrevivência de plantas aclimatadas de 85% para 60% nos 60 dias de aclimação e manteve-se até os 90 dias (Figura 4).

Figura 4. Plântulas de *H. sucuuba* enraizadas *in vitro* e preparadas para o transplante nos substratos e aclimação em viveiro.



Imagens: Sáenz-Ramírez. L. (2018).

Figura 5. Sobrevivência de plântulas de *H. sucuuba* em dois tipos de substratos (terra vegetal e vermiculita), após 30, 60 e 90 dias de aclimação em viveiro.



Para a aclimação das plântulas de *H. sucuuba* o melhor substrato foi a vermiculita, que proporcionou melhor índice de sobrevivência, após 90 dias de aclimação, porém as plântulas não se desenvolveram vigorosamente, quando comparada com a terra vegetal, que proporcionou mais recursos nutricionais.

Verificou-se também que a proteção das plântulas com frascos de vidro foi eficiente nos primeiros dias, visto que permitiu abrandar as condições iniciais críticas para a aclimação. Uma planta que se originou *in vitro*, difere em muitos aspectos daquela que é formada *in vivo*, desde que suas condições ambientais e de substrato, luz, nutrição, são muito

diferentes (PIERIK, 1990). Portanto, eles devem ser aclimatados às condições de umidade e luz, diminuindo gradualmente a umidade e aumentando gradualmente a intensidade da luz (CARO, 2004).

Deste modo, pode-se aferir que estas grandes diferenças de índices de sobrevivência ocorreram devido à capacidade de retenção de água no solo por parte da vermiculita. Conforme Hartmann et al. (2004), o substrato deve proporcionar adequado equilíbrio de umidade, aeração, consistência, nutrientes, e ausência de patógenos para o bom desenvolvimento da muda. Harisaranraj et al. (2009), constataram 100% de sobrevivência de *Rauvolfia tetraphylla* no primeiro mês de aclimação utilizando uma mistura de solo. De Oliveira et al. (2003), observaram que plântulas de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. enraizadas *in vitro* foram aclimatadas numa mistura de solo em um período de 15 dias. Diversos estudos reportam que o sucesso da fase de aclimação está diretamente relacionado a plântulas que apresentam raízes bem desenvolvidas *in vitro* (BIONDO et al., 2007; LÉDO et al., 2007; SILVA et al., 2008; SUNGKUMLONG e DEB, 2009), o qual foi comprovado com a espécie *H. succuba*.

Em relação ao crescimento em altura e diâmetro das plantas de *H. succuba*, ajustou-se a um modelo quadrático, e observou-se comportamentos diferentes nos dois tratamentos. Quanto ao crescimento em altura após 60 e 90 dias, o substrato terra vegetal proporcionou o maior crescimento (8,41 cm), e verificou-se que o menor crescimento (6,87 cm) ocorreu na vermiculita, após 90 dias de aclimação (Figura 6A).

Nessa mesma figura, pode-se verificar que o crescimento em diâmetro foi maior na terra vegetal em todos os períodos avaliados. Foi possível observar também o desenvolvimento das raízes em cada um dos tratamentos, constatando-se melhor desenvolvimento na terra vegetal (Figura 6B). Ainda não existem trabalhos realizados na fase de aclimação *ex vitro* de plantas de *H. succuba*, motivo pelo qual não ser possível avaliar comparativamente.

Figura 65. Crescimento em altura e diâmetro das plantas de *H. sucuuba* avaliados aos 30, 60 e 90 dias de idade, durante as etapas de aclimação em viveiro em função dos tratamentos terra vegetal e vermiculita.

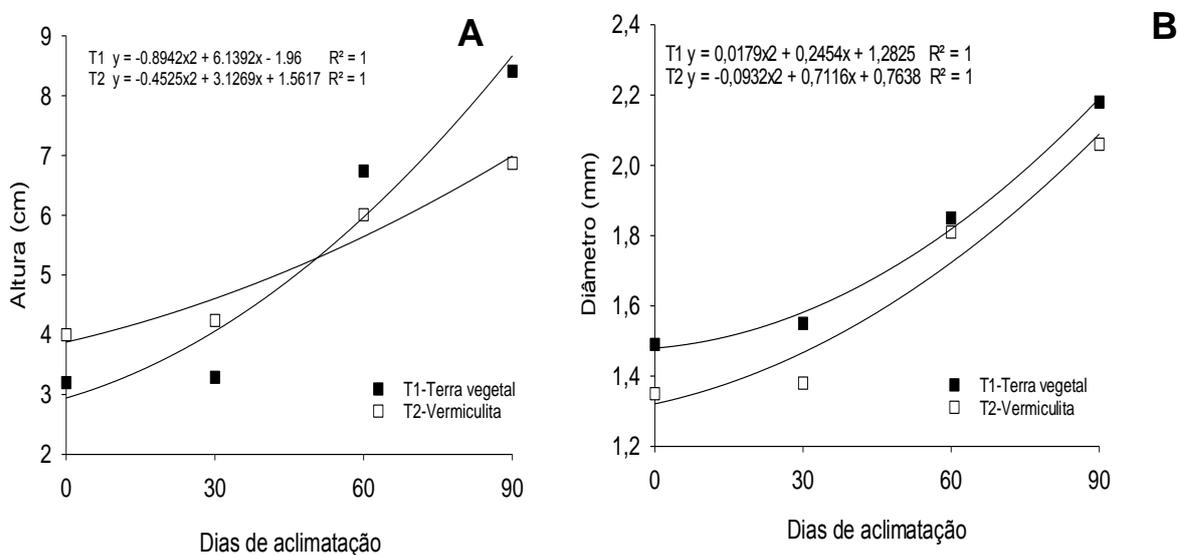
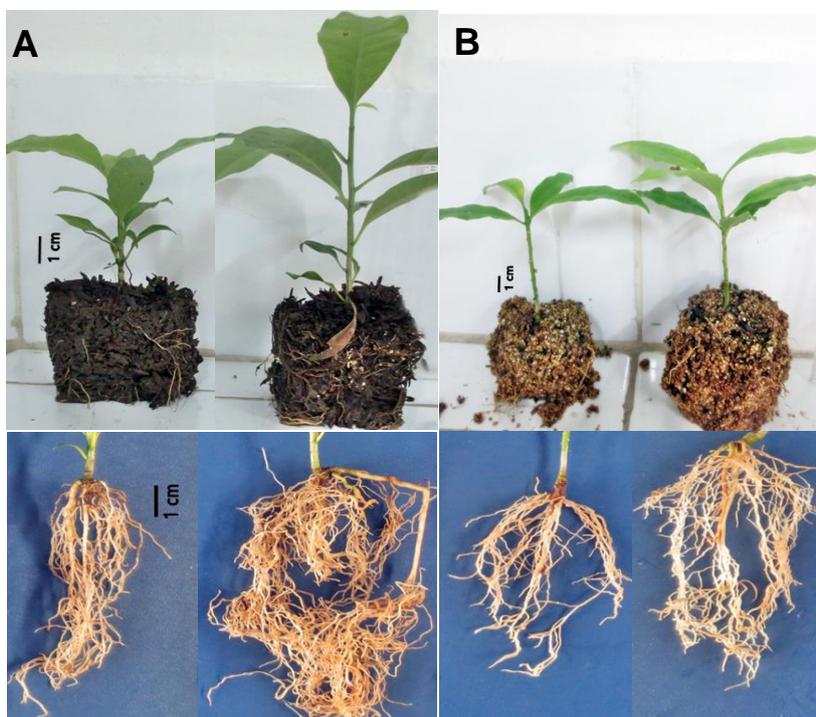


Figura 76. Comparação de crescimento das plantas propagadas *in vitro* de *H.sucuuba* aos 60 e 90 dias do período de aclimação em viveiro. A-terra vegetal; B-vermiculita.



Imagens: Sáenz-Ramírez, L. (2018).

#### 4. CONCLUSÃO

A melhor auxina para o crescimento das plântulas de *H. succuba* foi AIA na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>.

A interação de BAP + AIA (0,1+8,0 mg.L<sup>-1</sup>) induziu o melhor enraizamento dos segmentos nodais.

A aclimação das plântulas micropropagadas de *H. succuba* em viveiro, apresentou melhor resultado no substrato terra vegetal.

#### 5. REFERÊNCIAS

BIONDO, R.; SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; SOARES, A.M.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagation, seed propagation and germoplasm bank of *Mandevilla velutina* (Mart.). **Scientia Agricola**, v. 64, n.3, p. 263-268, 2007.

BENEDITO, C. P.; DE COELHO, MARIA F.B.; GUIMARÃES, I. P.; DO AMARAL JUNIOR, V. P.; MAIA, S. S.S.; BATISTA, P. F. Emergência e crescimento inicial de plântulas de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 3, p. 508–513, 2012.

BRUM, G.R.; SILVA, A.B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência agrotecnica**, Lavras, p.1403-1409, dez., 2002.

CARO, M. (2004). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Bogotá. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia.

CHENG, Z. J.; WANG, L.; SUN, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, C.; SU, Y. H.; LI, W.; SUN, T. T.; ZHAO, X. Y.; LI, X. G.; CHENG, Y.; ZHAO, Y.; XIE, Q.; ZHANG, X. S. Patern of auxin and cytokinin responses for shoot meristema induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin responses factor 3. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, n. 1, p. 240-251, 2013.

CORDEIRO, S. Z. et al. Micropropagation and callogenesis in *Mandevilla guanabara* (Apocynaceae), an endemic plant from Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 108–115, 2014.

DE OLIVEIRA, ARILDO, J. B.; CARVALHO, V. M.; FERREIRA, A.; SATO, F. Y.; MACHADO, F. P. S. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. **Árvore**, v. 27, p. 421–425, 2003.

DE OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. DE M.; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Floresta**, v. 46, n. 3, p. 335–342, 2016.

FERREIRA, C. S., PIEDADE, M. T. F., BONATES, L. C. Germinação de Sementes e Sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce), **Acta Amazonica**, 2006.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, p.709, 1984.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L. S., BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-260, 1998.

GONZALES, S R.; LOZANO, J.G.; ROJAS, H. J. Propagación asexual de plantas: conceptos basicos y experiencias com especies amazónicas., p. 55. 2004.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 880 p. 2002.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR, GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New York: Prentice Hall, 8.ed. 880p, 2004.

HARISARANRAJ, R.; SURESH, K.; SARAVANABABU, S. Rapid Clonal Propagation *Rauvolfia tetraphylla* L. **In Vitro**, v. 2, n. 3, p. 195–198, 2009.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, S. A. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. p. 407, 2013.

LEMO, E. E. P. de. Estratégias para a multiplicação clonal da mangabeira em Alagoas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DA MANGABA, 1, 2003, Aracaju. **Anais**. Aracaju: Embrapa-CPATC/MAPA, 2003.

LÉDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOZA, S. B.S. C.; VIEIRA, G.S.S.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n. 2, p. 147-154, 2007.

LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M. V.; BENITZ, L.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 669–671, 2007.

MIRANDA, A. L.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; DA CUNHA PINTO, A. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 284–286, 2000.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F. SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais (revisão) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 14, n.1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of *Troyer citrange*. **Scientia Horticulturae**, v.87, p.275-290, 2001.

OLIVEIRA, L. S. DE; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013.

ÖZ, G. C. et al. In vitro propagation of *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3638–3641, 2008.

PIERIK, R. *In vitro*. Culture of higher plants. Holland. Kluwer Academic Publisher. 1990.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALOUFA, M. A. I. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 413-416, ago. 2001.

ROHR, R.; HANUS, D. Vegetative propagation of wavy grain sycamore maple. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 17, n. 5, p. 418-420, 1987.

ROCHA, H.S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T.G & SOUZA, A.S. (eds.) **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2 ed.rev. e amp., Brasília, DF: Embrapa, p. 133-164, 2013.

SINGH, R. .; KHARB, P. .; RANI, K. Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus in vitro* using different explants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 699–704, 2011.

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

SOUZA, K. P. **Propagação *in vitro* de *Himatanthus sucuuba* Wood, uma espécie medicinal da Amazônia**. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Amazonas, 59 p. 2017.

SOUSA, C. S.; SILVA, S. A.; COSTA, M. A. P. C. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Revista Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 29-31, set. 2005.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e agrotecnologia**. v. 31, n. 4, p. 1048-1053, 2007.

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

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: <<http://www.redbio.org>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

VERMA, A. K.; SINGH, R. R.; SINGH, S. Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. **Botanica Serbica**, v. 36, n. 2, p. 123–130, 2012.

### **CAPITULO III**

**ESTABELECIMENTO DE CULTURA DE CALOS DE *Himatanthus*  
*sucuuba* E ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS**

## Estabelecimento de cultura de calos de *Himatanthus sucuuba* e análise fitoquímica dos extratos

Lyanna Hellen Sáenz Ramírez<sup>1</sup>, Cecilia Veronica Nunez<sup>2</sup>, Angela Maria Imakawa<sup>1</sup>, Paulo de Tarso Barbosa Sampaio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas,

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil

### RESUMO

A cultura de calos é uma das técnicas da propagação *in vitro*. A partir da calogênese é possível estimular a produção de metabólitos secundários *in vitro*. Este trabalho objetivou estabelecer protocolo para a indução de calos friáveis de explantes foliares e caulinares de *H. sucuuba*. Os explantes de plântulas cultivadas *in vitro* foram inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D (2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) em combinações de BAP e TDZ (2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>). Os calos friáveis formados durante o cultivo foram inoculados em meio MS com adição de 2,4-D + TDZ (2,0 + 4,0; 4,0 + 2,0; 1,0 + 1,5 mg.L<sup>-1</sup>). Após a inoculação permaneceram em sala de crescimento na presença de luz (fotoperíodo de 16 h) e escuro, a 25±2 °C. Após 30 dias foram avaliados a porcentagem de sobrevivência, o tipo de calo e a textura. O tratamento 2,4-D + TDZ (1,0+1,5 mg.L<sup>-1</sup>) de explantes foliares induziu 73,33% de calos friáveis no escuro, enquanto que em 2,4-D + TDZ (4,0+2,0 mg.L<sup>-1</sup>) de explantes caulinares induziu 76,67% de calos friáveis na presença de luz. Os extratos metanólicos obtidos de calos friáveis foram analisados em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H). A análise permitiu observar a presença de substâncias fenólicas (por meio da intensificação das manchas quando a placa foi revelada com NP-PEG e a presença de sinais entre 6 e 8 ppm no espectro de RMN de <sup>1</sup>H), açúcares (pela presença de sinais entre 3 e 4 ppm no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e os sinais anoméricos em 4,09 ppm (*d*, *J* = 8 Hz, açúcar com configuração beta) e 5,16 ppm (*d*, *J* = 3,5 Hz, açúcar com configuração alfa). Também há indícios de terpenoides (manchas arroxeadas quando a placa foi revelada com anisaldeído e sinais em 5,3 ppm e singletos entre 0,6 e 1 ppm presentes no espectro de RMN de <sup>1</sup>H).

**Palavras-chave:** Calogênese, metabólitos secundários, cultura *in vitro*, cromatografia, sucuuba.

## ABSTRACT

Callus culture is one of the techniques of *in vitro* propagation. By the calogenesis it is possible to stimulate the secondary metabolites production *in vitro*. This work aimed to establish a protocol for the induction of friable callus of *H. sucuuba* leaf and stem explants. Explants from seedlings cultured *in vitro* were inoculated in MS medium supplemented with 2,4-D (2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup>) in combinations of BAP and TDZ (2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup>). The friable calli formed during cultivation were inoculated in MS medium with addition of 2,4-D + TDZ (2.0 + 4.0, 4.0 + 2.0, 1.0 + 1.5). After inoculation they remained in the growth room in the presence of light (photoperiod of 16 h) and dark, at 25 ± 2°C. After 30 days were evaluated: percentage of survival, type of callus and texture. The treatment of 2,4-D + TDZ (4.0 + 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) of leaf explants cultivated in the presence of light presented 76.67% of friable calli, while in the 2,4-D + TDZ treatment (1.0 + 1.5 mg.L<sup>-1</sup>) of stem explants in the dark was obtained 73.33%. The methanolic extracts obtained from friable calli were analyzed by comparative thin layer chromatography (TLC). The presence of phenolic, steroid and terpenoid groups was observed. By means of the analysis of the nuclear magnetic resonance of hydrogen (<sup>1</sup>H NMR) signs in the region of the aromatic ones that can indicate the presence of flavonoides and iridoides for both extracts.

**Key words:** Calogenesis, secondary metabolites, *in vitro* culture, chromatography, *sucuuba*.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais desempenham importante papel na saúde mundial, tornando imprescindível a realização de estudos no âmbito farmacológico, terapêutico e agrônomico, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies (MORAIS et al., 2012). A planta produz substâncias químicas previamente isoladas que são iridoides encontradas no caule e no látex, como plumericina e isoplumericina que comprovaram atividade contra o carcinoma nasofaringe, além disso o látex apresenta propriedades terapêuticas, ação anti-inflamatória e analgésica (MIRANDA et al., 2000).

A utilização da cultura de células e tecidos vegetais *in vitro* tem potencial para promover a multiplicação sistematizada de plantas elite por meio da micropropagação (MORAIS et al., 2012), atendendo assim, à crescente demanda da indústria farmacêutica devido a que o cultivo *in vitro* de células em suspensão pode ser empregado na produção de metabólitos secundários relevantes do ponto de vista terapêutico (LIMA, 2008; MORAIS et al., 2012). Dessa forma, a cultura de tecidos tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primários e secundários, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes. Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

O calo é um tecido produzido em resposta a uma injúria física ou química. Nem todas as células em um explante contribuem para a formação de calos (PINTO e LAMEIRA, 2001). Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo Rey et al. (1980), o tipo de calo formado em um determinado explante, seu grau de diferenciação celular depende, principalmente do explante, meio de cultura e dos fitorreguladores adicionados. As auxinas propiciam um calo mais friável, enquanto que as citocininas calos mais firmes. A concentração dos reguladores de crescimento influencia o desenvolvimento da cultura de calos *in vitro*. Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie (LAMEIRA et al., 1994).

Também podem diferir em textura, consistência e coloração. Alguns calos são friáveis e crescem vigorosamente outros são compactos e mais difíceis de manipular (FLORES et al., 2006). Os calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, de grande interesse comercial (REBOUÇAS & ALMEIDA, 2009).

Este trabalho teve por objetivo desenvolver protocolo para indução de calos friáveis e identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos de *H. sucubba*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) – Manaus. As análises fotoquímicas dos calos foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB), do INPA.

### **2.2. Efeito de 2,4-D em interação com TDZ e BAP na indução de calos friáveis em explantes foliares**

Explantes foliares de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, foram excisados de plântulas estabelecidas *in vitro* com auxílio de pinça e bisturi em câmara de fluxo laminar (Figura 1A e B). Os explantes foram cultivados em frascos de vidro (Figura 1C) contendo 25 mL de meio de cultura MS, com 0,7% de ágar e 3% de sacarose, suplementado com concentrações de 2,4-D (2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>), em interação com BAP e TDZ (2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) e suas combinações (Tabela 1). O pH foi ajustado para 6,0 antes da autolavagem a 120 °C por 20 minutos. Os frascos permaneceram na sala de crescimento inicialmente no escuro por 7 dias e depois foram colocados em ambiente com fotoperíodo de 16 horas, a 25±2 °C, e umidade relativa de 60±5%. Após 30 dias da inoculação, avaliaram-se a sobrevivência, porcentagem de calos, textura e coloração dos calos (verde claro, verde-escuro, amarelo, marrom e esbranquiçado).

Figura 1. Procedimento para preparação de explantes foliares de *H. succuba*. A-Retirada de folhas de plântula cultivada *in vitro*; B-Corte dos explantes foliares; C-Inoculação dos explantes em frascos com meio de cultura MS.



Imagens: Sáenz-Ramírez (2018).

Tabela 1. Tratamentos para indução de calos em explantes foliares de *H. succuba*

Tratamento	Regulador de crescimento	Dose de reguladores de crescimento (mg.L <sup>-1</sup> )	Número de unidades experimentais/tratamento
T1	Controle	0,0	30
T2	2,4 D + BAP	2,0 + 2,0	30
T3		2,0 + 4,0	30
T4		4,0 + 2,0	30
T5		4,0 + 4,0	30
T6		2,0 + 2,0	30
T7	2,4 D + TDZ	2,0 + 4,0	30
T8		4,0 + 2,0	30
T9		4,0 + 4,0	30

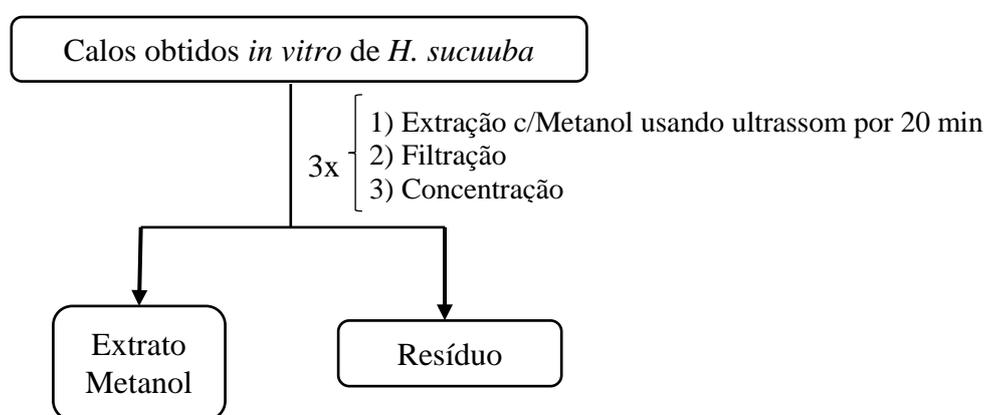
### 2.3. Efeito dos reguladores de crescimento na presença ou ausência de luz para indução de calos friáveis

Calos friáveis obtidos do cultivo da interação 2,4-D + TDZ do experimento anterior foram subcultivados em frascos de vidro nas concentrações (2,0 + 4,0; 4,0 + 2,0; 1,0 + 1,5mg L<sup>-1</sup>). Incluindo-se também calos friáveis obtidos de explantes caulinares (BAP + 2,4-D) mencionados no capítulo II. Após a inoculação permaneceram em sala de crescimento à temperatura de 25±2 °C, umidade relativa de 60±5 %, em duas condições: na ausência ou presença de luz (fotoperíodo de 16 h). Após 30 dias, avaliaram-se a sobrevivência, porcentagem de calos, textura e coloração dos calos (verde claro, verde-escuro, amarelo, marrom e esbranquiçado).

## 2.4. Extração dos calos friáveis

Os calos friáveis de explantes foliares e caulinares foram retirados dos frascos aos 35 dias e lavados com água destilada, até retirar o meio de cultura, depois foram pesados para aferir o peso total de massa fresca, e em seguida foram secos em liofilizador e novamente pesados. Foi realizada a pulverização com ajuda de cadinho e pistilo. Após a pulverização, o material foi extraído com o solvente metanol, sendo realizadas três extrações utilizando o banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração, seguidamente o extrato foi filtrado e concentrado. O procedimento geral para a preparação dos extratos está ilustrado na figura 2.

Figura 2. Fluxograma geral da preparação do extrato



## 2.5. Análise cromatográfica dos extratos

Foi pesado aproximadamente de 2 a 5 mg dos extratos dos calos friáveis de explantes foliares e caulinares, para o análises em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), foram colocados 2  $\mu$ L dos extratos nas cromatofolhas de alumínio, com sílica gel. Para o extrato metanólico diversos sistemas foram avaliados de acordo com a polaridade da amostra entre eles: DCM/MeOH 1:1, DCM/MeOH 7:3, AcEt 100%. Para a revelação das cromatoplasmas foi utilizada luz UV (254 e 365 nm), iodo, FeCl<sub>3</sub>, NP-PEG e anisaldeído.

## 2.6. Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN)

Os extratos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e dissolvido no solvente deuterado DMSO-d<sub>6</sub>. Foi utilizado Espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H disponível na central de analítica do Laboratório Temático Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN/INPA).

## **2.7. Delineamento experimental e análise estatística**

Em 4.2 o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 9 tratamentos e 6 repetições, de cinco explantes foliares. Os tratamentos dispostos em esquema fatorial de 2x2x2 (duas concentrações de 2,4-D, dois tipos de citocinina, duas concentrações). A normalidade dos dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA) e submetidas ao teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o programa MINITAB 18.

No ponto 4.3 o delineamento experimental usado foi o desenho de blocos completamente aleatorizado (DBCA), com 3 tratamentos por cada bloco, cada tratamento foi constituído por 6 repetições de 5 explantes foliares. Os tratamentos dispostos em esquema fatorial de 2x2x3 (ambiente: luz e escuro, dois tipos de explantes: folha e segmento nodal, três tratamentos). A normalidade dos dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), e submetidas ao teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o programa MINITAB 18.

## **3. RESULTADOS E DISCUSÃO**

### **3.1. Efeito de 2,4-D em interação com TDZ e BAP na indução de calos friáveis em explantes foliares**

Os resultados de sobrevivência dos explantes foliares aos 30 dias mostraram diferença significativa entre os tratamentos. Observou-se que a interação entre 2,4-D + TDZ, resultou em altas taxas de sobrevivência entre 90 a 100%, quando comparadas com os demais tratamentos e o controle (33%) (Tabela 2). A presença de calos foi observada em todos os explantes, sendo que na combinação 2,4-D + TDZ (4,0+2,0 mg.L<sup>-1</sup>) induziu 100% de formação de calos e, foi mínima no controle (3,33%).

Tabela 2. Efeito da interação de 2,4-D com BAP e TDZ na sobrevivência (S), presença de calo (C), textura (T) e cor, avaliado após 30 dias do cultivo *in vitro* para indução de calos de explantes foliares de *H. succuuba*.

Trat	Reguladores de Crescimento (mg/L-1)	S	C*	T	Cor
		(%)			
T1	Control	33,00 c	3,33 d	0,00 b	Verde escuro
T2	2,4D + BAP (2,0+2,0)	87,00 ab	86,66 ab	0,00 b	Verde claro/escuro
T3	2,4D + BAP (2,0+4,0)	77,00 b	73,33 b	0,00 b	Verde escuro
T4	2,4D + BAP (4,0+2,0)	70,00 b	70,00 b	3,33 b	Verde claro/Amarelo
T5	2,4D + BAP (4,0+4,0)	87,00 ab	86,66 ab	23,33 ab	Verde claro/Amarelo
T6	2,4D + TDZ (2,0+2,0)	93,00 a	90,00 ab	33,33 ab	Verde claro/Esbranquiçado
T7	2,4D + TDZ (2,0+4,0)	97,00 a	96,66 a	33,33 ab	Verde claro/Esbranquiçado
T8	2,4D + TDZ (4,0+2,0)	100,0 a	100,00 a	40,00 a	Amarelo/Esbranquiçado
T9	2,4D + TDZ (4,0+4,0)	90,00 a	60,00 c	26,67 ab	Amarelo

\* Dados transformados para asen  $(x/100)^{1/2}$

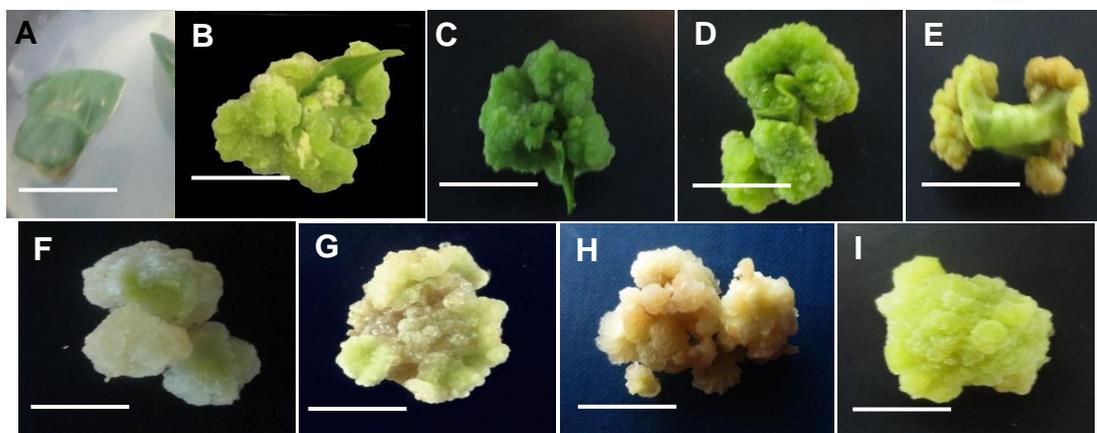
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Os tratamentos da interação de 2,4-D + BAP mostraram calos de coloração verde clara e escura, com exceção de 2,4-D + BAP (4,0 + 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) que apresentou coloração amarela, e cujos calos não oxidarem e continuaram a se desenvolver visivelmente. Os calos cultivados na interação de 2,4-D + TDZ apresentaram coloração verde clara, esbranquiçada e amarela.

Neste experimento também foi possível observar que nem todos os tratamentos apresentaram formação de calos friáveis (Figura 3). Os resultados obtidos indicam que explantes foliares tem uma boa resposta a interação de diferentes concentrações de 2,4 D + TDZ para a formação de calos com textura friável de *H. succuuba*, principalmente nos tratamentos 2,4-D + TDZ (2,0+4,0 mg.L<sup>-1</sup>), e 2,4-D + TDZ (4,0+2,0 mg.L<sup>-1</sup>) com 33,33% e 40,00% de calos friáveis (Figura 3G, 3H).

Segundo Acemi et al. (2012), a formação de calos depende do tipo de auxina. George et al. (2008), confirmaram que a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos, em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina.

Figura 3. Aspecto visual dos calos induzidos a partir de explantes foliares de *H. succuba* após 30 dias nos diferentes balanços hormonais ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). A- Controle; B- T2: 2,4-D + BAP (2,0+2,0); C- T3: 2,4-D + BAP (2,0+4,0); D- T4: 2,4-D + BAP (4,0+2,0); E- T5: 2,4-D + BAP (4,0+4,0); F- T6: 2,4-D + TDZ (2,0+2,0); G- T7: 2,4-D + TDZ (2,0+4,0); H-T8: 2,4-D + TDZ (4,0+2,0); I- T9: 2,4-D + TDZ (4,0+4,0). A barra representa 1 cm.



Imagens: Sáenz-Ramírez, L. (2018).

Pouquíssimos calos foliares apresentaram oxidação. A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da lignina, por injúrias nos tecidos ou senescência das espécies nativas, principalmente nas tropicais, que apresentam altas concentrações desses compostos (GEORGE E SHERRINGTON, 1984).

Segundo Pierik (1990), o crescimento e o desenvolvimento das células podem ser influenciados pelo próprio material vegetal, como por exemplo, genótipo, idade da planta, do órgão ou do tecido. Estes fatores, somados a outros, como meio nutritivo, reguladores de crescimento, luz, temperatura entre outros, atuam acelerando, retardando ou até mesmo inibindo a proliferação celular e, conseqüentemente, a formação e o crescimento do calo.

Por outro lado, Singh et al. (2011), também verificaram que a interação de 2,4-D + BAP em explantes foliares de *Catharanthus roseus* produziram calos não friáveis aos 18 dias. Verma et al. (2012) constataram que,  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D mostrou efeitos estimulatórios na proliferação de calos em explantes foliares de *Catharanthus roseus*, obtendo 76% de formação de calos. Nesse sentido, o mesmo autor colocou em interação com o BAP obtendo resposta de 78% de produção de calo, porém os calos produzidos não foram friáveis, e apresentaram diversas colorações desde verde clara, amarela, branco e até marrom.

### 3.2. Efeito dos reguladores de crescimento na presença ou ausência de luz para indução de calos friáveis

Foram utilizados os tratamentos 2,4-D +TDZ (2,0 + 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e 2,4-D +TDZ (4,0 + 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) do experimento anterior que proporcionaram maior formação de calos friáveis, e adicionou-se outro tratamento 2,4-D +TDZ (1,0 + 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) no ambiente (luz e escuro). Após 30 dias, foi observado alto índice de sobrevivência e formação de calos sob condições de luz e escuro para ambos tipos de explantes (foliar e caulinar), apresentando diferença significativa nos tratamentos.

Por outro lado, pode-se comprovar que a produção de calos friáveis nos tratamentos T1: 2,4-D +TDZ (4,0 + 2,0 mg.L<sup>-1</sup>), T2: 2,4-D +TDZ (2,0 + 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e T3: 2,4-D +TDZ (1,0 + 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) com explantes foliares foi maior no escuro, apresentando 46,67%, 40,00% e 73,33% respectivamente, quando comparadas na condição de luz que mostraram baixo índice (Tabela 3). Enquanto que calos friáveis de explantes caulinares na presença de luz do T1: 2,4-D +TDZ (4,0 + 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) foi maior (76,67%), em relação aos tratamentos do escuro.

Tabela 3. Efeito dos reguladores de crescimento na sobrevivência, calo e textura de diferentes explantes de *H. succuba* cultivados na luz e escuro, após 30 dias.

T	Explante	Regulador crescimento	Concentração (mg/L <sup>-1</sup> )	Sobrevivencia	Calo %	Textura
LUZ						
T1			4,0 + 2,0	96.70 a	96.67 a	20.00 c
T2	Foliar	2,4D +TDZ	2,0 + 4,0	100.0 a	100.0 a	20.00 c
T3			1,0 + 1,5	100.0 a	100.0 a	36.00 b
T1			4,0 + 2,0	93.33 a	93.33 a	76.67 a
T2	Caulinar	2,4D +TDZ	2,0 + 4,0	96.67 a	96.67 a	46.67 b
T3			1,0 + 1,5	93.33 a	76.67 b	43.33 b
ESCURO						
T1			4,0 + 2,0	90.00 ab	83.33 ab	46.67c
T2	Foliar	2,4D +TDZ	2,0 + 4,0	100.0 a	100.0 a	40.00 c
T3			1,0 + 1,5	96.67 ab	66.67 b	73.33 a
T1			4,0 + 2,0	76.67 b	66.67 b	30.00 d
T2	Caulinar	2,4D +TDZ	2,0 + 4,0	100.0 a	86.67 ab	60.00 ab
T3			1,0 + 1,5	100.0 a	100.0 a	56.67 b

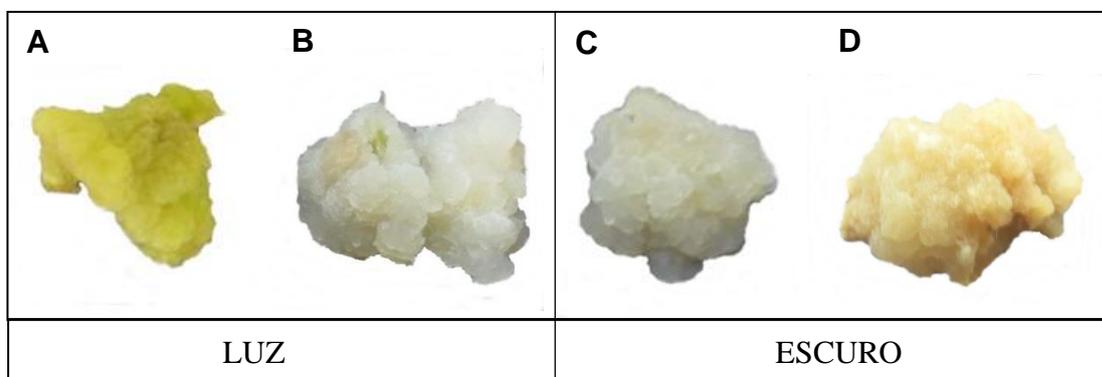
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Cordeiro et al. (2014) constataram que segmentos nodais de *Mandevilla guanabarica* (Apocynaceae) inoculados em meio WPM e suplementado com 2,4-D na luz, apresentaram formação de calos superior a 90%. No entanto, os calos desenvolvidos foram compactos e de coloração verde claro a marrom. Enquanto que no ambiente escuro apresentou formação de calos friáveis.

Para explantes de *H. succuba* foi obtida boa formação de calos friáveis na interação de 2,4-D +TDZ. Singh et al. (2011), utilizaram outra citocinina em explantes de *Catharanthus roseus* e inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D + BAP e cultivados sob luz e escuro, apresentaram 87,9% e 90,8% de calos em explante caulinar e também obtiveram 64,9% e 68,4% de calos em explante foliar. Acemi et al. (2012) também verificaram que a interação de 2,4-D + BAP foram os mais eficazes na indução de calo em segmentos nodais de *Amsonia orientalis* destacando o 2,4-D como a auxina mais efetiva para a formação de calos para a espécie.

Em relação a cor, os calos de explantes foliares formados na presença de luz apresentaram coloração verde claro e de consistência semi-compacta (Figura 4A). Entretanto, os calos do ambiente escuro do T3: 2,4-D +TDZ (1,0 + 1,5 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram coloração esbranquiçada e suave sendo altamente friável (Figura 4C). Enquanto que calos friáveis de explantes caulinares do T1: 2,4-D +TDZ (4,0 + 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) obtidos na presença de luz apresentaram a coloração esbranquiçada (Figura 4B), porém os calos obtidos no ambiente escuro foram semi-compactos e de coloração amarela clara (Figura 4D).

Figura 4. Aspecto de calos desenvolvidos a partir de explantes foliares e caulinares de *H. succuba* cultivados em meio MS após 30 dias de cultivo, sob luz e escuro. A- Calo do explante foliar, B- Calo do explante caulinar, C- Calo do explante foliar, D- Calo do explante caulinar.



Imagens: Sáenz-Ramírez, L. (2018).

Subroto e Doran (1994), reportam que a coloração e a consistência de calos dependem tanto da concentração como do tipo de regulador de crescimento usado no meio de cultura. O tipo de regulador de crescimento também influencia na concentração dos metabólitos secundários.

Vários trabalhos destacam o 2,4-D como uma auxina eficiente na produção de calos, e é a mais comumente utilizada na indução de calos, tanto em espécies herbáceas como lenhosas (ROSAL, 2004). O estabelecimento de calos friáveis é de suma importância para utilização em suspensão celular e determinação de protocolos visando à produção de metabólitos secundários *in vitro* (CIDDI e SHULER, 2000). Os resultados desta pesquisa revelaram que o 2,4-D tem um papel fundamental na produção de calos friáveis de *H. succuba*.

A fim de otimizar o acúmulo de metabólitos secundários, as culturas de calos devem ser expostas a uma gama de concentrações de reguladores de crescimento, como BAP, zeatina, NAA e 2,4-D (COLLIN, 2001).

### 3.3. Extração dos calos friáveis de explante foliar e caulinar

Após 35 dias de cultivo *in vitro*, foi escolhido o tratamento que produziu maior quantidade de calos friáveis nas condições de luz e escuro, sendo que a massa fresca do calo foliar e caulinar foi de 17,27 g e 27,07 g respectivamente. Depois da liofilização os calos foram pesados novamente, resultando em 1,30 g e 1,19 g de massa seca.

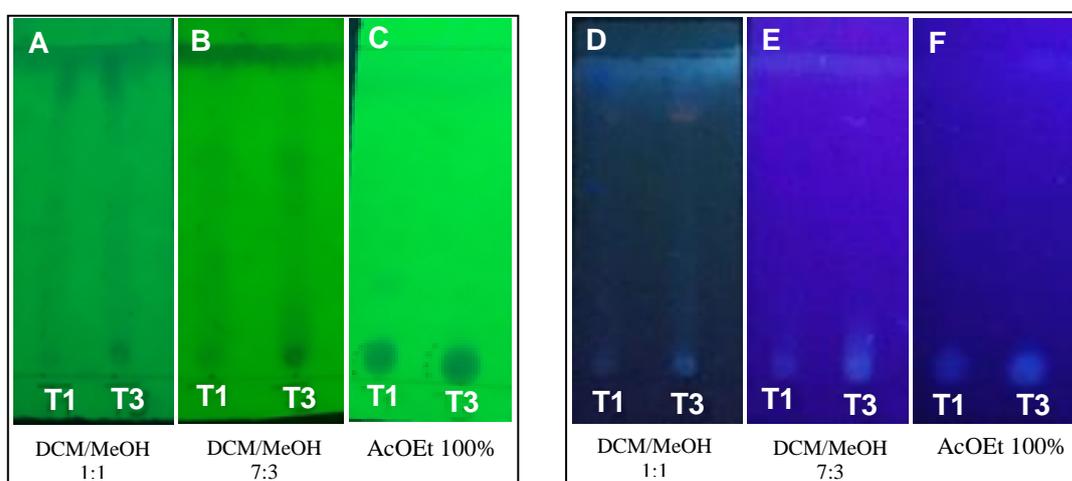
Tabela 42. Massa dos calos e rendimento dos extratos metanólicos obtidos de explantes foliares e caulinares no cultivo *in vitro* de *H. succuba*.

Tratamentos	Ambiente	Explante	Massa fresca	Massa seca	Massa do extrato	Rendimento
			(g)			(%)
T1. 2,4D +TDZ (4,0 + 2,0)	LUZ	Caulinar	27,07	1.30	0,4290	33,00
T3. 2,4D +TDZ (1,0 + 1,5)	ESCURO	Foliar	17,27	1.19	0,4061	34,12

### 3.4. Análise cromatográfica dos extratos metanólicos

Para os extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e explante foliar (T3), foi possível verificar a baixa concentração de substâncias com pares de elétrons livres quando visualizados na luz ultravioleta 254 nm caracterizados pela coloração roxa (Figura 5A, 5B, 5C), e quando visualizados frente à luz ultravioleta 365 nm (Figura 5D, 5E, 5F) foi observada a presença de grupos cromóforos e duplas ligações, caracterizados pela fluorescência de coloração azul.

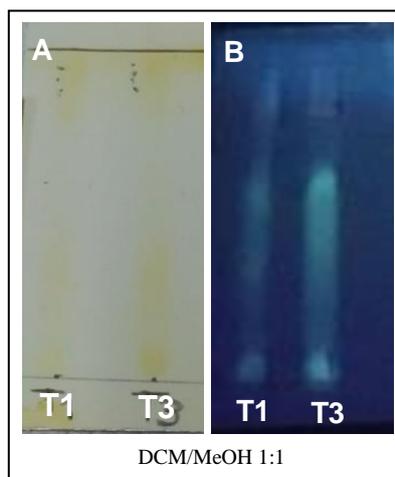
Figura 57. CCDC dos extratos metanólico dos calos friáveis cultivados *in vitro* de explantes caulinar (T1) e foliar (T3) de *H. sucubus*.



Legenda: A: B: C: 264 nm. D:E:F: 365nm. C

Na revelação com iodo foi possível verificar uma baixa concentração de substâncias com duplas ligações visualizadas em cor amarelo claro (Figura 6A), e pelo revelador NP-PEG observou-se a presença de moléculas com grupos fenólicos, caracterizados pela coloração azul fluorescente (Figura 6B).

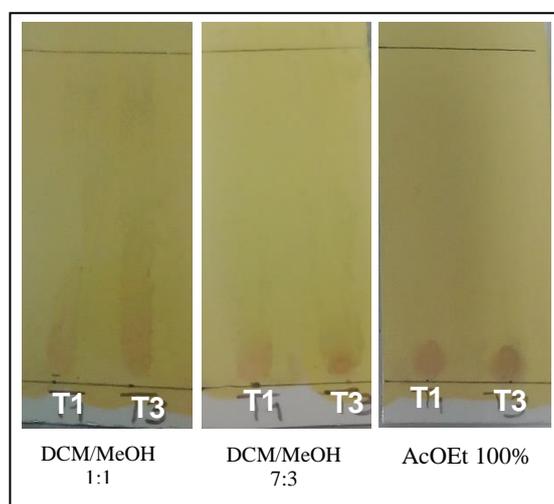
Figura 68. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados *in vitro* de *H. sucuuba* com revelador de iodo e NP-PEG



Legenda: A: Iodo, B: NP-PEG

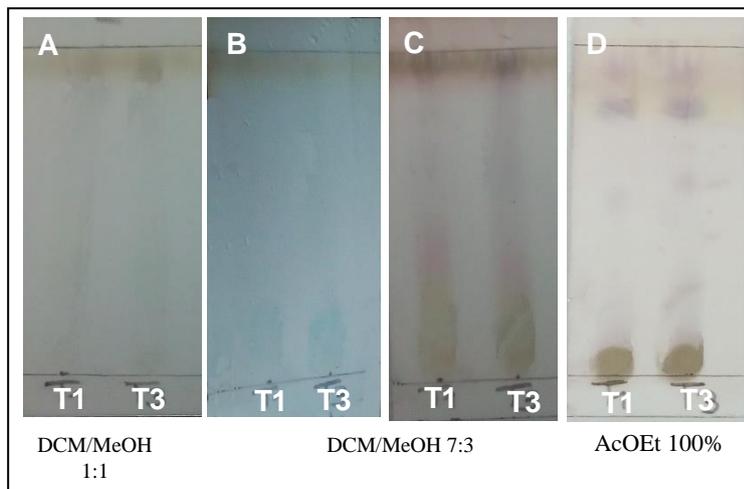
Com o revelador cloreto férrico (Figura 7) foi possível observar apenas a coloração castanho para ambos extratos na origem da aplicação, mas em baixa concentração.

Figura 7. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados *in vitro* de *H. sucuuba* com revelador de  $\text{FeCl}_3$



Com o revelador anisaldeído sulfúrico (Figura 8) foi possível observar colorações de cor inicialmente azul que terminou na cor rosa (Figura 8B e 8C), característico de esteróides, além de coloração roxa (Figura 8D), característico de terpenoides para os dois extratos.

Figura 8. CCDC dos extratos metanólicos dos calos friáveis de explante caulinar (T1) e foliar (T3) cultivados *in vitro* de *H. succuba*.

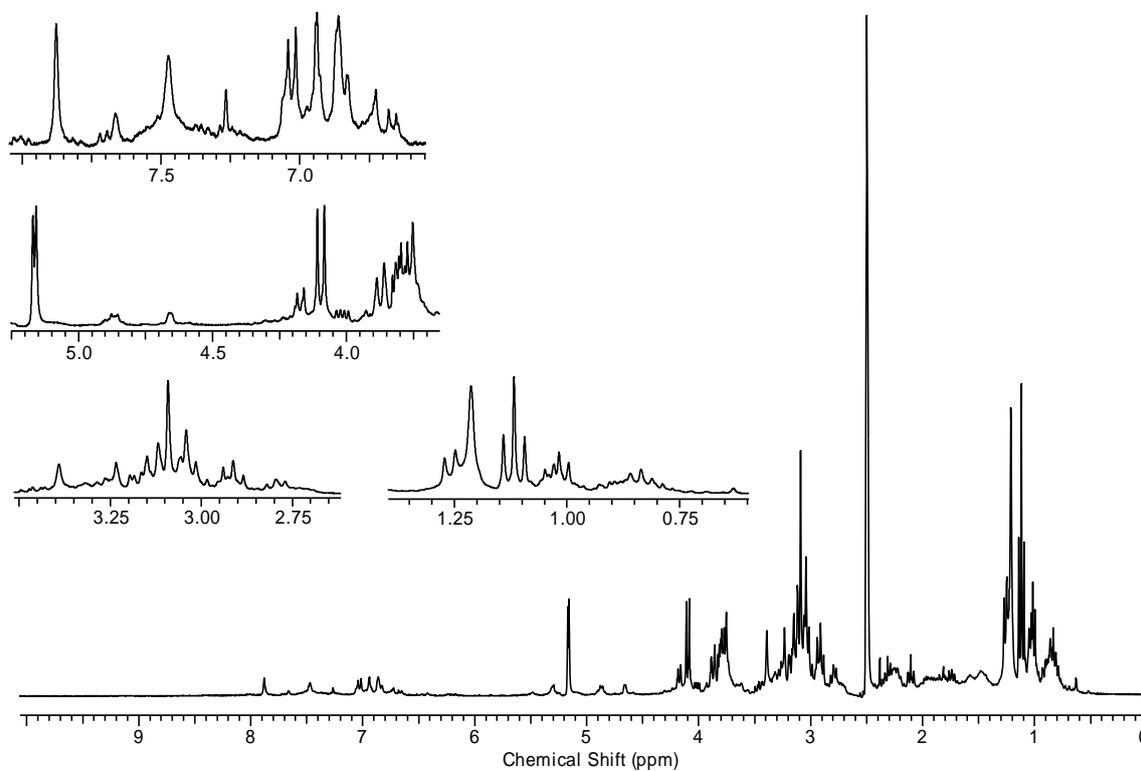


Legenda: A: B: C: D: Anisaldeido

### 3.5. Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (RMN)

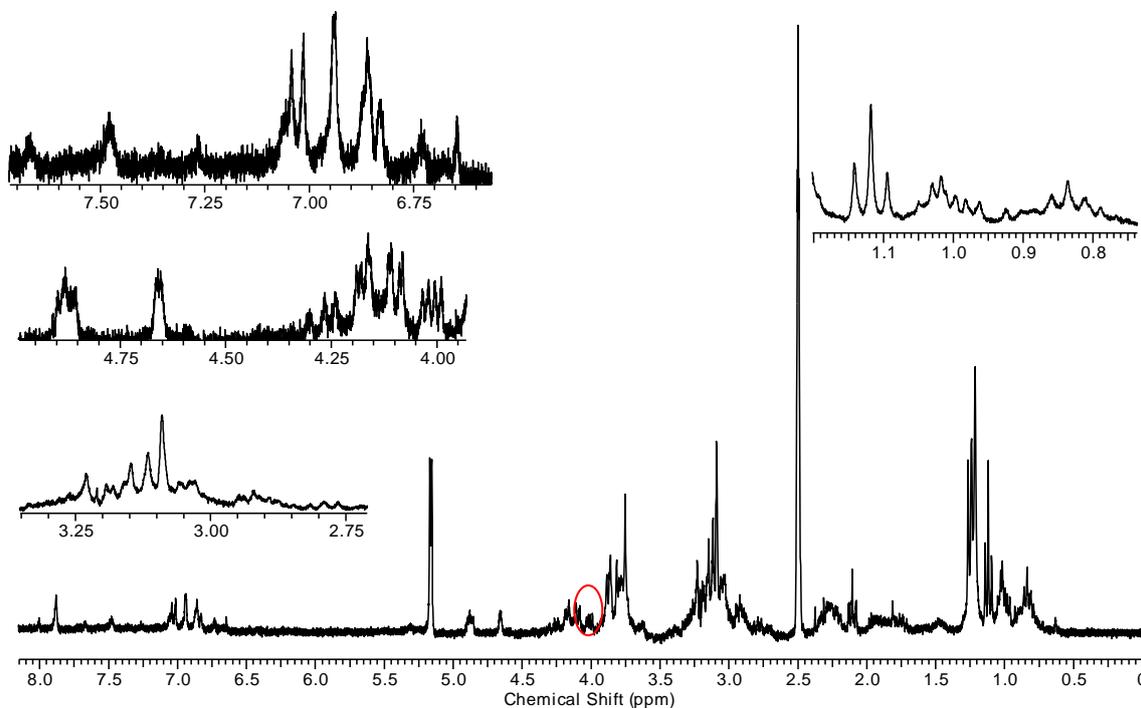
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico dos calos friáveis de explantes foliares (figura 9) mostrou sinais de hidrogênios na região dos aromáticos (6 – 8 ppm), com um singleto em 7,9 ppm acompanhado de outros sinais em 6,5 e 7,2 ppm, podendo indicar a presença de flavonoides. Esse mesmo sinal em 7,9 ppm pode ser também indicativo de iridoides. Em 5,16 ppm foi possível observar um dubleto com constante de acoplamento ( $J$ ) de 3,5 Hz, característico de hidrogênio anomérico de açúcar com configuração alfa. Um dubleto em 4,09 ppm com constante de acoplamento de 8 Hz, referente ao hidrogênio anomérico de açúcar com configuração beta. Entre 3 e 4 ppm foi possível observar os demais sinais dos açúcares. Finalmente entre 0,6 e 1,0 ppm observaram-se os singletos referentes a terpenoides, além de um sinal intenso em 1,25 ppm que unido à presença do tripleto em 0,8 ppm são referentes a cadeias alifáticas saturadas (“graxas”). Silva et al. (2003), confirmaram a presença dos carboidratos glicose, ramnose e galactose, quando analisados em HPLC-PAD a fração aquosa do látex de *H. succuba*.

Figura 99. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico (300 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) da cultura de calos friáveis de explantes foliares de *H. succuba*



No caso da figura 10, pode-se observar que o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico dos calos friáveis de explantes caulinares, os resultados são similares com a única diferença no 4,10 ppm.

Figura 1010. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) da cultura de calos friáveis de explantes foliares de *H. succuba*



#### 4. CONCLUSÃO

Calos friáveis de *H. succuba* foram obtidos na combinação de 2,4-D + TDZ em meio MS com concentrações de 4,0+2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  para explantes caulinares na presença de luz e, 1,0+1,5  $\text{mg.L}^{-1}$  para explantes foliares em condições de escuro.

Foi possível verificar a presença de grupos fenólicos, esteroides e terpenoides nos extratos metanólicos de explantes foliares e caulinares de *H. succuba*.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACEMI, A.; OZEN, F.; KIRAN, R. Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientalis*: A critically endangered medicinal plant. **Eurasian Journal of BioSciences**, v. 112, n. October, p. 105–112, 2012.
- CIDDI, V.; SHULER, M. L. Camptothecine from callus cultures of *Nothapodytes foetida*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 129-132, jan. 2000.
- COLLIN, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 34: p. 119-134, 2001.
- CORDEIRO, S. Z. et al. Micropropagation and callogenesis in *Mandevilla guanabarica* (Apocynaceae), an endemic plant from Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 108–115, 2014.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 89-95, 2006.
- FÜRDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 312-7, 2005.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 709 p. 1984
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Eds.) **Plant propagation by tissue culture**. Springer Netherlands, p. 1-28. 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p.183-260. 1998.
- GYORGY, Z.; TOLONEN, A.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.129-35, 2005.
- LAMEIRA, O. A.; COSTA, M. P.; PINTO, J. E. B. P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, set./dez. 1994.
- LIMA, S. M. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 669-671, 2008.

MIRANDA, A. L.; SILVA, J. R.; REZENDE, C. M.; NEVES, J. S.; PARRINI, S. C.; PINHEIRO, M. L.; CORDEIRO, M. C.; TAMBORINI, E.; DA CUNHA PINTO, A. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*. **Planta Medica**, v. 66, n. 3, p. 284–286, 2000.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A.; Micropropagação e Metabólitos Secundários in vitro de Plantas Medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 102 p. 2001.

PIERIK, R. L. M. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Martins Nijoff Publishers, 326 p. 1990.

REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmento foliar. **Cultivo in vitro de Plantas Medicinais**, p. 35, 2009.

REY, H.; MROGINSKI, L. A.; FERNANDEZ, A. Inducción *in vitro* de callos y raices en explanaos de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Pitón, Buenos Aires, v. 39, n. 1, p. 161-170, 1980.

RIBEIRO, J. E.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. In: Manaus: INPA, p. 799. 1999.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (Eremanthus)**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2004.

SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of *Himatanthus sucuuba* latex against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 173–177, 2010.

SILVA, J. R. DE A. et al. Triterpenic esters from *Himatanthus sucuuba* (SPRUCE) Woodson. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 24–26, 1998.

SILVA, J.R.; AMARAL, A. C.; SIANI, A. C.; REZENDE, C. M.; FELCMAN, J.; PINTO, A. C. Contribution to the study of *Himatanthus sucuuba*: latex macromolecule, microelements and carbohydrates. **Acta Amazonica**. v. 33, n. 1, p. 105-110, 2003.

SINGH, R. .; KHARB, P. .; RANI, K. Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus* *in vitro* using different explants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 6, p. 699–704, 2011.

SOARES, D. C.; ANDRADE, A. L. S.; DELORENZI, JAN C.; SILVA, J. R. A.; FREIRE DE LIMA, L.; FALCÃO, C. A. B. .; PINTO, ANGELO C.; ROSSI BERGMANN, B.; SUBROTO, M.A.; DORAN, P.M. Production of steroid alkaloid by hairy roots of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.38, n.2, p.93-102, Aug. 1994.

VERMA, A. K.; SINGH, R. R.; SINGH, S. Improved alkaloid content in callus culture of *Catharanthus roseus*. **Botanica Serbica**, v. 36, n. 2, p. 123–130, 2012.

VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 193–200, 1997.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi comprovado que é possível manter a viabilidade de sementes de *H. succuba* até 14 meses de armazenamento. Recomenda-se trabalhos posteriores para determinar se as sementes são ortodoxas ou recalcitrantes.

Foi possível obter bom desenvolvimento das plântulas de *H. succuba* com uso de reguladores de crescimento, porém o enraizamento *in vitro* dos segmentos nodais, não foi quantitativamente eficiente. Portanto recomenda-se novos estudos que otimizem o enraizamento. Existe a necessidade de avaliar o desenvolvimento em diferentes substratos das plantas micropropagadas.

A presença de grupos fenólicos, esteroides e terpenoides identificados nos extratos indica que podem ser realizados estudos fitoquímicos, mais aprofundados, que poderão levar a descoberta de novas moléculas.