

SCHEIBE, J., LANG, A. Lettuce seed germination: Effects of high temperature and repeated far-red treatment in relation to phytochrome. *Photochemistry and Photobiology*, v. 9, p. 143-150, 1969.

SPEER, H.L. Some aspects of the function of the endosperm during the germination of lettuce seeds. *Canadian Journal of Botany*, v. 52, p. 1117-1121, 1974.

STEINER, J.J.; OPOKU-BOATENG. Natural season-long and diurnal temperature effects on lettuce seed production and quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 116, p. 396-400, 1991.

SUNG, Y. *Identification and characterization of thermotolerance in lettuce seed germination*. Gainesville: University of Florida, 1996. (Tese doutorado).

SUNG, Y.; CANTLIFFE, D.J.; NAGATA, R.T. Seed developmental temperature regulation of thermotolerance in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 123, p. 700-705, 1998a.

SUNG, Y., CANTLIFFE, D.J.; NAGATA, R.T. Using a puncture test to identify the role of seed coverings on thermotolerant lettuce seed germination. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 123, p. 1102-1106, 1998b.

THOMPSON, P.A.; COX, S.A.; SANDERSON, R.H. Characterization of the germination responses to temperature of lettuce (*Lactuca sativa* L.) achenes. *Annals of Botany*, v. 43, p. 319-334, 1979.

VALDES, V.M.; BRADFORD, K.J.; MAYBERRY, K.S. Alleviation of thermodormancy in coated lettuce seeds by seed priming. *HortScience*, v. 20, p. 1112-1114, 1985.

WURR, D.C.E.; FELLOWS, J.R. The effects of grading and 'priming' seeds of crisp lettuce cv. Saladin, on germination at high temperature, seed 'vigour' and crop uniformity. *Annals of Applied Biology*, v. 105, p. 345-352, 1984.

SABÁ, R.T.; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 1, p. 106-109, março 2.002.

## Micropropagação do jaborandi.

**Renata Tuma Sabá<sup>1</sup>; Osmar Alves Lameira<sup>1</sup>; José Magno Queiroz Luz<sup>2</sup>; Ana Paula do Rosário Gomes<sup>1</sup>; Renato Innecco<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Amazônia Oriental, Travessa Dr. Enéas Pinheiro SN, 66.095-100 Belém-PA. E-mail:renata@hotmail.com; <sup>2</sup>UFU-ICIAG, C. Postal 593, 38.400-902 Uberlândia-MG; <sup>3</sup>UFC-Dep. Fitotecnia, C. Postal 12.168, 60.356-001 Fortaleza-CE

### RESUMO

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf) é uma árvore da família Rutaceae destacando-se por intensivo uso na indústria farmacêutica através de um dos seus princípios ativos, pilocarpina, utilizado no controle do glaucoma. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação de jaborandi. Os ápices e segmentos caulinares utilizados na micropropagação foram retiradas das plântulas germinadas *in vitro* cultivadas em meio MS com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento. O tratamento com 3% de NaOCl (hipoclorito de sódio) e na ausência de AG<sub>3</sub> (ácido giberélico) promoveu maior porcentagem de germinação e menor índice de contaminação. O segmento apical foi o mais eficiente na emissão e comprimento médio de brotos de jaborandi sob diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e diferentes combinações de zeatina e cinetina.

**Palavras-chave:** *Pilocarpus microphyllus*, Rutaceae, pilocarpina, reguladores de crescimento, *in vitro*.

### ABSTRACT

#### Micropropagation of the jaborandi.

The jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf.) is a tree belonging to the Rutaceae family and is well known for its intensive use in the pharmaceutical industry through one of its most active principles, the pilocarpine, used to control glaucoma. The purpose of this research is to develop micropropagation protocols. Shoot tips and stem segments used in the micropropagation were removed from the seedlings grown *in vitro* and cultivated in MS medium with different concentrations and combinations of growth regulators. A treatment with 3% of NaOCl and the lack of GA<sub>3</sub> caused a higher percentage of germination and a lower rate of contamination. The apical segment was the most efficient for shoot emission with best average length under different concentrations of BAP and different combinations of zeatin and kinetin.

**Keywords:** *Pilocarpus microphyllus*, Rutaceae, pilocarpine, growth regulators, *in vitro*.

(Aceito para publicação em 4 de dezembro de 2.001)

A flora Amazônica é rica em espécies medicinais com grande potencial econômico para a extração de princípios ativos. Normalmente, as plantas medicinais desta região são exploradas através do extrativismo, o que aliado à expansão da fronteira agrícola na região, em áreas de populações de ocorrência natural dessas espécies, vem provocando erosão genética e colocando-as em risco de extinção.

Muitas espécies de ocorrência natural da região amazônica são largamente usa-

das na medicina popular. Dentre as espécies medicinais produtoras de princípios ativos de grande interesse mundial destaca-se o jaborandi, que é utilizado em produtos farmacológicos. Das folhas desta planta são extraídos sais de pilocarpina, um alcalóide utilizado na fabricação de um colírio indicado para o controle do glaucoma (Santos *et al.*, 1988).

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf) é uma planta arbustiva e bastante ramificada pertencente à família Rutaceae, apresentando altura média de 2 m, com folhas compostas medindo, em média, 40 cm e folíolos coriáceos, de forma lanceolada. As flores são pequenas dispostas em ráculos (cachos) compactos. Os frutos são dispostos em cachos brancos contidos em cápsulas de córtex acinzentado e liso (Marques & Costa, 1994). No Brasil, ocorre principalmente na região Leste da Amazônia e nas regiões do Centro-Sul e Nordeste (Marques & Costa, 1994).

Esta planta, conhecida por seu intensivo uso na indústria farmacêutica, destaca-se no controle do glaucoma, devido à pilocarpina, alcalóide encontrado em suas folhas. O preço médio de comercialização do jaborandi nos Estados maiores produtores, Pará, Maranhão e Piauí é de R\$ 747,63 por tonelada de matéria seca (IBGE, 1996). Esta substância não tem efeitos colaterais, ao contrário das demais que visam o controle do glaucoma. A coleta contínua de folhas de jaborandi vem resultando na redução significativa das populações de ocorrência natural, colocando esta espécie em risco de extinção.

A propagação do jaborandi por sementes é viável e a germinação ocorre entre 10 e 30 dias. Entretanto, a propagação assexuada ainda não é um método recomendado devido à inadequação dos métodos convencionais como o enraizamento de estacas e enxertia (Marques & Costa, 1994).

A cultura de tecidos vegetal tem sido considerada ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (Abreu, 1998). A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998).

A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários autores (Pinto *et al.*, 1994; Lameira, 1997) e incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando a coleta de plantas saudáveis (Kajiki, 1996). Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação a partir de segmento caulinar de jaborandi.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimento 1: Germinação *in vitro* de sementes de jaborandi

Sementes de jaborandi provenientes do banco de germoplasma da Embrapa

Amazônia Oriental serviram como fonte de explante para a obtenção de plântulas assépticas *in vitro*. As mesmas foram coletadas após a sua maturação e, em seguida, levadas para o laboratório de biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, para desinfestação. No processo de desinfestação do material foram utilizadas sementes com e sem casca. Em ambos tratamentos as mesmas foram lavadas com água corrente por 30 a 60 minutos e logo após mergulhadas em álcool puro (96<sup>o</sup>GL) durante 3 minutos. A seguir foram mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% e 3% por 20 minutos; sendo 10 minutos sob agitação e 10 minutos em câmara de fluxo laminar em repouso. Posteriormente foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada.

Após a assepsia, as sementes de jaborandi foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio Murashige e Skoog (MS) (1962) com metade das concentrações dos sais (½ MS), solidificado com 0,7% de ágar, sem suplemento de regulador de crescimento e ½ MS + 0,7% de ágar + 4,33 mM AG<sub>3</sub> (ácido giberélico); onde permaneceram até a germinação.

O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem, e a esterilização foi feita em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Em cada tubo foi inoculada uma semente, sob câmara de fluxo laminar. A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1°C, umidade média em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas luz branca fria sob 25 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição formada por quatro tubos com uma semente por tubo. Após 30 dias da inoculação, foram avaliadas as percentagens de germinação e contaminação, e as médias comparadas pelo teste de Duncan a nível de 5% de significância.

### Experimento 2: Micropropagação de jaborandi

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Os explantes utilizados nos experimentos

seguintes foram retirados das plântulas germinadas *in vitro*, de acordo com o experimento anterior.

Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na regeneração de brotos de jaborandi a partir de segmento caulinar

Das plantas germinadas *in vitro* foram excisados os segmentos nodal e apical com aproximadamente 5 mm de comprimento e inoculados em meio de cultura MS solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com diferentes concentrações de BAP (2,22; 4,44; 6,66; 8,88 e 11,10 mM) e pH de 5,8 antes da autoclavagem. Em seguida foram levados para sala de crescimento sob as condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado para dois explantes (segmentos nodal e apical) com cinco níveis de BAP para cada um, com cinco repetições, sendo que cada repetição foi composta de cinco unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída de dois frascos com quatro explantes por frasco. Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliados o número e o comprimento de brotos e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

### Efeitos da cinetina (KIN) e zeatina (ZEA) na regeneração de brotos de jaborandi a partir de segmento caulinar

Segmentos nodal e apical de plântulas germinadas *in vitro* foram excisados com aproximadamente 5 mm de comprimento e, em seguida, inoculados em tubos de ensaio com 10 ml de meio MS líquido, com ponte de papel, suplementado com diferentes concentrações de KIN (0; 0,46; 2,32 e 9,29 mM) combinado com 0,45 mM de ZEA. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os tubos contendo os explantes foram acondicionados em sala de crescimento sob as mesmas condições do experimento anterior.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (tipos de explantes) x 4 (reguladores de crescimento), com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de quatro unidades experimentais e cada unidade experimental de um tubo de

**Tabela 1.** Percentagem de germinação e de contaminação de sementes de jaborandi germinadas *in vitro* sob diferentes tratamentos de NaOCl e na presença ou ausência de AG<sub>3</sub>. Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2000.

	% de germinação		% de contaminação	
	Ausência AG <sub>3</sub>	Presença AG <sub>3</sub>	Ausência AG <sub>3</sub>	Presença AG <sub>3</sub>
2% NaOCl	60,40 bA	65,45aA	20,61	25,00
3% NaOCl	93,30aA	60,40aB	6,70	20,61

NaOCl= hipoclorito de sódio AG<sub>3</sub> = ácido giberélico

Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra minúscula e na mesma linha pela mesma letra maiúscula não diferiram entre si pelo teste de Duncan em nível de 5 % de significância.

**Tabela 2.** Valores médios do número e comprimento (cm) de brotos de jaborandi em função de diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2000.

BAP ( M)	Ápice		Nodal	
	Nº médio de brotos	Comprimento médio de brotos (cm)	Nº médio de brotos	Comprimento médio de brotos (cm)
2,22	0,6 ± 0,19b	2,0 ± 0,45ab	1,4 ± 0,26a	1,7 ± 0,21ab
4,44	0,7 ± 0,26b	2,5 ± 0,36ab	1,2 ± 0,41a	2,0 ± 0,23a
6,66	1,8 ± 0,34a	3,0 ± 0,34a	0,8 ± 0,43a	1,5 ± 0,24ab
8,88	1,1 ± 0,37ab	1,5 ± 0,27b	0,8 ± 0,54a	1,0 ± 0,18b
11,11	1,0 ± 0,42ab	2,0 ± 0,42ab	0,6 ± 0,29a	1,8 ± 0,23ab

BAP = 6-benzilaminopurina

Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância.; ± erro padrão.

ensaio com um explante. Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliados o número e o comprimento de brotos e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Germinação *in vitro* de sementes de jaborandi

Ocorreu efeito significativo somente para a percentagem de germinação, na interação entre o NaClO e AG<sub>3</sub>. O tratamento com 3% de NaOCl e na ausência de AG<sub>3</sub> promoveu maior percentagem de germinação quando comparado ao tratamento com 2% de NaOCl na ausência de AG<sub>3</sub> (Tabela 1). Provavelmente, o AG<sub>3</sub> não influenciou a germinação das sementes. É possível que o AG<sub>3</sub> não apresente efeito sobre a germinação de jaborandi devido ao fato de que este processo fisiológico possa ser controlado por mais de uma substância promotora, além do AG<sub>3</sub>. Segundo a teoria de Khan (1971), as citocininas teriam um papel permissivo na regeneração da dormência aumentando a sensibilidade das sementes à ação das giberelinas.

Os menores valores do nível de germinação de sementes observados na presença de AG<sub>3</sub> também podem ser devidos a um efeito nocivo de altas concentrações de AG<sub>3</sub>, tendo em vista que algumas sementes já possuem este regulador em níveis endógenos adequados para o controle fisiológico da germinação. As sementes de jaborandi provavelmente devem apresentar um nível endógeno de AG<sub>3</sub> suficiente para o controle da germinação, dispensando, portanto, tratamentos exógenos com giberelinas.

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com os obtidos por Blank *et al.* (1997) que não verificaram diferenças sobre a germinação de sementes *ex vitro* de *Campomanesia rufa* na presença ou ausência de AG<sub>3</sub> e por Vieira *et al.* (1998) que não observaram a completa germinação de semente de braquiarião (*Brachiaria brizantha*) com a aplicação do AG<sub>3</sub>. Entretanto, Subrata *et al.* (1997) estudando a regeneração de plântulas *in vitro* a partir de sementes de *Dendrocalamus strictus*, verificaram que concentrações de AG<sub>3</sub> de 0,5 a 2,0 mg.L<sup>-1</sup> foram mais efetiva no au-

mento da germinação em meio MS líquido ou semisólido.

Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) na regeneração de brotos de jaborandi a partir de segmento caulinar

De acordo com a Tabela 2, verificou-se que não houve efeito das concentrações de BAP, apenas para o número de brotos no explante nodal. Para o segmento apical verificou-se uma maior emissão de brotos (1,8 brotos/explante) e comprimento médio de brotos (3,0 cm) sob a concentração de 6,66 mM de BAP, porém só diferiu significativamente das concentrações de 2,22 e 4,44 mM de BAP que promoveram menor emissão de brotos. A concentração de 8,88 mM de BAP, promoveu o menor crescimento dos brotos que atingiram apenas 1,5 cm de comprimento. Lameira *et al.* (1994) verificaram na regeneração de brotos de *Cephaelis ipecacuanha* que a concentração de 6,66 mM de BAP induziu maior emissão de brotos (5,4 brotos/explante).

Com relação aos segmentos nodais, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de BAP testadas para a emissão de brotos. Entre-

tanto, foram verificados efeitos significativos sobre o crescimento de brotos; porém as concentrações de BAP pouco diferiram, sendo o menos eficiente o tratamento contendo 8,88 mM de BAP.

A menor emissão de brotos no segmento nodal pode ser devida a diversos fatores. Provavelmente, o nível de auxina endógena presente no segmento apical inibiu a emissão de brotos axilares a partir do segmento nodal, caracterizando a dominância apical exercida pelo segmento apical. Outro fator a ser considerado é a hipótese de que a proliferação de brotos *in vitro* pode ser maximizada com o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento (Skoog & Miller, 1957). Provavelmente a proliferação de brotos de jaborandi necessita da combinação de citocininas com auxinas.

É interessante ressaltar que os níveis de reguladores de crescimento adequados para proporcionar a maior quantidade de brotos emitidos, variam de acordo com o genótipo da planta considerada, e que devem ser determinadas para cada caso. Entretanto, os dados obtidos concordam com a afirmação de Pierik *et al.* (1982) de que é fundamental a utilização de citocinina no meio de cultura para obter boas taxas de multiplicação. A escolha de citocinina e da concentração utilizada dependerá do material utilizado.

Efeitos da cinetina e zeatina na regeneração de brotos de jaborandi a partir de segmento caulinar em meio MS líquido

Não houve interação entre as concentrações de reguladores de crescimen-

to com o tipo de explante, bem como, não houve diferença significativa entre as concentrações dos reguladores de crescimento. Entretanto, houve diferença significativa entre o tipo de explante. O segmento apical foi o mais eficiente produzindo em média até 3,0 brotos por explante, com 7,2 mm de comprimento, enquanto o segmento nodal apresentou 1,0 broto por explante, com tamanho médio de 1,3 mm. Este resultado discorda de Pinto *et al.* (1994) que observaram em brotos de *Kielmeyera coriacea* que segmentos nodais apresentaram maiores valores quanto à produção média de brotações. Isso demonstra que o tipo de explante a ser selecionado dependerá da espécie.

## LITERATURA CITADA

- ABREU, I.N. Propagação in vivo e in vitro, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1998. 101 p. (Dissertação mestrado).
- BLANK, A.F.; BLANK, M.F.A.; ALVARENGA, A.A.; LAMEIRA, O.A. Efeito do armazenamento em refrigerador na germinação de sementes de *Campomanesia rufa*. In: CONGRESSO DE FISILOGIA VEGETAL, 6. Resumos... Belém: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, p. 487, 1997.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Ministério da Agricultura, v. 1, p. 183-242, 1998.
- IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura. v. 11, p. 1-305, Rio de Janeiro, 1996.
- KAJIKI, F.O. Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Piracicaba: ESALQ, 1996. 96 p. (Dissertação mestrado).
- KHAN, A.A. Cytokinins: Permissive role in seed germination. *Science*, v. 171, p. 853-859, 1971.
- 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, 1994.
- LAMEIRA, O.A. *Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de rescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva - baleeira* (Cordia verbenaceae L.) Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1997. 88 p. (Tese doutorado).
- MARQUES, M.E.T.; COSTA, J.P.C. Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*). Belém: EMBRAPA-CPATU, 1994. 4 p. (Recomendações Básicas, 27).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; VERHAEGH, J.A.W.; WOUTERS, A.N. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* in vitro. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v. 30, n. 4, p. 341-346, 1982.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação in vitro de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, 1994.
- SANTOS, J.H.R.; GADELHA, J.W.R.; CARVALHO, M.L.; PIMENTEL, J.V.F.; JÚLIO, P.V.M. Controle alternativo de pragas e doenças. Fortaleza: EUFC, 1988. 216 p.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia for Society Experimental Biology*, v. 11, p. 118-131, 1957.
- SUBRATA, M.; ANJAN, G.; MAITY, S.; GHOSH, A. Efficient plant regeneration from seeds and nodal segments of *Dendrocalamus strictus* using in vitro technique. *Indian Forester*, v. 123, n. 4, p. 313-318, 1997.
- VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F.; BARROS, R.S. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de *Braquiaria* CV. *Marandu*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 10, n. 2, p. 143-148, 1998.