

## Avaliação de diferentes sistemas de cultivo “in vitro” para a micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes

**Batistini, A. P<sup>1</sup>, Moro, J. R.<sup>2</sup>; França, S. C.<sup>3</sup> Pereira, A. M. S.<sup>4</sup>**

<sup>1,2</sup>UNESP/Jaboticabal, São Paulo, CEP 14870-000. <sup>3,4</sup>UNAERP/Ribeirão Preto, São Paulo, CEP 14096-380.

**RESUMO:** Este trabalho foi desenvolvido com *P. ipecacuanha*, uma planta medicinal brasileira que contém emetina em suas raízes. O objetivo foi avaliar diferentes protocolos de micropropagação dessa espécie em vários sistemas de produção de plântulas “in vitro” (meio semi-sólido, líquido e imersão temporária). Para o sistema semi-sólido, utilizaram-se os meios basais MS, B5 e WP combinados aos vários reguladores de crescimento, bem como dois diferentes tamanhos de frascos, avaliou-se também a densidade de inóculo dentro do frasco. O sistema em meio líquido foi conduzido em meio MS, suplementado com diferentes reguladores de crescimento e o sistema de imersão temporária foi realizado em meio MS, suplementado com 1,5 mg/L BAP e 0,5 mg/L AG<sub>3</sub>, juntamente com o auxílio de um aparelho digital reverso e de uma bomba a vácuo. O sistema em meio líquido MS, suplementado com 1,5 mg/L BAP e 0,5 mg/L AG<sub>3</sub>, apresentou o índice mais eficiente de brotação ( $2,37 \pm 0,32$  brotos/explantante) em período de crescimento de 30 dias. Para o período de 90 dias de crescimento, o sistema em meio semi-sólido, utilizando frascos de 8,5 X 5,5 cm e 3 explantes por frasco, apresentou  $1,80 \pm 0,20$  brotos/explantante e  $3,06 \pm 0,51$  cm de comprimento, e o maior índice de sobrevivência (96%). Os explantes que foram cultivados em sistema de imersão temporária por 90 dias apresentaram um índice de brotação de  $2,30 \pm 1,10$  brotos/explantante e comprimento de  $2,08 \pm 0,12$  cm, com 52% de sobrevivência.

**Palavras-chave:** ipeca, cultura de tecido, plantas medicinais, Rubiaceae, ipecacuanha, alcalóides.

**ABSTRACT:** Evaluation of different systems of “in vitro” culture for propagation of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. This work was carried out with *Psychotria ipecacuanha*, a Brazilian medicinal plant the roots of which contain emetine. The main objective was to develop a protocol for the micro-propagation of these species, by testing different culture techniques, the temporary immersion system, and the semi-solid and liquid media systems. In the semi-solid system , experiments were developed in flasks of two different sizes containing MS, B5, and WP media to which were added different growth regulators. Innoculum density was also evaluated. The liquid medium system consisted of MS medium supplemented with different growth regulators. For the temporary immersion system, the MS medium received an addition of 1.5mg/L BAP and 0.5mg/L GA<sub>3</sub>, and a reverse digital apparatus and vacuum pump were used. The liquid medium system with MS medium supplemented with 1.5mg/L BAP and 0.5mg/L GA<sub>3</sub> presented the best results for shoot proliferation in a period of 30 days in culture ( $2.37 \pm 0.32$  shoots/explant). Cultures carried out for 90 days in the semi-solid system, using 8.5 x 5.5cm flasks and 3 explants per flask, developed  $1.80 \pm 0.20$  shoots /explant, achieving  $3.06 \pm 0.51$  cm of height adn presented superior survival ratio (96%). Explants cultured in temporary immersion system for 90 days showed  $2.30 \pm 1.10$  shoots/explant achieving a growth of  $2.08 \pm 0.12$  cm and 52% survival.

**Key words:** ipecac, tissue culture, medicinal plants, Rubiaceae, alkaloids, ipecacuanha.

### INTRODUÇÃO

*Psychotria ipecacuanha* é conhecida popularmente como ipeca ou poaia, sendo preconizada pela farmacopéia brasileira como emética, amebicida, e expectorante devido à presença de alcalóides (emetina, cefalina, entre outros) em suas raízes. Nativa da floresta tropical úmida do Brasil, tem sido considerada, no mundo todo, como uma importante espécie medicinal pelas suas propriedades curativas, sendo incluída nas farmacopéias Indiana, japonesa, inglesa, americana e portuguesa. (Trease & Evans, 1989).

A ipeca está na lista da flora ameaçada de extinção no Brasil, devido à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e/ou pelos freqüentes desmatamentos das áreas de

ocorrência natural (Rodrigues et al., 1996; Fundação Biodiversitas). Essa espécie é descrita como um subarbusto de aproximadamente 30 cm de altura que possui sementes recalcitrantes, por isso, a propagação “in vitro” torna-se mais vantajosa do que a propagação “ex vitro”, e convém ressaltar que o teor de alcalóides, nas raízes de plantas advindas de sementes, atinge o pico máximo no terceiro e quarto ano de cultivo, enquanto que, de acordo com Yoshimatsu et al (1994), as raízes advindas de plântulas micropropagadas expressam maior teor de alcalóide com dois anos de cultivo.

Vários trabalhos desenvolvidos no Japão e Índia demonstram o estabelecimento de diferentes protocolos de micropropagação de ipeca (Ideda et al, 1988; Jha & Jha, 1989; Yoshimatsu & Shimomura, 1991 e 1994). A micropropagação

Recebido para publicação em 24/08/01 e aceito para publicação em 12/06/02.

pode ser realizada em meio semi-sólido ou em meio líquido, sendo esse último o principal caminho para a automação e diminuição do custo das plântulas produzidas "in vitro".

O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento de plântulas de ipeca em sistema de imersão temporária e a comparação desse sistema com os métodos convencionais de produção de propágulos "in vitro" de ipeca (sistemas semi-sólido e líquido). Esse estudo comparativo entre metodologias de propagação "in vitro" é praticamente inexistente para essa espécie.

## MATERIAL E MÉTODO

### Espécie

A planta utilizada para a pesquisa, *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae), é procedente de Cáceres (Mato Grosso, Brasil) e tem sido mantida "in vitro" desde 1989 em meio MS semi-sólido (2,5 g/L de Phytogel® - Sigma e 30 g/L de sacarose), suplementado com 1,5 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg/L de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). A excicata dessa espécie foi depositada no herbário de Plantas Medicinais na UNAERP com número HPM-SP 0025. Segmentos nodais do referido genótipo foram utilizados como fonte de explante nos experimentos de micropromoção nos sistemas semi-sólido, líquido e de imersão temporária.

### Sistema em meio semi-sólido.

Os ensaios foram conduzidos em meios de cultura semi-sólidos MS (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e WP (Woody Plant - Lloyd & McCown, 1980), suplementados com diferentes reguladores de crescimento em várias concentrações especificados nas Tabelas 1 e 2. Os frascos de vidro utilizados foram de dois tipos: (1) 8,5 cm de altura X 2,5 cm de diâmetro, contendo cerca de 10 mL de meio de cultura, vedados com tampa plástica, onde foi inoculado um explante por frasco; (2) 8,5 cm de altura X 5,5 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de nutritivo, vedados com tampa plástica transparente, onde foram inoculados 3 segmentos nodais por frasco. Utilizaram-se 2,5 g/L de Phytogel® (Sigma) no preparo de todos os meios nutritivos que foram autoclavados a 120° C, sob 1 atm por 15 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia sob 1600 Lux (1,6 X 10<sup>2</sup> cal. Cm<sup>-2</sup>. min<sup>-1</sup>) de densidade luminosa, proveniente de 2 lâmpadas fluorescente branca fria (GE, 85 W) à temperatura de 25 ± 2° C, sem transferência ou repicagem. Após este período, foram avaliados quanto ao número e comprimento dos brotos bem como o número de pares de folhas.

Para avaliar a influência da densidade de explantes, em relação ao crescimento das

plântulas, foram inoculados em frascos com 8,5 X 2,5 cm, 1 explante, e nos frascos com 8,5 X 5,5 cm, 1, 3 e 10 explantes. O meio nutritivo utilizado foi o MS, suplementado com 1,5 mg/L BAP e 0,5 mg/L AG<sub>3</sub>. Esses explantes permaneceram 90 dias na sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/dia sob 1600 Lux (1,6 X 10<sup>2</sup> cal. Cm<sup>-2</sup>. min<sup>-1</sup>) de densidade luminosa, proveniente de 2 lâmpadas fluorescente branca fria (GE, 85 W) à temperatura de 25 ± 2° C, sem transferência ou repicagem. Após este período, foram avaliados quanto ao número e comprimento dos brotos bem como o número de pares de folhas.

Diferentes tempos de cultivo foram avaliados no desenvolvimento "in vitro" de plântulas com densidade 3 explantes/frasco, utilizando frascos 8,5 X 5,5 cm, contendo meio de manutenção MS, suplementado com 1,5 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AG<sub>3</sub>. O período de permanência na sala de crescimento variou de 30, 60, 90 e 133 dias. Para a análise do desenvolvimento das plântulas, foram coletados dados de número e comprimento de brotação.

As plântulas que apresentaram 3 pares de folhas, 3,0 cm de comprimento e raízes foram retiradas da condição "in vitro", lavadas em água e transferidas para casa de vegetação (28 ± 4° C e 80% U. R.) em sacos plásticos 0,5 L, contendo terra e areia (1:1) para avaliar o processo de aclimatação. A irrigação foi realizada 2 vezes ao dia com intervalos de 12 horas. Após 3 meses de aclimatação foram coletados dados de sobrevida.

O delineamento experimental adotado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Para a comparação das médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey, aos níveis de 5% ou 1% de probabilidade.

### Sistema em meio líquido.

Dez segmentos nodais foram inoculados em frasco de vidro tipo Erlenmeyer (capacidade de 250 mL), contendo 100 mL de meio de cultura líquido MS (20 g/L de sacarose), suplementado com diferentes reguladores de crescimento (Tabela 6) e vedado com papel alumínio. Os meios líquidos foram autoclavados a 120° C sob 1 atm, por 25 minutos. Os explantes foram mantidos sob agitação constante (100 rpm) por 30 e 60 dias em sala de crescimento, e subcultivados por dois períodos de 30 dias. Após esse período, foram avaliados quanto ao número e comprimento de brotações. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, para a comparação das médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey, aos níveis de 5% ou 1% de probabilidade.

### Sistema de imersão temporária.

Esse sistema foi conduzido em frascos com capacidades diferentes. Iniciou-se com dois frascos

de vidro com capacidade de 9 L cada (Figura 1, A), conectados como vasos comunicantes por meio de uma mangueira de silicone. Os dois frascos foram ligados diretamente a um aparelho digital reverso (Digital Reverse SMR – 07, Labtec Eq. Lab. Ltda) que comandava uma bomba de vácuo, de maneira que o meio nutritivo líquido foi transportado de um frasco para outro com um intervalo de tempo pré-determinado. O meio do sistema de imersão temporária foi autoclavado a 120° C sob 1 atm, por 40 minutos. Ao frasco 1 foi adicionado o meio de cultura líquido MS (2 L) e 20 g/L de sacarose, suplementado com 1,5 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AG<sub>3</sub>, e o frasco 2 recebeu os segmentos nodais (200 explantes). A exposição dos explantes ao meio líquido foi realizado por imersão temporária de 8 minutos em intervalos de 8 horas. Após a avaliação desse experimento, optou-se pelo uso de frascos com capacidade de 1 L cada (Figura 1, B). Os frascos, junto com o meio líquido, foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm, por 25 minutos. O frasco 1 continha mesma composição de meio nutritivo (200 mL), enquanto que no frasco 2 foram depositados 50 segmentos nodais. A exposição dos explantes pelo meio líquido foi por imersão temporária com duração de 15 minutos a cada 8 horas. Os propágulos foram mantidos neste sistema por 30 e 90 dias, em sala de crescimento. Esse experimento foi repetido uma vez, para o período de 30 dias, e duas vezes, para o período de 90 dias. Dados com relação ao número de brotações e comprimento das mesmas foram coletados, bem como o índice de sobrevivência. Utilizou-se uma análise de variância simples com os dados obtidos.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### Sistema em meio semi-sólido.

Os experimentos realizados em meios semi-sólidos com diferentes concentrações de sais e reguladores de crescimento mostraram que o meio B5 foi o mais indicado para o desenvolvimento do comprimento dos explantes e que as associações de cinetina (CIN) e ácido α-indolacético (AIA) ou BAP e AIA, nas mesmas concentrações, promoveram índice de crescimento próximos (Tabela 1). Esses meios também se mostraram eficientes para estimular o índice de brotação das gemas que foi da ordem de 1,4 ± 0,10. Ideda *et al* (1988) desenvolveram protocolo de micropopulação em meio semi-sólido e mostraram um índice de brotação de 5,40 em meio B5 acrescido de 3 mg/L de BAP e 0,01 mg/L de ANA. Esse experimento foi repetido no laboratório da Unidade de Biotecnologia Vegetal e não foi obtido o resultado apontado por eles, e sim o índice de 1,43 (Tabela 1). O índice de brotação 5,40 também foi obtido por Lameira *et al* (1994), quando utilizou segmentos internodais como explante e a concentração de 6,66 μM BAP (1,5 mg/L) no meio B5. Comparando com o índice de brotação 1,40 esta diferença pode estar relacionada ao número de replicatas usado pelo grupo japonês (igual a 10) bem como aos genótipos utilizados. Yoshimatsu & Shimomura (1994) também trabalharam com protocolo de micropopulação de ipeca, e embora não tenham revelado o índice de brotação obtido em seus experimentos, concluíram que o meio B5 também foi o mais adequado para o desenvolvimento de gemas "in vitro".

**TABELA 1.** Efeito de diferentes meios basais e reguladores de crescimento no número e comprimento de brotação de ipeca em meio semi-sólido.\*

Meio basal + reguladores de crescimento (mg/L)	Nº de brotos	Comprimento de brotação (cm)
B5 + 1,0 CIN + 0,1 AIA	1,40 A	0,67 a
WP + 1,0 CIN + 0,1 AIA	1,00 B	0,47 ab
MS + 1,0 CIN + 0,1 AIA	1,10 B	0,30 b
B5 + 1,0 BAP + 0,1 AIA	1,47 A	0,70 a
MS + 1,0 BAP + 0,1 AIA	1,37 A	0,30 b
WP + 1,0 BAP + 0,1 AIA	1,23 A	0,33 b
B5 + 3,0 BAP + 0,01 ANA	1,70 A	0,28 a
B5 + 1,0 CIN + 0,01 ANA	1,37 AB	0,29 a
B5 + 1,0 CIN + 0,01 AIA	1,20 B	0,35 a
B5 + 3,0 BAP + 0,01 ANA <sup>1</sup>	1,43 A	0,70 a
B5 + 1,0 BAP + 0,10 AIA	0,53 B	0,82 a

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 10 replicatas e as médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente, entre si, ao nível de 5% ou 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\* Frasco com 8,5 X 2,5 cm.

<sup>1</sup> ANA, ácido naftaleno acético.

**TABELA 2.** Efeito de diferentes meios basais e reguladores de crescimento no número e comprimento de brotação de ipeca em meio semi-sólido.\*\*

Meio basal + reguladores de crescimento (mg/L)	Nº de brotos	Comprimento de brotão (cm)
B5 + 1,5 BAP	2,07 A	0,75 a
MS + 1,5 BAP	1,53 A	0,67 a
MS + 3,0 BAP	0,07 B	0,12 b
MS basal	0,77 A	0,52 a
MS + 0,01 BAP	0,63 A	0,53 a
MS + 0,10 BAP	0,60 A	0,60 a
MS + 0,50 BAP	1,13 A	0,56 a
MS + 1,00 BAP	1,30 A	0,64 a
B5 basal	0,93 A	0,97 a
B5 + 0,01 BAP	0,50 A	0,77 a
B5 + 0,10 BAP	0,97 A	0,47 a
B5 + 0,50 BAP	1,50 A	0,81 a
B5 + 1,00 BAP	1,03 A	0,50 a
WP basal	0,87 A	0,59 a
WP + 0,01 BAP	0,53 A	0,40 a
WP + 0,10 BAP	0,73 A	0,44 a
WP + 0,50 BAP	1,30 A	0,51 a
WP + 1,00 BAP	1,53 A	0,50 a

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 10 replicatas e as médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente, entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\*\* Frasco com 8,5 X 5,5 cm.

**TABELA 3.** Efeito da densidade de inoculo no número e comprimento de brotação e no número de pares de folhas de ipeca em meio semi-sólido.

Dimensões do frasco	Nº de plantas por frasco	Nº de brotos	Comprimento da brotação (cm)	Nº de pares de folhas por explante
8,5 cm de comprimento X 2,5 cm de diâmetro	1	1,60 A	3,97a	10,07 A
8,5 cm de comprimento X 5,5 cm de diâmetro	1	1,80 A	3,18 ab	6,53 B
	3	1,80 A	3,06 ab	6,03 B
	10	1,40 A	2,46 b	3,03 C

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 10 replicatas e as médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente, entre si, ao nível de 1% ou 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Utilizando frascos maiores com 3 explantes por frasco, observou-se que o índice de crescimento dos explantes que se desenvolveram em meio B5 foi maior em relação aos meios MS e WP, embora não tenha sido detectada diferença significativa do ponto de vista estatístico (Tabela 2). O meio basal B5 suplementado com 1,5 mg/L de BAP foi o mais adequado para a multiplicação de brotos. Esse resultado permite afirmar que o cultivo de 3 plântulas no mesmo frasco com 8,5 X 5,5 cm promoveu melhor desenvolvimento "in vitro" do que quando as plântulas são cultivadas isoladamente em frasco 8,5 X 2,5 cm.

Observando resultados da Tabela 3, concluiu-se que plântulas que cresceram agregadas ou não em frasco com 8,5 X 5,5 cm tiveram o mesmo desenvolvimento. Esta informação torna o protocolo mais barato, uma vez que várias plantas podem ser cultivadas no mesmo frasco sem aparente prejuízo para elas. O número de pares de folhas também foi avaliado nesse experimento. Plântulas que cresceram em frasco com 8,5 X 2,5 cm apresentaram número de pares de folhas maior

(10,07 ± 0,89 pares por explante) que todos os outros tratamentos, embora tenha sido observado que o tamanho das folhas foi menor em relação às plântulas que cresceram em frasco de 8,5 X 5,5 cm (Figura 2).

A densidade de explantes de ipeca, cultivada "in vitro", também foi estudada por Pereira et al (1999), que realizaram experimentos de co-cultivo com diferentes espécies de plantas medicinais e verificaram que o cultivo de 3 explantes de ipeca em um mesmo frasco não diferiu significativamente em relação ao cultivo de um explante isolado, quando compararam número de brotos. Por outro lado, um trabalho apresentado por Pereira et al (2000) com batata, mostrou que o cultivo de vários explantes no mesmo frasco favoreceu tanto o índice multiplicação como o tamanho da brotação. Cabe ainda ressaltar, que em cultura "in vitro" de *Artemisia dracunculus* L. var. *sativa*, o cultivo de 3 explantes por frasco e o tamanho do frasco proporcionaram um incremento no número de brotos axilares, quando comparado com o explante isolado (Mackay & Kitto, 1988).

Para compreender esses resultados que diferem entre si, é necessário considerar a relação volume do meio nutritivo X número de explantes X espécie em estudo (Pereira *et al.*, 2000). Grattapaglia & Machado (1998) salientam a importância do tipo de frasco e a quantidade de meio utilizado para o desenvolvimento e crescimento de culturas axênicas, porque afetam a área superficial da interface meio nutritivo/atmosfera, o volume de ar sobre o meio e a profundidade do meio.

**TABELA 4.** Efeito do tempo de crescimento de ipeca em meio semi-sólido no número e comprimento de brotos.

Período de crescimento (dias)	Nº de brotos	Comprimento da brotação (cm)
133	1,47 A	3,72 a
90	1,40 A	2,89 a
60	1,90 A	1,16 b
30	1,37 A	0,82 b

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 10 replicatas e as médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente, entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Dentre os tratamentos apresentados na Tabela 5, verificou-se que o maior índice de sobrevivência foi o das plântulas que cresceram em frasco de 8,5 X 5,5 cm contendo 3 explantes, o que caracteriza esse tipo de frasco o mais adequado para a multiplicação em meio semi-sólido e, posterior, aclimatação. O segundo melhor tratamento foi a densidade de 10 explantes no mesmo tipo de frasco. A partir desses resultados, pode-se afirmar que a densidade de inóculo influencia no processo de aclimatação e o cultivo de três ou mais plântulas favoreceu a adaptação das mesmas à aclimatação, elevando a taxa de sobrevivência.

#### Sistema em meio líquido.

Os explantes que cresceram por um período de 30 dias, em meio líquido, mostraram melhor desenvolvimento do que os explantes inoculados em meio semi-sólido. A permanência dos explantes em meio de cultura por 60 dias, sem troca de meio nutritivo, resultou em um decréscimo tanto no índice de brotação quanto no tamanho das brotações, quando comparado com o desenvolvimento de plântulas que permaneceram por apenas 30 dias (Tabela 6). Em ambos períodos de crescimento, as plântulas apresentaram perda de folhas e algumas partes necrosadas. Alvard *et al.* (1993) realizaram a cultura "in vitro" de banana em meio líquido e não obtiveram proliferação, os autores sugerem que a falta de oxigênio nos explantes, em contato permanente com o meio nutritivo, pode ser um fator limitante para o

Os melhores tempos de cultivo para *P. ipecacuanha* que cresceram sob condição "in vitro" em meio semi-sólido foram de 133 e 90 dias, pois promoveram maior comprimento das brotações, mesmo não diferindo significativamente em número de brotos (Tabela 4). Entretanto, no período de 133 dias, as plântulas apresentaram raízes e queda de folhas, demonstrando que a cultura estava em senescência.

crescimento; além disso, os explantes também apresentaram numerosas zonas de necrose e perda de folhas.

Explantes subcultivados por dois períodos de 30 dias em meio líquido (com uma troca de meio aos primeiros 30 dias) apresentaram perda de folhas e a comprimento dos mesmos foi inferior quando comparado com a cultura de 30 dias. Analisando ainda a Tabela 6, e confrontando os resultados das culturas de 60 dias e das culturas de dois períodos de 30 dias, pode-se afirmar que é necessária a substituição do meio de cultura, porque isso promove o dobro de número de brotação.

#### Sistema de imersão temporária.

A primeira montagem do experimento em frascos de 9L, com período de 30 dias, permitiu a coleta dos dados da primeira repetição (Tabela 7). Entretanto, as inúmeras tentativas posteriores de montar o mesmo experimento falharam devido à contaminação, que foi responsável pela grande perda de material clonal. A utilização do sistema de imersão temporária em frascos de 1L, por 30 dias, permitiu o desenvolvimento dos explantes de modo que o índice de brotação foi de  $0,51 \pm 0,05$  brotos/explante e a comprimento de  $1,35 \pm 0,0007$  cm. O experimento com 90 dias de desenvolvimento mostrou um incremento tanto no índice de brotação ( $2,30 \pm 1,10$  brotos/explante) como no comprimento ( $2,08 \pm 0,12$  cm). Durante esse último tempo de cultura, houve a necessidade de apenas uma troca de meio nutritivo após 40 dias da inoculação, devido à oxidação causada pelos explantes.

**TABELA 5.** Efeito do tipo de frasco e da quantidade de explantes na aclimatação de *P. ipecacuanha* em meio semi-sólido.

Dimensões do frasco	Densidade de Explantes	Porcentagem de sobreviventes (%)
8,5 cm de altura X 2,5 cm de diâmetro	1 explante	22,23 B
8,5 cm de altura X 5,5 cm de diâmetro	1 explante 3 explantes 10 explantes	47,77 B 96,20 A 90,97 A

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 5 parcelas (30 replicatas por parcela) e as médias seguidas de letras não diferem significativamente, entre si, ao nível de 1 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

**TABELA 6.** Efeito de reguladores de crescimento no número e comprimento de brotação de ipeca "in vitro" em meio líquido.

Meio basal + reguladores (mg/L)	Nº de brotos	Comprimento de brotação (cm)
<b>30 dias de cultura</b>		
MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	2,37 A	0,72 a
MS + 1,0 BAP + 0,1 AIA	1,50 B	0,21 b
<b>60 dias de cultura</b>		
MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	1,10 A	0,41 a
MS + 1,0 BAP + 0,1 AIA	0,47 A	0,42 a
<b>2 períodos de 30 dias</b>		
MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	2,27 A	0,49 a
MS + 1,0 BAP + 0,1 AIA	0,30 B	0,25 a

Os dados foram obtidos a partir de 3 repetições com 10 replicatas e as médias seguidas das mesmas letras não diferiram significativamente, entre si, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Yoshimatsu & Shimomura (1991) estabeleceram protocolo de micropopulação em larga escala para ipeca, utilizando frasco do tipo fermentador ("rotating drum fermenter") e obtiveram 10 brotos por segmento, aproximadamente. Os autores também utilizaram outro tipo de fermentador com aeração ("airlift type fermenter"), em uma pesquisa preliminar, e o resultado foi a inibição da brotação, que pode ser explicada pelo estresse hidrodinâmico produzido pela aeração. O estresse hidrodinâmico consiste no contato contínuo entre o explante e o meio de cultura. No sistema de imersão temporária de *P. ipecacuanha* apresentado neste trabalho, apesar dos explantes não permanecerem constantemente em contato com o meio líquido, ainda assim pode ter ocorrido estresse hidrodinâmico produzido pela aeração. O estresse hidrodinâmico consiste no contato contínuo entre o explante e o meio de cultura. No sistema de imersão temporária de *P. ipecacuanha* apresentado neste trabalho, apesar dos explantes não permanecerem constantemente em contato com o meio líquido, ainda assim pode ter ocorrido estresse hidrodinâmico. Talvez seja necessária uma redução no tempo de exposição, o que poderá promover maior número de brotação, se isso não prejudicar a absorção dos nutrientes contidos no meio de cultura.

O sistema de imersão temporária resolveu o problema de abscisão foliar, uma vez que as plântulas estavam íntegras no final da cultura, sem pontos de necrose. Em relação ao transplantio e aclimatação, as plântulas advindas desse sistema

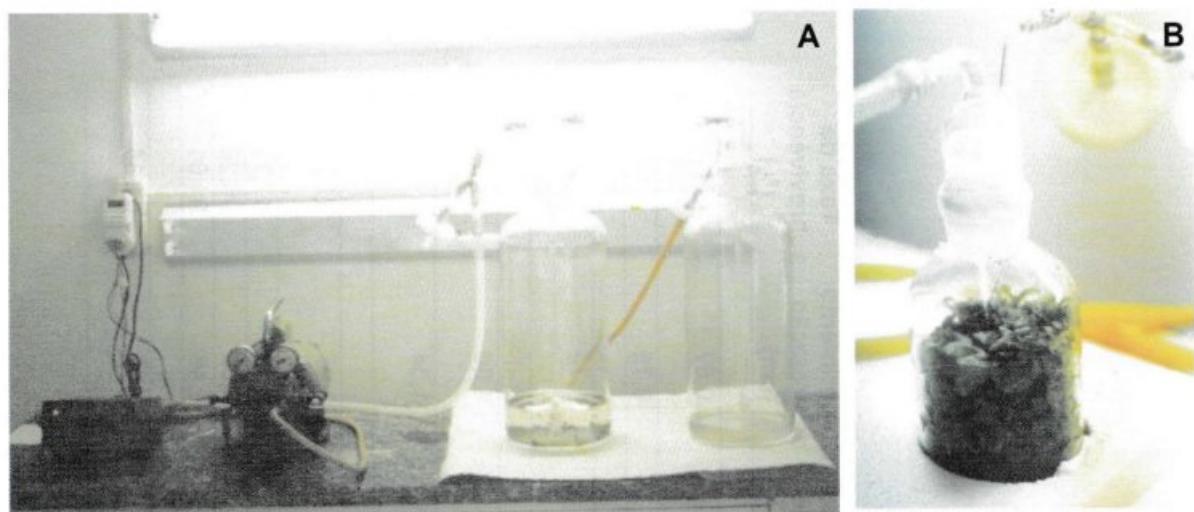
apresentaram uma taxa de sobrevivência de 51,85 %. A transferência foi realizada conforme procedimento descrito no sistema semi-sólido.

A Tabela 7 mostra a comparação entre os sistemas de cultivo de ipeca dos experimentos apresentados. Considerando todos os sistemas com período de crescimento de 30 dias, o sistema em meio líquido apresentou melhor índice de brotação, apesar de ter ocorrido a abscisão foliar e sinais de necrose na extremidade das plântulas. Para o período de 90 dias de crescimento, pode-se afirmar que o sistema de imersão temporária é vantajoso e promissor para a produção em larga escala, pois utiliza 4 mL de meio nutritivo líquido por explante, caracterizando uma diminuição de 33% do meio utilizado no sistema semi-sólido e 60% no sistema em meio líquido. Isso representa uma redução no custo do meio, maior agilidade na preparação do meio nutritivo e ainda conta com a vantagem da automação que reduz custos com a mão de obra.

Recentemente, alguns trabalhos apresentam protocolos eficientes de micropopulação com a utilização de um sistema denominado de imersão temporária, cujo princípio é a imersão dos propágulos por tempo determinado em meio de cultura líquido (Cabasson *et al*, 1997; Alvard *et al*, 1993; Adelberg *et al*, 1997). Segundo especialistas, as vantagens desse sistema, sobre o método convencional de cultivo em meio semi-sólido, estão relacionadas com as condições físicas criadas no recipiente de cultivo, ou seja, contato direto e renovado do explante com o meio de cultura

**TABELA 7.** Comparação dos diferentes sistemas de micropromoção de *P. ipecacuanha*.

Sistema	Tipo de frasco	Densidade de inóculo por frasco	Quantidade de meio nutritivo (mL)	Composição do meio nutritivo	Nº. de brotos por explante	Comprimento da brotação (cm)	Taxa de sobrevivência (%)
<b>30 dias de cultura</b>							
<b>Semi-sólido</b>	8,5 X 2,5 cm	1	10	B5 + 1,0 CIN + 0,1 AIA	1,40	0,67	-
	8,5 X 5,5 cm	3	20	B5 + 1,5 BAP	2,07	0,75	-
<b>Líquido</b>	Erlenmeyer 250 mL	10	100	MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	2,37	0,72	-
<b>Imersão temporária</b>	9 L	200	2000	MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	0,35	1,36	-
	1 L	50	200	MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	0,68	1,34	-
<b>90 dias de cultura</b>							
<b>Semi-sólido</b>	8,5 X 2,5 cm	1	10	MS + 1,5 BAP + 0,5 AG <sub>3</sub>	1,60	3,97	22,23
		1	20	Idem	1,80	3,18	47,77
	8,5 X 5,5 cm	3	20	Idem	1,80	3,06	96,20
		10	20	Idem	1,40	2,46	91,01
<b>Imersão temporária</b>	1 L	50	200	Idem	2,30	2,08	51,85



**FIGURA 1.** Sistemas de imerso temporária para *P. ipecacuanha*. A. Frascos de 9L, vista panorâmica do sistema montado e funcionando. B. Frasco de 1L.



**FIGURA 2.** Aspecto das plântulas da espécie *P. ipecacuanha* “in vitro”. A. Plântulas advindas de frasco 8,5 X 2,5 cm. B. Plântulas advindas de frasco 8,5 X 5,5 cm com 1 explante. C. Plântulas advindas de frasco 8,5 X 5,5 cm com 3 explantes

em cada imersão, o que possibilita absorção mais eficiente dos nutrientes e renovação completa da atmosfera dentro do recipiente a intervalos regulares, pois ocorre constante dispersão e eliminação de gases que podem estimular a senescência do tecido como o etileno (Pérez Ponce, 1998).

Considerando a taxa de sobrevivência de plântulas "in vitro" de ipeca, o sistema em meio semi-sólido apresentou cerca de 96% de sobrevivência contra 52% do sistema de imersão temporária. A relação custo/benefício deve ser considerada neste caso. Se por um lado, o meio líquido representa uma economia, a automação necessária no sistema de imersão temporária constitui um gasto adicional. Portanto, novas pesquisas são importantes para definir o melhor método de cultura de tecidos de plantas para a propagação em massa dessa espécie.

É importante salientar que as plantas provenientes dos sistemas semi-sólido, líquido e imersão temporária são derivadas de meristemas organizados, isto é, células geneticamente estáveis. Como consequência, populações clonais idênticas podem ser geradas para a produção em larga escala de plantas (Vasil, 1994), característica que auxilia no manejo de plantas medicinais.

#### AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio concedido através da bolsa de Formação de Pesquisador II – Mestrado para a realização do projeto.

A Universidade de Ribeirão Preto pelo auxílio material para a realização do projeto.

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADELBERG, J.W., DESAMERO, N.V., HALE, S.A. *et al.* Long-term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid / membrane system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.48, p.1-7, 1997.
- ALVARD, D., COTE, F., TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.32, p. 55-60, 1993.
- CABASSON, C., ALVARD, D., DAMBIER, D. *et al.* Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.50, p.33-7, 1997.
- RODRIGUES, I.A., ALVES, S.M., NETO, G.R. *et al.* *Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido*, Belém-PA. Brasília: EMBRAPA-CPATU/JICA, 1996. p.240-6.
- DIGITAL REVERSE SMR – 07. LABTEC EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA. Departamento de Química, Universidade de Ribeirão Preto.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/redflora/>
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.151-8, 1968.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI, 1998. 864p.
- IDEDA, K., TESHIMA, D., AOYAMA, T. *et al.* Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Reports*, v.7, p.288-91, 1988.
- JHA, S., JHA, T.B. Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Plant Cell Reports*, v.8, p. 437-9, 1989.
- 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.523-6, 1994.
- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, v.30, p.421-7, 1980.
- MACKAY, W.A., KITTO, S.L. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French Tarragon. *Journal of the American Society Horticulturae Science*, v.113, n.2, p.282-7, 1988.
- MURASHIGE, I., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-97, 1962.
- PEREIRA, A.M.S., BERTONI, B.W., PEREIRA, P.S. *et al.* The effect of "in vitro" co-cultivation of *Cephaelis ipecacuanha*, *Eclipta alba* and *Oryza sativa* on plant development and yield of emetine, wedelolactone and demethylwedelolactone. *Acta Horticulturae*, v.502, p.307-11, 1999.
- PEREIRA, J.E.S., FORTES, G.R.L., SILVEIRA, A.O. Efeito da densidade de inoculação na multiplicação "in vitro" da batata. *Horticultura Brasileira*, v.18, supl. jul., 2000.
- PÉREZ PONCE, J.N., GONZÁLEZ, E.A.J., PEÑALVER, D.A. Aumento de la eficiencia en la micropagación. In: PÉREZ PONCE, J.N. (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1988. 400p.
- TREASE, G.E., EVANS, W.C. *Pharmacognosy*. 13.ed. London: Baillière Tindal, 1989. p.595-9.
- VASIL, I.K. Automation of plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.39, p.105-8, 1994.
- YOSHIMATSU, K., SHIMOMURA, K. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports*, v.9, p.567-70, 1991.
- YOSHIMATSU, K., SHIMOMURA, K. Plant regeneration on cultured roots segments of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Plant Cell Reports*, v.14, p.98-101, 1994.
- YOSHIMATSU, K., AOI, K., SHIMOMURA, K. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha* (II): characteristics of regenerated plants field-cultivated in two districts. *Journal of Plant Physiology*, v.144, p.22-5, 1994.