

LAURA BECKER

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA IN VIVO DE *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. E IN VITRO, INDUÇÃO DE CALOS, NUTRIÇÃO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES NA ESPÉCIE *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

P 30254

MFW29341

LAURA BECKER

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA IN VIVO DE *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. E IN VITRO, INDUÇÃO DE CALOS, NUTRIÇÃO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES NA ESPÉCIE *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UFLA

Becker, Laura.

Propagação vegetativa in vivo de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e in vitro, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides na espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras) / Laura Becker. -- Lavras: UFLA, 1997.

96p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Quebra-pedra - Adubação. 2. Alcalóide. 3. Propagação in vivo. 4. Propagação in vitro. 5. *Phyllanthus niruri* L. 6. *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.95

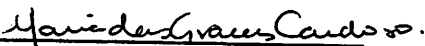
-633.88395

LAURA BECKER

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA IN VIVO DE *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. E IN VITRO, INDUÇÃO DE CALOS, NUTRIÇÃO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES NA ESPÉCIE *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 23 de outubro de 1997.


Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Cardoso
(Coorientadora)


Prof. Dr. Antônio Eduardo Furtini Neto


Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)

ORAÇÃO DA SERENIDADE

Concedei-nos Senhor,
a serenidade necessária para aceitar
como são as coisas que não podemos modificar.
Coragem para modificar aquelas que podemos,
e sabedoria para distinguir uma das outras.

Aos meus pais: Nair e Antônio
Meus irmãos: Maria Cacilda,
Luiz, Maria Lúcia, Inês e
Joana D'Arc

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, à Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG, e Universidade Federal de Lavras - UFLA, por meio do Departamento de Biologia, de Agricultura e Ciências dos Solos, pela oportunidade de incentivo financeiro, educacional e condições oferecidas para a realização do curso.

Aos professores José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Antônio Eduardo Furtini Neto, e Maria das Graças Cardoso pela valiosa orientação, apoio e amizade.

Aos professores que participaram da pré-banca de defesa de dissertação Antônio Eduardo Furtini Neto e Josirley de Fátima Corrêa pela orientação, compreensão, paciência e amizade.

Ao professor Custódio Donizete Santos pela atenção e importante orientação na quantificação dos alcalóides totais.

Em especial a: Alexandre (Lula), Ana Cardoso, Ana Gabriela, Ana Hortência, André (Póstumo), Arie, Carla, Carlos, Cícero, Cláudio, Dartanhan, Dênis, Edgar, Élen, Eloise, Evaldo, Evaristo, Fábio, Fátima, Flávia, Gidelma, Gina, Ilka, Irací, Izonel, Jannayna, Jeferson, Josenilda, Luciano, Lucivane, Marcel, Márcia Martins, Marcinha, Marly Costa, Marly Coelho, Marlon, Maurício, Mauro, Moemy, Osmar, Paulino, Paulo Henrique (Rib. Preto), Poliana, Rinã, Silvana, Solange, Vantuil, Vespasiano, Vilma, Walter, Yoko.

Aos bibliotecários da UFLA pela atenção dispensada.

À todos que sem saberem, me proporcionaram alegria por um simples sorriso, abraço, cumprimento, frases de incentivo, ou por apenas existirem.

Àqueles também que quando eu pedi ou quando me viram precisar, me deram a ajuda necessária. À todos que aceitaram a minha amizade mesmo conhecendo os meus defeitos, a fim de que chegasse ao término deste curso.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1.1 Caracterização geral das espécies	2
1.1.2 Atividade medicinal	4
1.2 OBJETIVO GERAL	5
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO II - ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE QUEBRA-PEDRA (<i>Phyllanthus corcovadensis</i> Muell. Arg.) IN VIVO	10
RESUMO	10

	Página
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1.1 Bases morfológicas do enraizamento	11
2.1.2 Bases fisiológicas do enraizamento	12
2.1.3 Ambiente, dosagem, tempo de exposição e veículo para o enraizamento	15
2.2 OBJETIVO	18
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
2.5 CONCLUSÕES	26
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO III - CALAGEM E ADUBAÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO <i>Phyllanthus niruri</i> L E PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES TOTAIS.	30
RESUMO	30
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	31
3.1.1 Relações da nutrição mineral de plantas com a produção de metabólitos secundários	32
3.1.2 Alcalóide.....	36
3.2 OBJETIVO	38
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.3.1 Substrato	39
3.3.2 Tratamentos	40
3.3.3 Preparo das mudas	41
3.3.4 Condução do experimento	42
3.3.5 Características avaliadas	44
3.3.6 Análises estatísticas	45
3.3.7 Extração e quantificação dos alcalóides	45

	Página
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.4.1 Crescimento das plantas	47
3.4.2 Teores e acúmulo de nutrientes	51
3.4.3 Extração e quantificação de alcalóides	56
3.5 CONCLUSÕES	61
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO IV - INDUÇÃO DE CALOS E PROPAGAÇÃO IN VITRO DO QUEBRA-PEDRA (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	67
RESUMO	67
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	68
4.2. OBJETIVO	72
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	73
4.3.1 Experimento.1: Efeito de diferentes reguladores de crescimento e do ambiente na indução de calos de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	73
4.3.1 Experimento.2: Efeito da interação de AIB e ANA na indução de calos de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	75
4.3.2 Experimento.3: Indução de brotações de segmentos nodais de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	76
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.4.1 Experimento.1: Efeito de diferentes reguladores de crescimento e do ambiente na indução de calos de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	77
4.4.1 Experimento.2: Efeito da interação de AIB e ANA na indução de calos de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	83
4.4.2 Experimento.3: Indução de brotações de segmentos nodais de quebra-pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	85
4.5 CONCLUSÕES	88
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE	92

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Análise química e textural do substrato antes da instalação do experimento, realizada pelos Laboratórios de Análise do Solo - DCS - UFLA, Lavras - MG, 1996	40
2	Análises química do substrato após a aplicação dos tratamentos, realizadas pelos Laboratórios de Análise do Solo - DCS. UFLA, Lavras - MG, 1996	43
3	Teor de macronutrientes na MSPA de plantas da espécie <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997	53
4	Conteúdo de macronutrientes da matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência de utilização de N pelas plantas da espécie <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997	55
5	Equações de regressão do conteúdo de macronutrientes e eficiência de utilização de nitrogênio na matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas da espécie <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997	56

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais, e suas formas derivadas constituíram durante séculos a base da terapia generalizada das doenças. Porém, com a evolução da química e as aplicações da química orgânica, a partir deste século, modificou-se o uso das plantas medicinais bem como de seus preparados, passou-se então a utilizar as moléculas ativas nelas contidas chegando-se a reproduzir artificialmente a substância ativa isolada.

Atualmente os principais obstáculos ao uso universal dos medicamentos industrializados são: o custo elevado das pesquisas, o elevado custo da fabricação propriamente dita e o alto nível tecnológico exigido neste processo. Além disto, cita-se que a facilidade de acesso à estes quimioterápicos, tem contribuído para o uso excessivo dos mesmos causando doenças medicamentosas.

Assim, as plantas medicinais passaram novamente a ser consideradas recurso terapêutico viável. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), relatam que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de algum tipo de medicina tradicional para cuidados básicos de saúde e 85% destes envolvem o uso de plantas (Farnworth e Soerjato, 1985, citados por Clemente Filha, 1996); por esta razão recomendou aos países

membros que desenvolvessem pesquisas visando a utilização da flora nacional com propósito terapêutico. Em 1981, o Ministério da Saúde do Brasil baixou as “Diretrizes e Propriedades de Investigação em Saúde”, onde está incluído o estudo das plantas medicinais (Scheffer, 1991). Esta resolução condiciona o uso das plantas medicinais ao estudo aprofundado do ponto de vista fisiológico, fitotécnico, taxonômico, antropológico, farmacológico e químico, abrindo um campo de trabalho de alta relevância no Brasil, embora ainda incipiente.

Com 30% das florestas tropicais do planeta, o Brasil tem uma natureza privilegiada, onde centenas de espécies medicinais que popularmente são utilizadas no tratamento de insônias, diarreias, gastrites, úlceras, hipertensão, rins, inflamações, são nativas. Baseada nestas informações a Central de Medicamentos (CEME) iniciou em 1982 um programa multidisciplinar e interinstitucional de pesquisas com centenas de plantas medicinais, exóticas e nativas; incluindo os quebra-pedras. Baseado nisso foram selecionadas as espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg. (quebra-pedras), espécies nativas em várias regiões do país.

1.1 Caracterização geral das espécies

A família Euphorbiaceae engloba cerca de 7.500 espécies amplamente distribuídas em várias regiões do Brasil, agrupadas em aproximadamente 300 gêneros. Dentro deste grupo estão

incluídas espécies medicinais, ornamentais, de emprego industrial e de uso alimentar.

As espécies mais conhecidas são a mamona, *Ricinus comunis* L ; a seringueira da Amazônia, *Hevea brasiliensis* (Kunth.) Muell. Arg. e a mandioca, *Manihot esculenta* Grantz (Joly, 1993).

Apesar das espécies do gênero *Phyllanthus* serem conhecidas há a algum tempo, muitas ainda não estão bem definidas, devido ao fato de serem morfologicamente muito semelhantes, o que dificulta a sua identificação (Bacchi, 1984).

Pio Corrêa (1984a e b) cita como erva-pombinha e quebra-pedras várias espécies do gênero *Phyllanthus*, entre as quais: *Phyllanthus acutifolius* Spreng., *Phyllanthus diffusus* Klotz., *Phyllanthus lathyroides* Muell. Arg., *Phyllanthus niruri* L, *Phyllanthus tenellus* Roxb. (sin.: *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg.; segundo Unander, Webster e Blumberg ,1992).

Bacchi (1984) refere-se as espécies do gênero *Phyllanthus* como tendo porte herbáceo; altura entre 10-50cm; ramificações filatóides decíduas, com aproximadamente 10 a 25 folhas; lâmina foliar membranêa, elíptica a obovada, aguda ou obtusa na extremidade, aguda ou arredondada na base, com 6 a 25 mm de comprimento; címulas proximais com 2 a 3 flores masculinas, com aproximadamente 3,0 mm de diâmetro, com 5 a 6 segmentos de disco nectário, carnosos, papiloso, com 3 estames soldados até a metade; e 3 a 7 flores femininas, com aproximadamente 4,0 mm de diâmetro, disco pateliforme; ovário tricarpelar, liso; estiletos livres ou unidos na base, bífidos; o fruto é uma cápsula de aproximadamente 3,5 mm de diâmetro; com sementes papilosas.

1.2 Atividade medicinal

No gênero *Phyllanthus* já foram identificados taninos: phyllanthusiin D (Foo e Wong, 1992), ácido amarínico (Foo, 1995); triterpenos: A-friedooleanane (Matsunaga et al., 1993) e (Miguel et al., 1995); outros compostos fenólicos (Miguel et al., 1995); esteróis: stigmasterol, β -sitosterol (Santos et al., 1995); lignanas: phyllanthostatin A (Bachmann, Ghia e Torrsell, 1993), phyllamyricins A, B, C (Lin, Lee e Liu, 1995), phyllanthin e hypophyllanthin (Somanabandhu, Nitayangkura e Mahidol, 1993); lactonas: menisdaurilide, aquilegiolide (Bachmann, Ghia e Torrsell, 1993); e alcalóide: phyllanthimide (Tempesta et al., 1988).

Na espécie *Phyllanthus niruri* L., foram identificados as lignanas: nirphyllin, phyllnirurin (Singh, Agrawal e Thakur, 1989), niranthin, phyllanthin, nirtetralin, phyltetralin, lintetralin (Schneiders e Stevenson, 1982), isolintetralin, hinokinin, hypophyllanthin (Row, Satyanarayana e Srinivasulu, 1970), (Rao e Bramley, 1971), e (Huang, Chen e Ou, 1992), niruriside (Qian-Cutrone et al., 1996); compostos fenólicos: ácido gálico; epicatequina; gallacatequina; epigallocatequina; epicatequina 3-0-gallate e epigallocatequina 3-0-gallate (Ishimaru et al., 1992); e os alcalóides: norsecurinine, e seu enantiômero ent-norsecirinine (Joshi, et al., 1986).

Estes compostos conferiram atividades hepatoprotetivas em coelhos (Bhaumik e Sharma, 1994), inibiram a formação de vasos constritores no homem (Hussain et al., 1995), inibiram o vírus de hepatite B em marmota e pato (Thyagarajan et al., 1988), inibiram a ligação

entre o vírus HIV com a proteína VER (Qian-Cutrone et al., 1996), e possui ainda atividades analgésicas em ratos (Santos et al., 1995).

1.2 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista os argumentos expostos até o momento e à carência de estudos sobre os diferentes componentes que constituem o sistema de produção do *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., objetivou-se no presente trabalho analisar o comportamento “in vivo” e “in vitro” de ambas espécies e ainda estudar as exigências nutricionais da espécie *Phyllanthus niruri* L., verificando-se a variação dos alcalóides totais em função da nutrição.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efeito do AIB na formação do sistema radicular e parte aérea de microestacas de <i>P. corcovadensis</i> Muell. Arg., aos 60 dias. (A) T-1. Controle c/ água; T-2. 3,048 mM; T-3. 9,144 mM de AIB; e (B) T-4. 27,432 mM; T-5. 82,296 mM de AIB. UFLA, Lavras - MG, 1996	21
2	Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o número de raízes > 5 mm/ microestacas em <i>Phyllanthus corcovadensis</i> Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996	22
3	Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o peso da matéria seca do sistema radicular (MSSR) em <i>Phyllanthus corcovadensis</i> Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996	23
4	Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o número de brotações > 5 mm/ estacas de <i>Phyllanthus corcovadensis</i> Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996	25
5	Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o peso da matéria seca das brotações (MSB) de <i>Phyllanthus corcovadensis</i> Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996	25
6	Estruturas químicas de (A) tirosina, (B) ornitina, (C) norsecurinini, e (D) ent-norsecurinini (Joshi et al., 1986).	38

Figura	Página
7	Efeito da calagem e adubação nitrogenada em plantas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.; 1. Com calagem, 2. Sem calagem. N-0 mg.dm ⁻³ , N-30 mg.dm ⁻³ , N-60 mg.dm ⁻³ , N-100 mg.dm ⁻³ , N-150 mg.dm ⁻³ . UFLA, Lavras - MG, 1996 48
8	Altura média das plantas de <i>Phyllanthus niruri</i> L. dos tratamentos submetidos a adubação nitrogenada e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1996 49
9	Dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção máxima na altura média das plantas de <i>Phyllanthus niruri</i> L. dos tratamentos submetidos a calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1996 50
10	Matéria seca total (MST) média de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a adubação nitrogenada e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1996 50
11	Dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção máxima na matéria seca total (MST) média de plantas de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1996 51
12	Espectro de infravermelho de alcalóides na matéria seca da parte aérea de <i>Phyllanthus niruri</i> L., do tratamento 7 - 100% de clorofórmio, submetido a calagem e 100 mg.dm ⁻³ de solo. UFLA, Lavras - MG, 1997 58
13	Espectro de infravermelho de alcalóides na matéria seca da parte aérea de <i>Phyllanthus niruri</i> L., do tratamento 4 - 100% de clorofórmio, submetido a 30 mg.dm ⁻³ e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1997 59
14	Alcalóides totais na matéria seca da parte aérea (●), matéria seca da parte aérea (▲), dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção máxima de alcalóides totais e matéria seca total das plantas de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997 60
15	Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos de segmentos internodais de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a dois ambientes de incubação e de várias concentrações de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1997 78

Figura		Página
16	Valores médios e equação de regressão para peso da matéria seca dos calos de segmentos internodais de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a dois ambientes de incubação de várias concentrações de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1997	80
17	Valores médios para peso da matéria seca dos calos de segmentos internodais de <i>Phyllanthus niruri</i> L. sob manutenção em meio de cultura suplementado com 2,68 μM de ANA combinado com 2,46 μM de AIB, os quais não foram analisados estatisticamente devido a falta de repetibilidade. UFLA, Lavras - MG, 1997	82
18	Valores médios para peso da matéria seca dos calos de segmentos internodais de <i>Phyllanthus niruri</i> L. induzidos em meio de cultura suplementado com a combinação entre quatro concentrações diferentes de ANA e AIB. UFLA, Lavras - MG, 1997	84
19	Valores médio para peso da matéria seca da parte aérea, calos, número de brotações e equação de regressão de segmentos nodais de <i>Phyllanthus niruri</i> L. submetidos a quatro concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras - MG, 1997	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA = Ácido indolacético

ANA = Ácido naftalenoacético

AIB = Ácido indolbutírico

2,4-D = 2,4-Diclorofenoxiacético

TDZ = Tiazuron

BAP = Benzil aminopurina

MS = Murashige & Skoog (Meio de Cultura)

N = Nitrogênio

P = Fósforo

K = Potássio

Ca = Cálcio

Mg = Magnésio

S = Enxofre

B = Boro

Mn = Manganês

Fe = Ferro

Co = Cobalto

Mo = Molibdênio

Zn = Zinco

Cu = Cobre

Al = Alumínio

RESUMO

BECKER, Laura. **Propagação vegetativa in vivo de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e in vitro, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides na espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras).** Lavras: UFLA, 1997. 96p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia Vegetal)*.

Devido a carência de estudos das espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg., realizou-se um estudo com microestacas de *P. corcovadensis* Muell. Arg. Conclui-se que; embora as concentrações 3,048 e 9,144 mM de AIB tenham proporcionado maior número de brotações, bem como maior peso da matéria seca de raízes e brotações; os controles apresentaram boa formação radicular e brotações, aos 60 dias. No segundo experimento, realizado em casa de vegetação, utilizou-se como substrato Cambissolo Álico, oriundo do município de Nazareno - MG para o estudo dos efeitos da calagem e adubação nitrogenada sobre a espécie *P. niruri* L. Esta espécie mostrou-se responsiva a calagem e fertilização nitrogenada. A propagação “in vitro” consistiu da indução e manutenção de calos, e multiplicação da espécie *Phyllanthus niruri* L. Com relação à indução de calos, os melhores resultados foram obtidos na presença de luz e com a utilização de ANA (1,34 μ M) e AIB (4,92 e 2,46 μ M). Entretanto os

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Maria das Graças Cardoso e Antônio Eduardo Furtini Neto.

melhores tratamentos quando os calos foram induzidos com TDZ, foram na concentração 4,54 μM , quando mantidos em meio acrescido de ANA ou AIB. No segundo experimento de indução de calos o melhor resultado obtido foi na concentração 4,92 μM de AIB em combinação com 0,0 μM de ANA. No terceiro experimento embora a concentração de sais do meio de cultura MS tenha sido considerada inadequada, o maior número de brotações ocorreu na concentração 0,57 μM de TDZ em média com 5,0 brotos por explante, na forma de roseta.

ABSTRACT

In vivo vegetative propagation of *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., and in vitro callus induction, nutrition, extraction and quantification of alkaloids in the specie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedras).

Due to the lack of studies on species *Phyllanthus niruri* L. and *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg., a study was conducted by utilizing microcuttings of *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. It was found that although the concentration of 3,048 and 9,144 mM AIB have yielded highest number of sprouting, as the greatest weight of the dry matter of roots and sprouting, the controls both with and without water presented good formation of the root system and aerial part at 60 days. In the second experiment accomplished in the greenhouse, in Allic Cambisol, coming from the city of Nazareno - MG was utilized for the studies of liming and nitrogenous fertilization of the species *P. niruri* L. This species proved responsive to both liming and nitrogenous fertilization. In vitro propagation consisted of induction, callus maintenance and multiplication of the species *P. niruri* L. As regards callus induction, the best results were obtained in the presence of light and with use of NAA (1,34 μM) and AIB (4,92 and 2,46 μM). However, the best treatments were those induced by TDZ, specially at the concentration of 4,54 μM , when maintained in a medium added either of NNA or IBA. In the second experiment of callus induction, the best result was at the concentration 4,92 μM of AIB and with combination 0,0 μM of NAA. While in the third experiment, the salt concentration in the MS culture was considered

unsinkable, meanwhile the greatest number of sprouting occurred at the concentration of 0,57 μM TDZ, on the average, with 5,0 sprouts per explant, as rosette.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCHI, E.M. Farmacognosia de algumas espécies de *Phyllanthus*, conhecidos como quebra-pedras. **Anais de Farmácia e Química**. São Paulo, v.241, n.2, p.39-44, 1984.
- BACHMANN, T.L.; GHIA, F.; TORSSELL, K.B.G. Lignans and lactones from *Phyllanthus anisolobus*. **Phytochemistry**, Great Britain, v.33, n.1, p.189-91, May 1993.
- BHAUMIK, A.; SHARMA, M.C. Comparative efficacy of two herbal formulations in induced hepatopathy in rabbits. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.64, n.5, p.465-67, May 1994.
- CLEMENTE FILHA, A.C. Aspectos fisiológicos e fitoquímicos de *Bauhinia forficata* Link e *Plantago major* L. Lavras: UFLA, 1996. 67p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- FOO, L.Y. Amariinic acid and related ellagitannins from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, Great Britain, v.39, n.1, p.217-224, May 1995.
- FOO, L.Y.; WONG, H. Phyllanthusiin D, an unusual hydrolysable tannin from *Phyllanthus amarus*. **Phytochemistry**, Great Britain, v.31, n.2, p.711-13, Feb. 1992.
- HUANG, Y.L.; CHEN, C.C., OU, J.C. Isolintetralin: a new lignan from *Phyllanthus niruri*. **Planta Medica**, New York, v.58, n.12, p.473-474, 1992.
- HUSSAIN, R.A.; DICKEY, J.K.; ROSSER, M.P.; MATSON, J.A.; KOZLOWSKI, M.R. A novel class of non-peptidic endothelin antagonists isolated from the medicinal herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.58, n.10, p.1515-1520, Oct. 1995.

- ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H.; SHIMOMURA, K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, Great Britain, v.31, n.6, p.2015-2018, June 1992.
- JOLY, A. B. **Botânica, introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 1993. 634p.
- JOSHI, B.S.; GAWAD, D.H.; PELLETIER, S.W.; KARTHA, G.; BHANDARY, K. Isolation structure (X-ray analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.49, n.4, p.614-620, July/Aug. 1986.
- LIN, M-T.; LEE, S-S.; LIU, K.C.S.C. Phyllamyricins A-C, three novel lignans from *Phyllanthus myrtifolius*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.58, n.2, p.244-249, Feb. 1995.
- MATSUNAGA, S.; TANAKA, R.; TAKAOKA, Y.; IN, Y.; ISHIDA, T.; RAHMANI, M.; ISMAIL, H.B.M. 26-Nor-D: A-Friedooleanane triterpenes from *Phyllanthus watsonii*. **Phytochemistry**, Great Britain, v.32, n.1, p.165-170, Jan. 1993.
- MIGUEL, O.G.; CECHINEL FILHO, V.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; FERRARI, F.; MESSANA, I.; YUNES, R.A. A triterpene and phenolic compounds from leaves and stems of *Phyllanthus sellowianus*. **Planta Medica**, New York, n.61, p.391, 1995.
- PIO CORREA, M. Herva Pombinha. In: _____. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas e cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, v.4, p.151-153a.
- PIO CORREA, M. Quebra-pedra. In: _____. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas e cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984, v.5, p.562-563b.

- QIAN-CUTRONE, J.; HUANG, S.; TRIMBLE, J.; LI, H.; LIN, P-F.; ALAM, M.; KLOHR, S.E.; KADOW, K.F. Niruriside, a new HIV VER/RRE binding inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Ohio, n.59, n.2, p. 196-199, Jan/Feb. 1996.
- RAO, G.S.; BRAMLEY, R. Hypophyllanthin. **Tetrahedron Letters**, Great Britain, n.34, p.3175-3178, 1971.
- ROW, L.R.; SATYANARAYANA, P.; SRINIVASULU, C. Crystalline constituents of Euphorbiaceae-XI. Revised structure of hypophyllanthin from *Phyllanthus niruri* Linn. **Tetrahedron**, Great Britain, v.26, p.3051-3057, 1970.
- SANTOS, A.R.S.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; MONACHE, F.D.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. **Planta Medica**, New York, n.61, p.329-332, 1995.
- SCHAFFER, M. C. **Estudo de Aspectos Agronômicos das Plantas Mediciniais Seleccionadas pela Fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR**. Curitiba: CEMEPAR. 1991. 8 p. (Apostila)
- SCHNEIDERS, G.E.; STEVENSON, R. Structure and synthesis of the aryltetralin lignans hypophyllanthin and nirtetralin. **Journal of the Chemical Society, Perkin, Transactions I**, London, n.46, p.999-1003, 1982.
- SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R. A new lignan and a new neolignan from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.52, n.1, p.48-51, Jan/Feb. 1989.
- SOMANABANDHU, A.; NITAYANGKURA, S.; MAHIDOL, C. et al. ¹H- and ¹³C-NMR assignments of phyllanthin and hypophyllanthin: lignans that enhance cytotoxic responses with cultured multidrug-resistant cells. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.56, n.2, p.233-239, Feb. 1993.

TEMPESTA, M.S.; CORLEY, D.G.; BEUTLER, J.A.; METRAL, C.J.; YUNES, R.A.; GIACOMOZZI, C.A.; CALIXTO, J.B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.51, n.3, p.617-618, May/Jun. 1988.

THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; VENKATESWARAN, P.S.; BLUMBERG, B.S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. **The Lancet**, London, n.1, p.764-766, Oct. 1988.

UNANDER, D.W., WEBSTER, G.L., BLUMBERG, B.S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation III. The subgenera *Ericoccus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthus*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in three-part series. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, n.36, p.103-112, 1992.

CAPÍTULO II

ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE QUEBRA-PEDRA

(*Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg.) IN VIVO

RESUMO

As microestacas de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. foram coletadas de plantas matrizes aclimatadas na casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As bases das microestacas que possuíam 5,0 cm de comprimento e pelo menos uma gema axilar, foram submersas em solução contendo 3,048; 9,144; 27,432; e 82,296 mM de AIB (ácido indolbutírico) e um controle úmido, por 60 minutos. Posteriormente as microestacas foram colocadas em bandejas de isopor contendo areia como substrato, as quais ficaram sob nebulização intermitente e 50% de sombreamento em casa de vegetação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) num fatorial de 5 x 2, sendo 4 concentrações de AIB, um controle úmido e dois tempos de avaliações, com 5 repetições e 4 microestacas por repetição. As características avaliadas foram: número de raízes, número de brotações, peso seco do sistema radicular e brotações aos 30 e 60 dias. Os resultados mostraram que a melhor época para a estabilização definitiva das microestacas foi após 30 dias, se for utilizado regulador de crescimento na concentração de 3,048 mM de AIB na indução do

enraizamento. Após 60 dias os resultados dos tratamentos controle com água; 3,048 e 9,144 mM de AIB não diferiram estatisticamente entre si podendo, portanto, utilizar regulador de crescimento nestas concentrações, ou apenas mergulhar a base das microestacas na água por 60 minutos para induzir o enraizamento.

2.1. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Bases morfológicas do enraizamento

A propagação vegetativa é usada para produzir plantas idênticas à planta matriz, isto pode ser explicado devido ao fato das células possuírem duas características: a totipotência, ou seja, as células contem em seus núcleos informações genéticas necessárias para reproduzir parte da planta ou a planta inteira; e a dediferenciação, que é a capacidade das células diferenciadas retornarem a condição meristemática e desenvolverem uma nova fase de crescimento (Hartmann; Kester; Davies Jr., 1990).

A propagação vegetativa por meio do uso de estacas é uma técnica agrônômica antiga embora ainda muito empregada devido a simplicidade, rapidez com que pode ser executada e uniformidade dos indivíduos obtidos (Mitchell e Marth, 1950). Por isso, muitas espécies ornamentais como certas variedades de roseiras, dalias, gerânio, camélias, etc., bem como algumas frutíferas tais como, a oliveira e a videira, são economicamente propagadas por esse processo (Rúbia, 1965). No entanto, a capacidade de enraizamento de algumas espécies é inferior devido principalmente a componentes bioquímicos da própria planta, como também as condições

ambientais a que são submetidas (Deschamps,1993). Segundo Haissing (1986), as diferenças na capacidade de enraizamento são devido a fatores genéticos e atividade de enzimas específicas.

A formação de raízes adventícias em estacas inicia-se a partir de um grupo de células denominadas células iniciadoras de raízes; as quais possuem núcleos grandes, centralizados e pequenos vacúolos. O meristema secundário sofre divisões mitóticas formando esses pequenos conjuntos de células que continuam a se dividir, diferenciando-se e formando os primórdios radiculares que ligam seus vasos vasculares aos vasos vasculares adjacentes existentes na planta. Em seguida, por crescimento, o primórdio atravessa o córtex e emerge na epiderme, constituindo a nova raiz (Hartmann e Kester, 1983; Lovell e White, 1986).

Em plantas arbóreas, as raízes adventícias geralmente originam-se na região cambial, floemática e xilemática, e os primórdios radiculares desenvolvem-se logo abaixo do primeiro nódulo ou na base da estaca (Lovell e White, 1986).

Nas plantas herbáceas as raízes adventícias geralmente originam-se entre os feixes vasculares, sendo que o tecido envolvido varia de acordo com a espécie, por exemplo, em tomate e abóbora as raízes adventícias surgem no floema parenquimático, em *Coleus* sp originam-se no periciclo (Hartmann, Kester e Davies Jr.,1990; Lovell e White, 1986).

2.1.2 Bases fisiológicas do enraizamento

Apesar da teoria de que todas as plantas superiores têm a totipotência celular, em algumas espécies a capacidade de enraizamento não se expressa (Haissing, 1986). Por isso as plantas podem ser divididas em três classes em relação ao enraizamento: plantas em que os tecidos

fornece todas as substâncias essenciais ao enraizamento, inclusive auxina, ocorrendo rápida formação de raiz. Plantas em que os co-fatores (carboidratos; compostos nitrogenados incluindo amino-ácidos e enzimas; compostos fenólicos tais como: ácido cafêico, catecol, e ácido clorogênico; vitaminas e compostos inorgânicos) estão presentes, mas as auxinas são limitantes, necessitando assim o suplemento de auxinas exógenas para o aumento do enraizamento. E plantas em que um ou mais co-fatores estão ausentes, podendo haver falta ou não de auxinas, onde mesmo com a adição de auxina exógena pode ou não haver resposta (Hartmann, Kester e Davies Jr., 1990).

Segundo Pasqualetto (1995), a maioria das espécies respondem positivamente ao tratamento com auxina. Contudo, os benefícios de tratamento com auxinas podem ser evidentes mesmo nas espécies que enraízam na sua ausência, quer seja aumentando a porcentagem de enraizamento antecipando a indução, ou aumentando o número, qualidade e uniformidade das raízes (Blazich, 1988 e Hartmann, Kester e Davies Jr., 1990).

Gaspar e Hofinger (1988) especificam em seus trabalhos auxinas naturais e sintéticas que promovem o enraizamento. Isto, pode ser atribuído a uma variação no conteúdo de auxinas endógenas livres e conjugadas durante o enraizamento.

Nas plantas, o composto natural com atividade auxínica é o AIA, o qual pode ocorrer tanto na forma livre como conjugada. Sachs (1882); Bouillenne e Went (1933) citados por Weaver (1972) postularam que alguma substância presente nas folhas, gemas e cotilédones que translocava-se para a base das plantas era responsável pela indução do enraizamento. Logo após, em 1935 pesquisadores sintetizaram o AIA e comprovaram sua atividade como promotor de enraizamento em segmentos de caules. A partir desta descoberta, foram realizados testes com outros dois análogos, o ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA) onde

evidenciou-se que os mesmos possuíam melhor efeito na indução do enraizamento que o AIA natural (Hartmann, Kester e Davies Jr., 1990). Posteriormente outros compostos tais como, o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) foram também incluídos neste grupo. Estes dois últimos são porém pouco utilizados devido à sua instabilidade na luz e por geralmente estimularem a formação de calo na base da estaca (Blazich, 1988).

O AIB é a substância que geralmente produz melhores resultados (Janick,1966; Weaver,1972), seguida pelo ANA e depois pelo AIA (Weaver,1972; Salisbury e Ross,1992; Jarvis, 1986).

Ono, Rodrigues e Rodrigues (1992), comparando o efeito de ANA e AIB a 100 e 200 mg.L⁻¹ em estacas de *Camellia japonica* L., observaram que os tratamentos com AIB, independente da concentração, apresentaram sempre resultados superiores aos tratamentos com ANA. Outro teste comparativo envolvendo ANA e AIB foi realizado por Hostalácio, Soares e Coelho (1977) com mimo de vênus (*Hibiscus rosa sinensis*), azaléia (*Rhododendron sp*) e três-marias (*Bougainvillea spectabilis*), sendo que as duas primeiras apresentaram melhor enraizamento com 200 mg.L⁻¹ de AIB, enquanto a terceira foi induzida com 100 mg.L⁻¹ de ANA.

As variações quanto à eficácia das diversas auxinas são determinadas pelas diferentes bases fisiológicas entre o AIA comparado ao ANA e AIB, atribuídas aos diversos mecanismos metabólicos que a planta possui para reduzir e/ou anular os efeitos do AIA, através de sua conjugação com outros compostos, ou sua destruição. São estes processos de anabolismo, catabolismo e conjugação do AIA que determinam a sua baixa eficiência no enraizamento em relação as outras auxinas (Blazich,1988; e Hartmann, Kester e Davies Jr., 1990).

Segundo Janick (1966) a presença de folhas e gemas tem grande influência no enraizamento de estacas de caule. Entretanto em muitas espécies o efeito das gemas deve-se, principalmente, à produção de auxina; enquanto que o estímulo provocado pelas folhas está relacionado com a produção de carboidratos. Em outras espécies, o material de reserva está estocado no caule não requerendo assim a presença de folhas, indicando que existem co-fatores suficientes na estaca para a iniciação do enraizamento (Weaver, 1972).

Outros fatores importantes relacionado com a capacidade de enraizamento de um caule, é o estado nutricional, estágio de desenvolvimento, idade, tipo e localização desta estaca na planta matriz, bem como a época do ano em que a estaca foi coletada e o tipo de indução do enraizamento. O mesmo autor observa que algumas espécies por outro lado podem ter o seu enraizamento dificultado, não por apresentarem baixos níveis de auxina endógena, mas por apresentarem inibidores de enraizamento. Trabalhos com estacas de videira de difícil enraizamento mostravam que a lavagem em água removiam estes inibidores, e promoviam o enraizamento (Janick, 1966).

Odom e Carpenter (1965) citados por Weaver (1972) relatam a presença de inibidores em estacas de *Alternanthera*, *Coleus*, *Chrysanthemum* e *Geranium* as quais mostraram dificuldades no enraizamento.

2.1.3 Ambiente, dosagem, tempo de exposição e veículo para o enraizamento

Diferentes técnicas tem sido utilizadas nas aplicações de auxinas, tais como mistura de talco e auxina, além de imersão em soluções diluídas e concentradas.

Formulações contendo misturas de talco e auxina são disponíveis no mercado e são de fácil aplicação, porém, promovem resultados desuniformes e elevam os custos quando aplicado à grande quantidade de estacas.

O uso de soluções diluídas de auxinas é feito pela imersão da parte basal das estacas, nas mesmas, variando o tempo de imersão de acordo com a concentração da solução utilizada. Esta técnica é no entanto pouco utilizadas por ser um processo demorado e onde a absorção da solução é altamente influenciada pelas condições de ambiente.

O método mais utilizado é a imersão rápida de estacas em soluções concentradas de auxinas, o qual apresenta as vantagens de ser econômico, de uso fácil e rápido, além de apresentar resultados uniformes (Blazich, 1988).

A fitotoxidez das auxinas foi observada por Deschamps (1993) em estacas de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg.) após imersão em solução durante 24 horas, em todas as concentrações de AIB testadas (1,2; 2,5; 4,9 e 9,8 mM), sendo que utilizando-se o tempo de imersão de seis horas a melhor concentração foi 4,9 mM de AIB. São José et al. (1992), observou fitotoxidez em estacas de *Bixa orellana* após imersão em solução contendo 1,97 mM de AIB, durante doze horas.

De um modo geral, a concentração ótima do regulador de crescimento varia com a natureza da estaca e o tempo de imersão utilizado. Mitchell e Marth (1950), sugeriram desde 2,5 ppm de AIB por 24 horas para estacas de *Chrysanthemum frutescens*, à 200 ppm de AIA por 6 horas para estacas de *Salvia apiana* e *Impatiens* sp. e para estacas de fácil enraizamento, particularmente herbáceas. A concentração de 10 ppm de AIB por 10 horas, em estacas de *Pinus*

densiflora; e 2000 à 12000 ppm de AIB por 5 minutos em estacas de *Carya pecan* e *Rhododendron mucronulatum*, são indicadas para estacas difíceis de enraizar, como as lenhosas.

Os substratos utilizados também influenciam o enraizamento de estacas (Spurr e Barnes, 1973). De acordo com Hartmann, Kester e Davies Jr. (1990) são características desejáveis ao substrato: um volume razoavelmente constante quando seco ou úmido, capacidade de retenção de umidade, porosidade para facilitar drenagem e aeração, baixo nível de salinidade e boa disponibilidade de nutrientes.

O produto comercial Plantimax, uma mistura de vermiculita e casca de *Pinus* moída, utilizado juntamente com diferentes proporções de areia, solo, bagaço de cana, vermiculita e húmus de minhoca, quando utilizada no enraizamento de mudas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio, não resultaram em diferenças significativas, de acordo com os trabalhos de Toledo (1992). Entretanto, a areia foi considerada por Deschamps (1993) como sendo o melhor substrato para o enraizamento de estacas de Sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg) em detrimento do substrato comercial Plantimax, por este apresentar temperaturas mais elevadas, induzindo brotações precoces, antecedendo ao enraizamento (Hartmann; Kester, 1983).

A umidade do ambiente exerce uma grande influência no enraizamento de estacas e segundo Hartmann, Kester e Davies Jr. (1990), a nebulização mantém a umidade do ar elevada, e reduz a temperatura do ar e da estaca. Isto contribuiu para uma diminuição na transpiração e, conseqüentemente, na desidratação dos tecidos da estaca, mantendo-as vivas até a formação das raízes.

Moore et al. (1975), citado por Andersen (1986) em experimento com *Sinapis alba* L., relata que as estacas mantidas em temperaturas de 10 a 13 °C tiveram uma lag fase mais longa,

enquanto as estacas mantidas em temperaturas de 25 a 30 °C, enraizaram rapidamente. Com relação à luz, Andersen (1986) explica que os resultados são controversos, variando de acordo com a espécie estudada.

2.2 OBJETIVO

Procurou-se viabilizar a propagação vegetativa da espécie *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. através da escolha da concentração de AIB na solução utilizada como pré-tratamento das microestacas, bem como o melhor tempo de enraizamento

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

As microestacas foram coletadas de plantas matrizes aclimatadas em casa de vegetação localizada no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Estas plantas foram identificadas e uma amostra foi colocada sob o n.º ID 84/96, no Laboratório de Botânica-Herbário IAN-EMBRAPA-CPATU-Belém-PA, como sendo *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg.

As microestacas com 5,0 cm de comprimento e pelo menos uma gema axilar tiveram suas bases colocadas em água destilada (testemunha úmida) e em soluções com 3,048; 9,144; 27,432; e 82,296 mM de AIB, segundo Mitchell e Marth (1950), por 60 minutos. Neste período as mesmas foram mantidas em sala com temperatura ambiente e luz natural.

Após indução dos tratamentos as microestacas foram plantadas à uma profundidade de 20mm em bandejas de isopor (com 72 células de fundo vazado), contendo areia como substrato (Cunha, 1986; Pasqualetto, 1995; Deschamps, 1993 e Rúbia, Infonzato e Abreu, 1965). As bandejas contendo as microestacas permaneceram em casa de vegetação sob nebulização intermitente (Sampaio, 1982) e 50% de sombreamento (Janick, 1966).

No experimento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 2, sendo 4 concentrações de AIB, um controle úmido e 2 tempos de avaliação (30 e 60 dias). Cada tratamento, foi constituído por cinco repetições de quatro microestacas cada.

Ao final dos períodos de avaliação as estacas foram cuidadosamente arrancadas com auxílio de jato de água, com o objetivo de evitar possíveis danos às raízes e retirar partículas de areia e outros materiais nelas aderido (Pasqualetto, 1995).

As variáveis avaliadas foram: peso da matéria seca das raízes e parte aérea, número de raízes e brotações em cada estaca. A secagem do material para obtenção dos pesos seco foi realizado em estufa à 70 °C.

As características avaliadas foram submetidas à análise de variância pelo programa SANEST, STATISTICA e analisados por regressão polinomial.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Figura.1 pode-se observar que todos os tratamentos utilizados promoveram o enraizamento e formação de brotações nas estacas, sendo portanto a utilização de microestacas uma técnica viável para a propagação desta espécie. Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por Sampaio (1982) e Souza (1995) em experimentos realizados com microestacas de figueira e repolho (família clonal 800), respectivamente. Estas espécies foram consideradas de fácil enraizamento, por não ter ocorrido diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com e sem AIB.

O maior número de raízes/microestacas > 5 mm aos 30 dias foi de 1,75 e ocorreu na concentração de 3,048 mM de AIB (Figura 2). Isto sugere que houve uma antecipação na indução e aumento do número de raízes com a utilização de baixas concentrações do regulador de crescimento. E as concentrações mais altas inibiram inicialmente a indução de raízes.

Aos 60 dias o maior número de raízes/microestacas > 5 mm obtido foi de 2,40 e ocorreu no tratamento controle úmido, sugerindo que a água pode ter removido supostos inibidores de enraizamento (Janick, 1966 e Hartmann, Kester, Davies Jr., 1990). Houve então interação significativa entre concentrações do regulador de crescimento e época de avaliação. Resultados semelhantes foram encontrados por Cuquel (1992) com estacas de crisântemo, na ausência de AIB.

Houve também um maior número de raízes/microestacas em concentrações mais altas (9,144 e 82,296 mM de AIB), indicando que ao longo do tempo os reguladores de crescimento

foram metabolizados, não inibindo a indução do enraizamento (Blazich,1988; e Hartmann, Kester e Davies Jr., 1990).

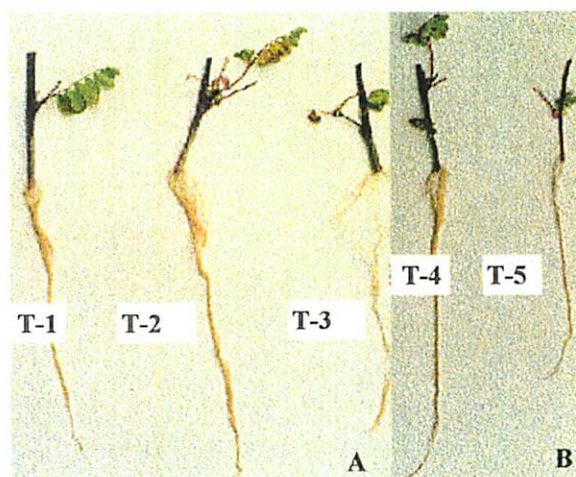


FIGURA - 1. Efeito do AIB na formação do sistema radicular e parte aérea de microestacas de *P. corcovadensis* Muell. Arg., aos 60 dias. **(A)** T1. Controle c/ água; T2. 3,048 mM de AIB; T3. 9,144 mM de AIB e **(B)** T4. 27,432 mM de AIB; T5. 82,296 mM de AIB. UFLA, Lavras - MG, 1996.

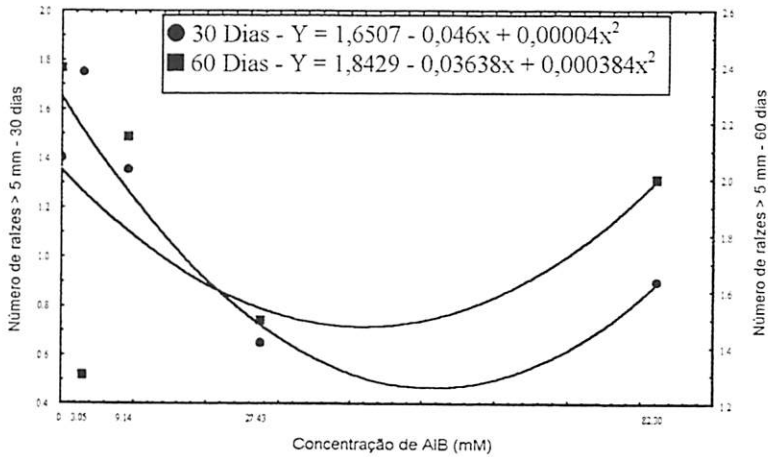


FIGURA - 2. Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o número de raízes > 5 mm/ microestacas em *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996.

Conforme Figura 3, o peso da matéria seca do sistema radicular (MSSR) foi influenciado significativamente pelo tempo de avaliação, e pelas concentrações de AIB. Isto sugere que o regulador de crescimento influenciou na qualidade e uniformidade das raízes (Blazich, 1988 e Hartmann, Kester, Davies Jr., 1990). Aos 30 dias, a melhor concentração para a MSSR foi 3,048 mM de AIB, sugerindo que neste tratamento, o menor número de raízes apresentou maior peso de matéria seca, conseqüentemente, maior diâmetro de raízes. Enquanto que aos 60 dias a melhor concentração para MSSR foi 9,144 mM de AIB. Entretanto Pasqualetto (1995) trabalhando com estacas de soja, obteve o maior peso de matéria seca de raízes na ausência de AIB.

Embora o controle úmido tenha apresentado maior número de raízes/microestacas (2,4 raiz/microestaca; Figura 2), esses resultados não foram confirmados no peso da matéria seca de raiz aos 60 dias (4,64 mg de MSSR; Figura 3). Isto indica que neste tratamento houve indução de maior número de raízes, porém com diâmetros menores.

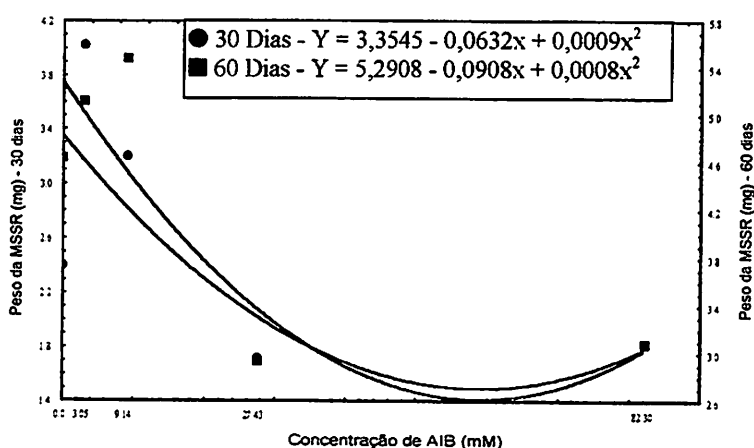


FIGURA - 3. Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o peso da matéria seca do sistema radicular (MSSR) em *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996.

As microestacas enraizadas tiveram em todos os tratamentos o desenvolvimento da parte aérea, todavia, quando avaliadas aos 30 dias não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, embora na concentração de 3,048 mM de AIB tenha sido observado maior

no número de brotações > 5 mm na concentração. Aos 60 dias essa tendência foi confirmada, sendo que na concentração 3,048 mM de AIB ocorreu 1,0 brotação >5 mm/ microestaca. Ainda que os pontos estejam um pouco disperso na curva não permitindo um ajuste mais adequado, a equação de regressão quadrática pode ser usada para descrever os resultados para as dosagens de AIB utilizadas (Figura 4). Os resultados diferiram daqueles encontrados por Souza (1995), o qual trabalhando com repolho, obteve o maior número de brotações com 125 mg.L⁻¹ de AIB.

Observa-se também, que houve diferença significativa entre os tempos de avaliações, sendo o maior número de brotações > 5 mm/ estaca obtido quando foi realizada avaliações aos 60 dias.

De acordo com a Figura 3, o peso da matéria seca de raiz nas concentrações 3.048 e 9,144 mM de AIB foram as maiores aos 60 dias, possivelmente esta melhor qualidade de raiz tenha influenciado no melhor desenvolvimento das brotações destes tratamentos.

O peso da matéria seca das brotações (MSB) foi influenciado significativamente pela interação entre o tempo de avaliação e concentrações de AIB (Figura 5). A concentração de 3,048 mM de AIB foi a que proporcionou maior ganho de matéria seca na parte aérea das microestacas aos 30 dias de avaliação, sendo responsável por um acréscimo de 89% em relação à média do controle. Estes dados confirmam a tendência do maior número de brotações > 5 mm na concentração 3,048 mM de AIB, apresentada na Figura 4. Pinheiro, Condé e Pinheiro Filho (1971) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com estacas de figueira, na qual, a melhor concentração foi de 4,064 mM de AIB.

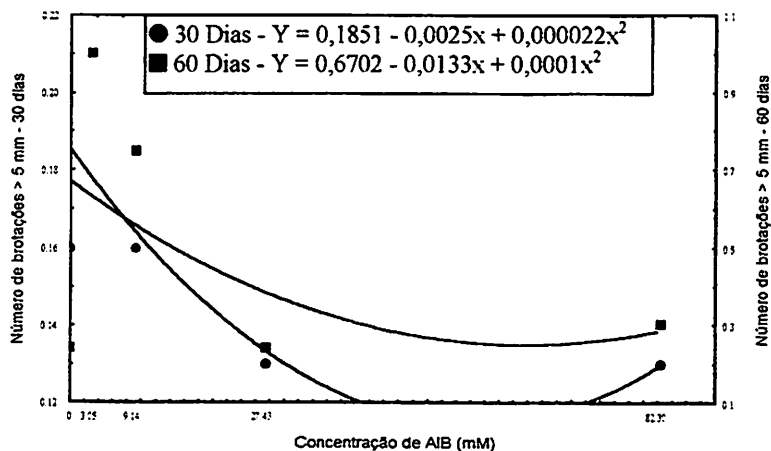


FIGURA - 4. Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o número de brotações > 5 mm/estacas de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996.

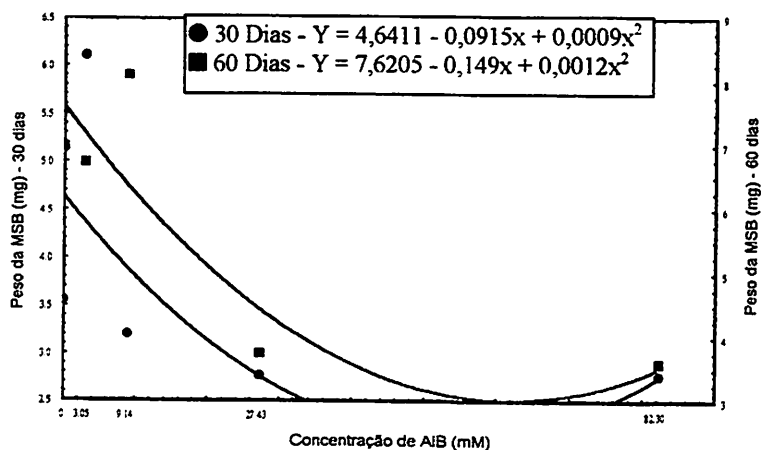


FIGURA - 5. Efeito das diferentes concentrações do ácido indolbutírico (AIB) e dos tempos avaliados sobre o peso da matéria seca das brotações (MSB) de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. UFLA, Lavras - MG, 1996.

Todavia, aos 60 dias de avaliação este ganho foi somente de 16% na concentração 9,144 mM de AIB, em relação ao controle úmido.

2.5 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a melhor época para a estabilização definitiva das microestacas foi após 30 dias, se for utilizado regulador de crescimento na concentração de 3,048 mM de AIB na indução do enraizamento. Após 60 dias os resultados dos tratamentos controle com água; 3,048 e 9,144 mM de AIB não diferiram estatisticamente entre si podendo, portanto, utilizar regulador de crescimento nestas concentrações, ou apenas mergulhar a base das microestacas na água por 60 minutos para induzir o enraizamento.

O enraizamento de microestacas de quebra-pedra pode ser empregada como um método alternativo de propagação, devido esta espécie ser de fácil enraizamento *in vivo*, podendo até ser considerado desnecessário o estímulo externo, com regulador de crescimento. E sua utilização ser viável após seleção genética no gênero *Phyllanthus* e/ou na espécie de material vegetal com teores mais elevados de alcalóides.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, A.S. Environmental influences on adventitious rooting in cuttings of non-woody species. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1986. p. 223-253.
- BLAZICH, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHALA, N. **Advances in plant sciences**; adventitious root formation in cuttings. Oregon: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.132-149.
- CUNHA, M.C.L. **Estudo de preservação do poder germinativo de sementes, enraizamento de estacas e anatomia da rizogênese em *Eugenia dysenterica* DC.** Viçosa: UFV, 1986. 95 p. (Dissertação-Mestrado em Ciência Florestal).
- CUQUEL, F.L. **Enraizamento de estacas de crisântemo *Dendranthema morifolium* (RAMAT.) TZVELEV tratadas com ácido indolbutírico.** Piracicaba: ESALQ, 1992. 66p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa “in vivo” e “in vitro” de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg.), espécie florestal de mata ciliar.** Lavras: ESAL, 1993. 128 p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHALA, N. **Advances in plant sciences**. Adventitious root formation in cuttings. Oregon: Dioscorides Press, 1988. v.2,p. 117-131.
- HAISSIG, B.E.. Metabolic process in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p.141-189.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation: principles and practices.** 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1983. 727p.
- HARTMANN, T.H.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T. **Plant propagation: principles and practices.** 5.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1990. 690p.

- HOSTALÁCIO, S.; SOARES, A. R.; COELHO, J. P. Enraizamento de estacas de azaléia (*Rhododendron* sp) três marias (*Bougainvillea spectabilis*) e mimo de vênus (*Hibiscus rosa sinensis*) sob influência de “ANA” e “IBA”. **Ciência e Prática**, Lavras, v.1, n.1, p. 30-35, jan./jun. 1977.
- JANICK, J. Orientação do crescimento da planta. In: _____. **A ciência da Horticultura**. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1966. p.202-237a.
- JANICK, J. Mecanismos da propagação. In: _____. **A ciência da horticultura**. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1966. 485 pb.
- JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rotting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p.191-222.
- LOVELL, P.H.; WHITE, J. Anatomical changes during adventitious root formation. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p.111-140.
- MITCHELL, J.W.; MERTH, P.C. Reproducción de plantas y transplante. In: _____. **Fitohormonas y otros reguladores de crecimiento para huertas, campos, jardines y cosechas**. Madrid: Ediciones Aguilar, 1950. p.37-66.
- ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D. Interações entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de camélia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.4, n.2, p.107-112, dez. 1992.
- PASQUALETTO, A. **Influência de reguladores de crescimento e de sacarose no enraizamento de estacas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Viçosa: UFV, 1995. 98 p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- PINHEIRO, R.V.R.; CONDÉ, A.R.; PINHEIRO FILHO, J.B. Influência de substâncias indutoras de crescimento e de dois diferentes leitos no “pegamento”, enraizamento e desenvolvimento de estacas de figueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v.18, n.97, p. 210-222, mai/jun. 1971.
- RÚBIA, A.C.; INFONZATO, R.; ABREU, C.P. de. Efeito de hormônios vegetais sobre o enraizamento de estacas de amoreira, plantadas em estufins, em posição normal e invertida. **Bragantia**, Campinas, v.24, n.11, p.125-131, mar. 1965.

- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberilins. In: _____. **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1992. p.682.
- SAMPAIO, V.R. Enraizamento de estacas herbáceas de figueira, sob nebulização intermitente. **Revista de Agricultura**. Piracicaba, v.57, n.4, p.289-292. dez. 1982.
- SÃO JOSÉ, R.; LOPES, P.M.F.; SOUZA, I.V.B.; LIMA, E.M.; VILARES, A.S.; MORAIS, O.M.; REBOUÇAS, T.N.H. Efeitos de diferentes concentrações de IBA no enraizamento de estacas de urucueiros (*Bixa orellana* L.), tipo cultivado Bico de Pato. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CORANTES NATURAIS, 1. Viçosa, 1992. **Anais...** Viçosa: UFV, 1992. p.112.
- SOUZA, C.M. **Enraizamento de microestacas in vivo e propagação in vitro de repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.)**. Lavras: UFLA, 1995. 76p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- SPURR, S.H.; BARNES, B.Y. **Forest ecology**. New York: The Ronald Press, 1973. 571p.
- TOLEDO, A.R.M. de. **Efeito de substratos na formação de mudas de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pera Rio] em vaso**. Lavras: ESAL, 1992. 88p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- WEAVER, R.J. **Reguladores del crecimiento en la agriculture**. 2.ed. Barcelona: Trillas, 1972. 540p.

CAPÍTULO III

CALAGEM E ADUBAÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DO *Phyllanthus niruri* L. E PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES TOTAIS

RESUMO

Cinco plântulas de *Phyllanthus niruri* L. obtidas por meio de germinação de sementes foram transplantadas para vasos com capacidade de 3,4 dm³ de solo, tendo como substrato um Cambissolo Álico, com textura média, do município de Nazareno - MG. Foi realizada uma fertilização básica de macro e micronutrientes, variando apenas as doses de nitrogênio e a calagem. O experimento consistiu de 5 doses de N (0; 30; 60; 100; 150 mg.dm⁻³ de N); 2 níveis de calagem (sem e com calcário, visando a elevação do pH para 6,0), com 6 repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, arranjado num fatorial de 5 x 2. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no qual foram avaliados: altura de plantas, peso

da matéria seca de raiz, caule e folhas; e efetuadas análises químicas e fitoquímicas da parte aérea. O melhor crescimento das plantas em relação a altura de plantas; peso da matéria seca de raiz, de caule, e de folha ocorreu nos tratamentos com calagem. A acidez do solo foi limitante ao crescimento desta espécie, com prejuízos na absorção e acúmulo dos macronutrientes. Este quebra-pedra é portanto uma espécie responsiva a calagem e adubação nitrogenada, sendo a produção de alcalóides totais na dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção máxima de matéria seca da parte aérea ($79,89 \text{ mg N.dm}^{-3}$) de $0,676 \text{ mg.g}^{-1}$ de MSPA.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os princípios ativos das plantas medicinais podem ser produtos do metabolismo primários e/ou secundários das plantas. Por isso, há muito tempo sabe-se que tanto a qualidade quanto o teor desses princípios ativos são afetados pelas condições ambientais, como: fertilidade do solo, pH, umidade, temperatura, qualidade de luz e outros fatores (Unander e Blumberg, 1991). Flück (1955a) concluiu que o melhor crescimento de *Cinchona ledgeriana*, bem como o conteúdo de alcalóides totais ocorreu quando essa planta foi cultivada em solos com média à alta umidade. Neste mesmo ano, Flück (1955b) mostrou que irradiação com luz ultravioleta por 30 minutos promoveu aumento na percentagem de alcalóides em *Datura stramonium*, aumento no conteúdo de óleo essencial em *Mentha crispata*, e um considerável decréscimo na percentagem de glicosídeos em *Digitalis purpurea*.

Em estudos com espécies produtoras de alcalóides (*Atropa belladonna*, e *Colchicum autumnale*), e espécies produtoras de glicosídeos (*Digitalis purpurea* e *D. ambigua*), cultivadas durante 5 anos em solos naturais; Burmann (1915) citado por Flück (1955a) observou variações

anuais no conteúdo do princípio ativo destas espécies, os quais foram dependentes das variações anuais médias da temperatura, mostrando assim o efeito das condições climáticas no princípio ativo das espécies.

3.1.1 Relação da nutrição mineral de plantas com a produção de metabólitos secundários

Os solos ácidos geralmente são deficientes em N, P, Ca, e Mo; contudo, na maioria das vezes, a deficiência nestes elementos afeta menos as plantas que o efeito tóxico relacionado à presença do Al.

Os primeiros sintomas das plantas em presença de altos níveis de Al na solução do solo são restrições ao crescimento da raiz e parte aérea, pelo fato da divisão e alongação celular serem drasticamente afetadas. (Reding e Taylor, 1989).

Foy (1975) relata que em algumas plantas os sintomas de toxicidade do Al assemelham-se a deficiência de P onde ocorre atrofia total da planta, folhas pequenas com coloração verde escura, caules e folhas arroxeadas, amarelecimento e queda das folhas. Isto pode ser explicado pelo fato de que o fósforo é imobilizado pelo Al, tanto fora como dentro da planta, porém, se a planta for suprida adequadamente com P, seu metabolismo poderá não ser afetado (Reding e Taylor, 1989).

Em estudo da influência do Al em trigo, centeio e triticale, Dinev e Stancheva (1993) concluíram que o Al afetou significativamente o acúmulo de K, Ca, e Mg pelas plantas.

Alva, Asher e Edwards (1986) estudando o papel do cálcio na neutralização da toxicidade do Al observaram uma exclusão parcial do Al pelo Ca nos tecidos da raiz, resultado da competição desses cátions pelo mesmo sítio de ligação.

A incorporação do N mineral em compostos orgânicos pode ser adversamente afetada sob condições ácidas, pela influência do Al solúvel na atividade da enzima nitrato redutase (NR) (Reding e Taylor, 1989).

Para a espécie *Datura stramonium* assim como para a maioria das espécies o melhor crescimento ocorre em solos com pH neutro, aproximadamente sete; contudo, nesta espécie o conteúdo de alcalóides é superior em solos ligeiramente alcalinos ou ácidos (Flück, 1955b).

O acréscimo no princípio ativo das plantas medicinais em relação à composição mineral do solo varia com a espécie e com as funções metabólicas a que os compostos pertencem. Os alcalóides possuem o N em sua estrutura molecular, e logicamente o metabolismo do N influenciará a sua produção. De acordo com Flück (1955b) P e K influenciaram também o conteúdo de alcalóides nas espécies *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* e *Datura stramonium*. Em *Digitalis lanata* e *D. purpurea* N, P e K influenciaram a produção de saponinas (Court e Allemann, 1943 citados por Flück, 1955b). Na maioria das espécies de *Mentha* cultivadas a produção do óleo essencial é influenciada pelas doses de N, P e K, de acordo com Schratz e Wiemann citados por Flück, 1955b.

Mahdi, Abou Dahab e El-khateeb (1987) conseguiram um aumento no conteúdo de citrionelol em *Eucalyptus torquata* e *E. angulosa*, pela adição de 0,952 Kg de N/ha. Em *Phalaris aquatica* L, Ball e Hoveland (1978) relatam um aumento na produção de alcalóides em resposta a adubação nitrogenada. Por outro lado Kennedy e Bush (1983) encontraram respostas negativas com relação à fertilização nitrogenada e produção de alcalóides em *Festuca arundinacea* Schreb.

O efeito da disponibilidade de N na síntese de alcalóides em três espécies de *Solanaceae* (*Nicotiana* sp, *Datura* sp e *Solanum* sp) foi investigado por Nowacki, Jurzysta e Górski (1975). Todas as espécies tiveram acréscimo no conteúdo de N na matéria seca, e um

decréscimo no conteúdo de carboidratos com o aumento da adubação nitrogenada. As espécies *Nicotiana* sp e *Datura* sp tiveram aumento nos teores de alcalóides, enquanto que em *Solanum* sp ocorreu decréscimo no conteúdo de glicoalcalóides.

Schermeister, Voigt e Maher (1950) trabalhando com cultivo hidropônico de *Hyoscyamus muticus* L. encontraram máxima produção de matéria seca total, e produção total de alcalóides suprindo a solução nutritiva com 252 mg.dm⁻³ de N. Nowacki et al. (1976) sugeriu que os alcalóides eram produto da hidrólise das proteínas, pois haviam evidências de que ocorria um aumento na quantidade de alcalóides ao mesmo tempo que decrescia a quantidade de proteínas devido ao seu catabolismo. A queda na quantidade de proteínas é acompanhada pelo correspondente aumento de N solúvel.

Kaltofen citado por Nowacki et al. (1976) relata que plantas bem supridas com N produzem aminoácidos em excesso, que podem ser inibidos pelo sistema “feed back”, contudo, em algumas plantas produtoras de alcalóides isto não ocorre. Por isso este excesso de aminoácidos é convertido em derivados, provocando menos danos as plantas. Nowacki e Waller (1975) citados por Nowacki et al. (1976) trabalhando com *Lathyrus tingitanus* e *Mimosa* sp sugeriram que, com o aumento da adubação nitrogenada houve uma síntese desproporcional de lisina, que uma vez acumulado torna-se tóxico; por isso estas espécies ativam o metabolismo dos alcalóides como um tipo de adaptação. Nestas espécies ocorreu a conversão lisina em tingitanina e latirina em *Lathyrus tingitanus*, e mimosina em *Mimosa* sp. Por outro lado em *Atropa belladonna* L um aumento no suprimento de N promoveu maior acúmulo de proteínas e compostos nitrogenados nos tecidos, enquanto que os níveis de alcalóides encontrados foram relativamente baixos, sugerindo portanto, não haver relação direta entre a síntese de alcalóides e proteínas (Schermeister, Crane e Voigt, 1960).

Annett (1920) em estudos com papoula (*Papaver somniferum* L.) supridas com adubação nitrogenada orgânica encontrou uma taxa desproporcional na porcentagem de morfina em relação ao acréscimo da produção de látex. Winter e Loustalot (1952) trabalhando com plantas jovens da espécie *Cinchona ledgeriana*, observaram aumento na produção de matéria seca e alcalóides, variando os teores de N em relação as plantas mantidas no tratamento controle. Plantas de *Papaver somniferum* L quando tratadas com fertilizantes nitrogenados, tiveram aumentos significativos no conteúdo de morfina e de óleo nas sementes (Kharwara, Awasthi e Singh, 1986).

Recentemente Mantanari Júnior, Figueira e Magalhães (1993) estudaram a influência da fertilização com N P K na biomassa e no teor do alcalóide em *Atropa belladonna*, e obtiveram incrementos na biomassa sem no entanto alterar o teor de alcalóide.

Em *Artemisia annua* L., Figueira et al. (1996) relatam que a omissão de N e P no substrato diminuiu substancialmente o crescimento, a produção de matéria seca e a porcentagem de artemisina encontrada.

Gorinova et al. (1993) estudando a influência da composição química natural de sete solos da Bulgária, no conteúdo de galantamina em *Leucojum Aestivum*; observaram que o maior conteúdo de alcalóide foi encontrado quando as plantas foram cultivadas em solos com boa reserva de N, K, Mg, B, Mo, Zn, Fe, e Cu.

Anwar et al. (1993) estudando a relação entre combinação de Mn com Fe e Zn e produção de látex e composição do ópium da papoula (*Papaver somniferum* L.); observaram uma produção de látex e conteúdo de alcalóides 16% superior à testemunha quando foram aplicados 15 kg/ha de Mn juntamente com 15 kg/ha de Fe ou 10 kg/ha de Zn.

3.1.2 Alcalóides

Os alcalóides são uma classe de compostos secundários, que apresentam em sua estrutura primária, um anel heterocíclico formado por nitrogênio e carbono. Eles têm como precursores basicamente quatro aminoácidos, ornitina, lisina, tirosina e triptofano (Goodwin e Mercer, 1983), sendo portanto classificados de acordo com seus precursores, por exemplo, os alcalóides isoquinolínicos são derivados do aminoácido tirosina (Robinson, 1974).

Os alcalóides não são geralmente armazenados no seu local de síntese, como é o caso da nicotina que é sintetizada na raiz do tabaco, translocada e armazenada nas folhas. Entretanto, os alcalóides apresentam a tendência de acumularem-se principalmente nos tecidos de crescimento ativo, nas células epidérmicas, na bainha vascular e vasos laticíferos (Goodwin e Mercer, 1983). Segundo Balandrin e Kloche (1988), este acúmulo depende do grau de diferenciação do tecido e o estágio de desenvolvimento dos órgãos da planta.

Hashimoto e Yamada (1994) comentam que, os processos de síntese são ativados pela expressão de genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese dos alcalóides. Estas enzimas são espacial e temporariamente reguladas tanto pelos estímulos internos quanto externos, tais como hormônios, luz, nutrição e estresses.

Lindsey e Yeoman (1983) trabalhando com *Datura unnoxia* Mill., estabeleceram a curva de crescimento de células, e constataram que a produção do alcalóide foi detectada durante a fase estacionária. Isto pode ser explicado pelo fato do aminoácido precursor (ornitina) não estar disponível durante a fase de crescimento intenso das células e pela maior diferenciação de plastídeos e acúmulo de cloroplastos no início da fase estacionária. Portanto existem evidências de que este produto secundário é produzido ou acumulado nos plastídeos.

De acordo com Lindsey e Yeoman (1983) a fase exponencial caracterizada pela intensa taxa de crescimento é também importante, pois esta é responsável pelo direcionamento dos precursores da rota primária (associada ao rápido crescimento) para a rota secundária (associada ao lento crescimento).

Assim a produção de metabólitos secundários nos vegetais, está fisiologicamente relacionado às respostas da planta ao meio ambiente. Tem sido sugerido ainda que as respostas à produção de alcalóides pelas plantas, estão envolvidas com excreção e/ou reserva de nitrogênio através dos alcalóides (quanto o N está presente em quantidades tóxicas na planta); agindo como reguladores de crescimento, inibidores da germinação, devido ao seu poder quelante; e ajudando na manutenção do balanço iônico (Goodwin e Mercer, 1983).

⇒ Várias classes de constituintes químicos, tais como: lignanas, triterpenóides, taninos, flavonóides, e alcalóides, tem sido isolados dos quebra-pedras (*Phyllanthus* spp). Para esta espécie *Phyllanthus niruri* L. foram isolados os alcalóides norsecurinini (Sniechus, 1973 citado por Joshi et al., 1986) e ent-norsecurinini (Joshi, 1986), os quais de acordo com Southon e Buckingham, (1989) têm supostamente como precursores os aminoácidos tirosina e ornitina respectivamente (Figura 6).

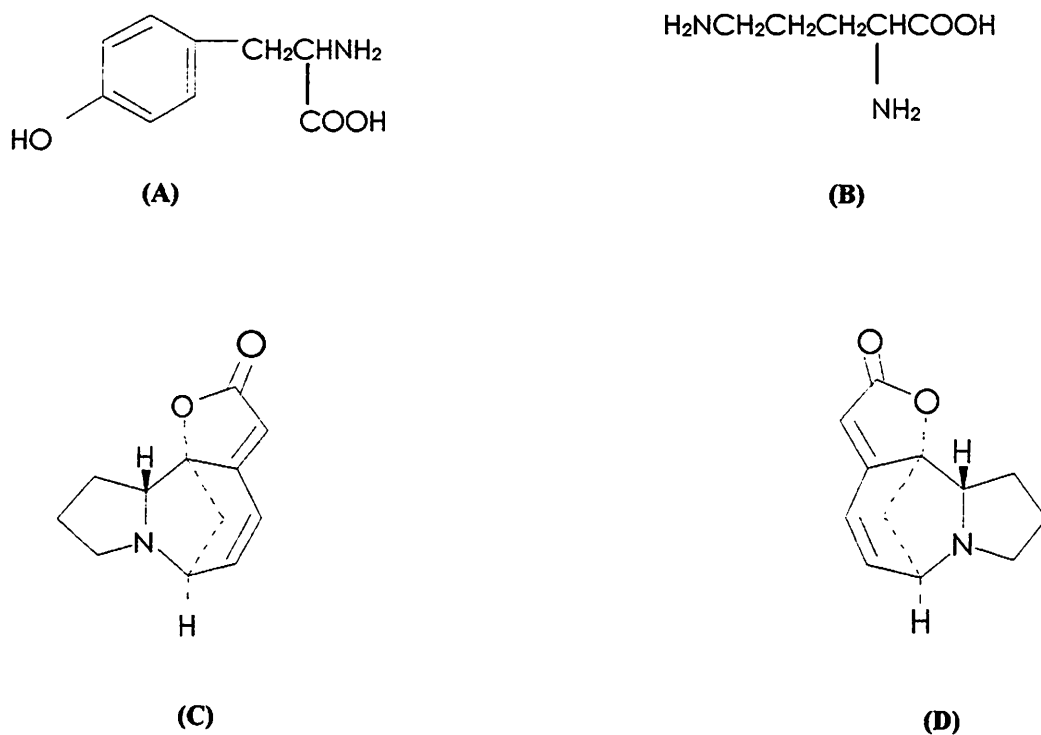


FIGURA - 6 Estruturas químicas de (A) tirosina, (B) ornitina, (C) norsecurinine, e (D) ent-norsecurinine (Jacobi et al., 1989).

3.2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o crescimento e desenvolvimento das plantas através do teor de princípio ativo (alcalóides totais) em quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.) em resposta à calagem e adubação nitrogenada.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento constou de um ensaio de adubação da espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), conduzido em casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras - MG.

3.3.1 Substrato

O substrato utilizado foi um solo proveniente do município de Nazareno - MG, classificado como Cambissolo Álico, com textura média, fase campo cerrado, relevo ondulado, substrato gnaisse-granítico; escolhido devido à sua baixa disponibilidade de nutrientes; coletado na camada de 0-20 cm de profundidade, seco ao ar, e peneirado em malha de 5 mm de abertura.

As determinações químicas e físicas do solo (Quadros 1 e 2) foram realizadas de acordo com as metodologias de Vettori (1969) com modificações da EMBRAPA (1979) e Camargo et al. (1986).

QUADRO.1 Análise química e textural do substrato antes da instalação do experimento, realizada pelos Laboratórios de Análise do Solo - DCS - UFLA, Lavras - MG, 1996.

Características analisadas	Unidades	Valores
pH em água	—	4,7
P	mg.dm ⁻³	2,0
K	mmol _c /dm ³	1,0
Ca	mmol _c /dm ³	8,0
Mg	mmol _c /dm ³	2,0
Al	mmol _c /dm ³	7,0
H + Al	mmol _c /dm ³	32,0
Zn	mg.dm ⁻³	1,1
Cu	mg.dm ⁻³	0,2
Fe	mg.dm ⁻³	65,4
Mn	mg.dm ⁻³	9,3
S	mg.dm ⁻³	1,1
B	mg.dm ⁻³	0,13
m	%	33
MO	g.kg ⁻¹	17
Areia	g.kg ⁻¹	660
Limo	g.kg ⁻¹	170
Argila	g.kg ⁻¹	170

3.3.2 Tratamentos

Aplicação de calcário foi realizada com objetivo de elevar o pH para 6,0; nos tratamentos com calagem. Foram aplicados CaCO₃ e MgCO₃ na forma de sais p.a. numa proporção de Ca:Mg de 4:1, sendo as quantidades definidas por meio de uma curva de incubação.

A fertilização básica de cada tratamento consistiu de : 100 mg P.kg⁻¹; 125 mg K.kg⁻¹; 30 mg S.kg⁻¹; 0,8 mg B.kg⁻¹; 3,6 mg Mn.kg⁻¹; 1,3 mg Cu.kg⁻¹; 1,5 mg Fe.kg⁻¹; 0,15 mg Mo.kg⁻¹; 4,0 mg Zn.kg⁻¹. As doses de nitrogênio foram aplicadas em quatro vezes; sendo que junto com a fertilização básica foi adicionado 30 mg.kg⁻¹ de N nos tratamentos 3 à 10. Mais uma dose de 30 mg N.kg⁻¹ foi aplicada após 20 dias do transplântio, nos tratamentos 5 à 10. Após 40 dias do transplântio, aplicou-se mais 40 mg.kg⁻¹ de N nos tratamentos 7 à 10. E nos tratamentos 9 e 10 foi aplicado o restante da dose de N (50 mg.kg⁻¹ de N) após 60 dias do transplântio.

Os nutrientes foram aplicados em cada caso na forma de soluções preparadas à partir de sais p.a., em cada vaso, antes do transplântio das mudas, utilizando-se as seguintes fontes: NH₄NO₃, KH₂PO₄, CaSO₄.2H₂O, H₃BO₃, MnCl₂.4H₂O, CuCl₂.2H₂O, FeCl₃.6H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, e ZnCl₂.

Após 30 dias da fertilização e incubação do solo e antes do plantio foram coletadas amostras de cada tratamento para análise da composição química do substrato, conforme metodologias já descritas anteriormente (Quadro.2).

3.3.3 Preparo das mudas

As plantas foram obtidas a partir da germinação de sementes coletadas em Belém - PA em dezembro de 1995. Estas plantas foram identificadas e uma amostra foi colocada sob nº ID 84/96, no Laboratório de Botânica-Herbário IAN-EMBRAPA-CPATU-Belém-PA, como sendo *Phyllanthus niruri* L.

O quebra-pedra foi semeado em sacos plásticos contendo solo de baixa fertilidade com areia (2:1), sendo que, após a germinação (10 dias após semeadura) as plântulas foram mantidas em casa de vegetação sob nebulização intermitente até indução dos tratamentos

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), arranjado num fatorial de 5 x 2, sendo 5 doses de N (0; 30; 60; 100; 150 mg.dm⁻³ de N), e 2 níveis de calagem (sem e com calcário, visando a elevação do pH para 6,0) com 6 repetições.

3.3.4 Condução do experimento

Foram transplantadas 8 mudas com aproximadamente 5,0 cm de altura, cuidadosamente retiradas dos sacos plásticos e selecionadas quanto à uniformidade. Após 7 dias foi efetuado um desbaste, deixando-se 5 plantas por vaso selecionadas de acordo com a sua uniformidade em altura.

Os vasos foram irrigados diariamente com água deionizada e tinham sua umidade ajustada a 60% do VTP, de acordo com monitoramento realizado por meio de pesagens periódicas.

Aos 40 e 50 dias após a implantação do experimento foi realizada uma adubação complementar com 100 mg P.Kg⁻¹, utilizando-se como fonte H₃PO₄ nos tratamentos sem calagem. Isto foi necessário pelo fato das plantas presentes nestes tratamentos estarem apresentando sintomas de deficiência de P (queda de folíolos, folhas e até senescência de plantas).

A duração do experimento foi de 80 dias.

QUADRO.2 - Análises química do substrato após a aplicação dos tratamentos, realizada pelo Laboratório de Análise do Solo
- DCS - UFLA, Lavras - MG, 1996.

Características	Tratamentos									
	Sem calagem					Com calagem				
	0	30	60	100	150	0	30	60	100	150
pH-(em água)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
P mg.dm ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
K mmol./dm ³	1,41	1,77	1,56	1,44	1,49	1,08	0,85	1,05	0,79	0,87
Ca mmol./dm ³	7,0	8,0	8,0	9,0	8,0	28,0	28,0	29,0	27,0	26,0
Mg mmol./dm ³	6,0	5,0	6,0	4,0	5,0	8,0	8,0	8,0	7,0	10,0
Al mmol./dm ³	7,0	6,0	7,0	7,0	7,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H+Al mmol./dm ³	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	13,0	12,0	12,0	12,0	13,0
m %	33	32	31	36	38	3	3	3	3	3
S mg.dm ⁻³	37,8	30,3	32,4	26,3	28,3	43,9	52,0	50,6	48,8	49,9
Zn mg.dm ⁻³	0,9	0,8	1,0	0,8	1,2	1,2	0,8	1,7	0,9	0,9
Cu mg.dm ⁻³	0,1	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2
Fe mg.dm ⁻³	64,6	64,2	64,5	65,0	64,9	53,3	50,0	50,6	48,0	51,8
Mn mg.dm ⁻³	8,3	7,9	8,6	8,2	8,4	8,5	7,1	8,5	7,4	8,0
B mg.dm ⁻³	0,3	0,13	0,20	0,13	0,23	0,23	0,20	0,26	0,23	0,26

3.3.5 Características avaliadas

Ao final do período experimental foram avaliadas as seguintes características:

- a) Altura de planta;
- b) Peso da matéria seca total (MST), com base no peso da matéria seca das folhas, caules, e raízes;
- c) Teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn, Fe, Mn, e Cu na matéria seca da parte aérea;
- d) Conteúdo de N, P, K, S, Ca, e Mg na matéria seca da parte aérea, com base no peso de matéria seca da parte aérea e os seus teores de macronutrientes.

Para a determinação da altura de planta, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca do sistema radicular, procedeu-se da seguinte forma: a parte aérea foi cortada rente ao colo da planta, medida e acondicionada em sacos de papel. As raízes foram cuidadosamente retiradas do solo, lavadas com água deionizada, e acondicionadas em sacos de papel. Logo após foram levados à estufa com aeração forçada à temperatura de 45°C (temperatura máxima para não haver perdas dos alcalóides) por 96 horas, para secagem até peso constante,

A parte aérea das plantas foi triturada em moinho do tipo Willey. Posteriormente, efetuou-se a digestão nitro-perclórica (Zaroski e Burau, 1977), determinando-se nos extratos, o P colorimetricamente pelo método da vitamina C (Braga e Defelipo, 1974). Os teores de K foram determinados por fotometria de chama; os teores de Ca, Mg, S, Zn, Cu, Fe, Mn, e B por espectrofotometria de absorção atômica (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1989). A determinação do N total, após digestão sulfúrica, foi feita pelo método de Kjeldahl (Bremner e Mulvaney, 1982).

Estas análises químicas foram realizadas no Laboratório de Análises Foliar do Departamento de Ciências dos Solos - DCS - UFLA, Lavras - MG.

3.3.6 Análise estatística

Os dados e parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância pelo programa SAEG, STATISTICA e analisados por regressão polinomial.

3.3.7 Extração e quantificação dos alcalóides totais

A extração dos alcalóides totais foi realizada seguindo metodologia definida por Calixto et al. (1984). No Laboratório de Química Orgânica/DQI/UFLA foram realizadas extrações etanólicas por percolação da matéria seca moída da parte aérea do *P. niruri* L.; sendo que as amostras compostas correspondiam as repetições de todos os tratamentos submetidos a adubação nitrogenada com e sem calagem.

A solução etanólica obtida foi concentrada em evaporador rotatório até completa evaporação do solvente. O extrato concentrado foi dissolvido em éter de petróleo e acidificado com HCl 0,3 N. Posteriormente foi realizada filtragem da solução, elevado pH para 9,0 pela adição de amônia e extraído com clorofórmio.

Após a evaporação do solvente à aproximadamente 40°C, o resíduo foi utilizado nos testes preliminares de eluentes para utilizar-se na cromatografia de adsorção (coluna). Nestes testes foi utilizado a cromatografia de camada delgada (CCD), a qual teve como fase fixa sílicagel-G tipo 60 em placas de vidro de 2,5 x 10,0 cm, tendo como fase móvel vários eluentes e

suas composições. Foi observada melhor separação dos alcalóides quando as placas foram eluídas com clorofórmio, clorofórmio/acetona (80:20) e clorofórmio/acetona (50:50). Então a cromatografia de coluna foi realizada em coluna de 3,0 x 40,0 cm com sílica-60 (Merck), utilizando-se os eluentes anteriormente definidos. Frações de 50 ml foram coletados e monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), tendo como fase móvel = clorofórmio-acetona 80:20).

Duas frações eluídas em 100% de clorofórmio, da matéria seca da parte aérea dos tratamentos submetidos a adubação nitrogenada e calagem, foram analisadas em espectrofotometria de Infravermelho (IV), no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, em Belo Horizonte.

Posteriormente, sob orientação do Prof. Custódio Donizete Santos, estas frações (eluídas em clorofórmio) de todos os tratamentos submetidos a adubação nitrogenada e calagem foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando comprimento de ondas de 270 nm. A curva padrão foi construída a partir de amostras de alcalóides extraídos como descrito acima. Todavia, a quantificação dos alcalóides totais na matéria seca da parte aérea dos tratamentos submetidos a fertilização nitrogenada e sem calagem não foram realizadas, devido à pequena quantidade de material vegetal.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Crescimento das plantas

A calagem e adubação nitrogenada influenciaram no crescimento e desenvolvimento do *Phyllanthus niruri* L. Esta influência foi significativamente elevada com a aplicação da calagem como mostra a Figura 7.

Nos tratamentos sem calagem a altura das plantas decresceram linearmente com o aumento das doses de N (Figura 8). A variação apresentada pelas características de crescimento provavelmente demonstra a sensibilidade desta espécie à solos ácidos, sob influência de Al no solo. Justificando, portanto as restrições ao crescimento do sistema radicular e da parte aérea, possivelmente deve ter afetado a divisão e alongação celular das regiões meristemáticas, segundo Reding e Taylor (1989). Unander e Blumberg (1991) estudando os efeitos ambientais no crescimento e produção de princípio ativo de algumas espécies de *Phyllanthus*, relataram que as plantas não sobreviveram mais que duas semanas a pH abaixo de 4,0.

As plantas de *Phyllanthus niruri* L. cultivadas em solo onde realizou-se calagem apresentaram altura média de 40,69 cm, porém a dose de máxima eficiência econômica de N (dose de N equivalente a 90% da altura máxima média das plantas, sendo utilizada pela maioria dos pesquisadores segundo Hoffmann, 1992; situando-se sempre um pouco abaixo da colheita máxima fisiológica, de acordo com Raij, 1991) foi de 65,59 mg N.dm⁻³ na altura de 37,94 cm (Figura 9).



FIGURA.7 - Efeito da calagem e fertilização nitrogenada em plantas de *Phyllanthus niruri* L.; 1. Com calagem, 2. Sem calagem. N-0 mg.dm⁻³, N-30 mg.dm⁻³, N-60 mg.dm⁻³, N-100 mg.dm⁻³, N-150 mg.dm⁻³. UFLA, Lavras - MG, 1996.

O gráfico da matéria seca total (MST) produzida em solo sem calagem apresentado na Figura 10, mostra resultados semelhantes aos encontrados para altura de plantas, ou seja, a MST decresce a medida em que se aumenta as doses de N. Enquanto que, no gráfico de MST nos tratamentos com calagem (Figura 11), a dose equivalente a 90% da produção máxima média de matéria seca total foi de 77,81 mg de N.dm⁻³ de solo. Todavia, Silva Filho et al. (1996)

trabalhando com *Phyllanthus stipulatus*, em experimento de campo, encontrou o máximo de matéria seca de 546,0 g de MST/m² de solo, adubando com 10 kg de composto orgânico. Em estudos semelhantes com *Mentha arvensis*, Kothari, Singh e Singh (1987) encontraram 159,9 kg.ha⁻¹ de N como a dose de máxima eficiência econômica de nitrogênio para o genótipo MA2.

Os tratamentos em que as plantas foram submetidas a 60 mg N.dm⁻¹ e sem calagem, como são mostrados nas Figuras 8 e 10, não se ajustaram bem à curva de regressão. Isto possivelmente deve ter ocorrido devido a variabilidade genética das plantas, as quais foram obtidas por germinação de sementes.

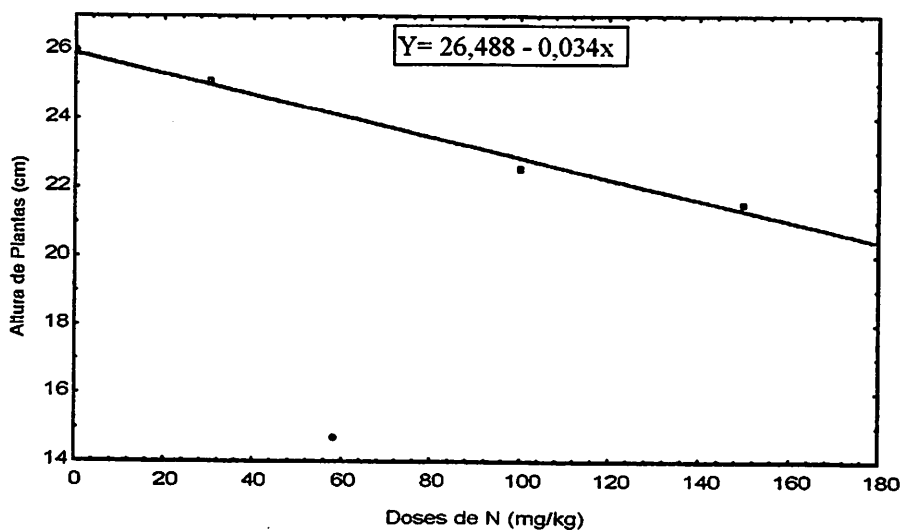


FIGURA - 8. Altura média das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a adubação nitrogenada e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1996.

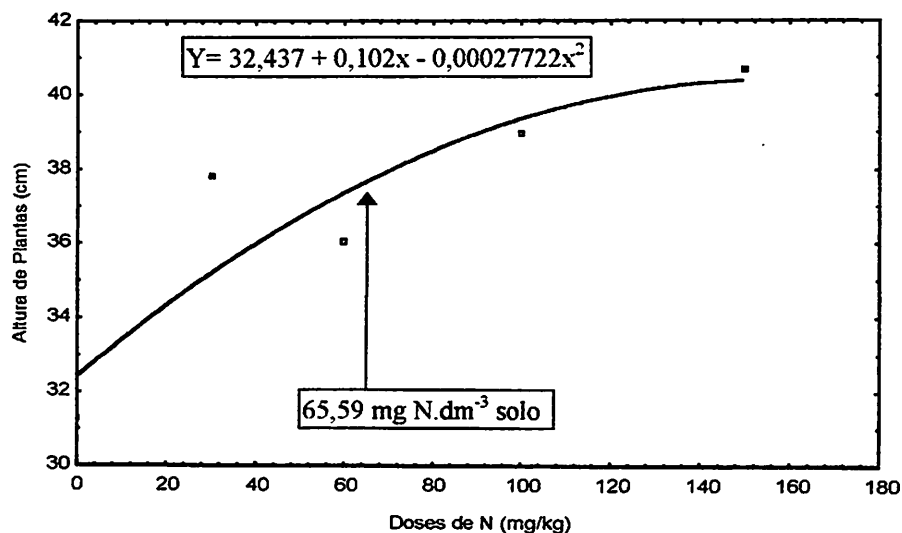


FIGURA - 9 Dose de nitrogênio equivalente a 90% da altura máxima média das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a adubação nitrogenada e a calagem. UFLA, Lavras - MG, 1996.

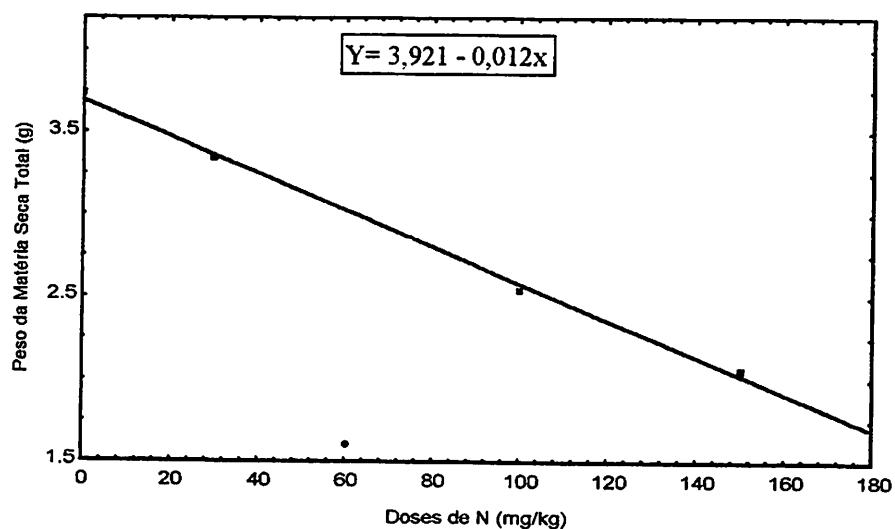


FIGURA - 10 Matéria seca total (MST) média de plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a adubação nitrogenada e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1996.

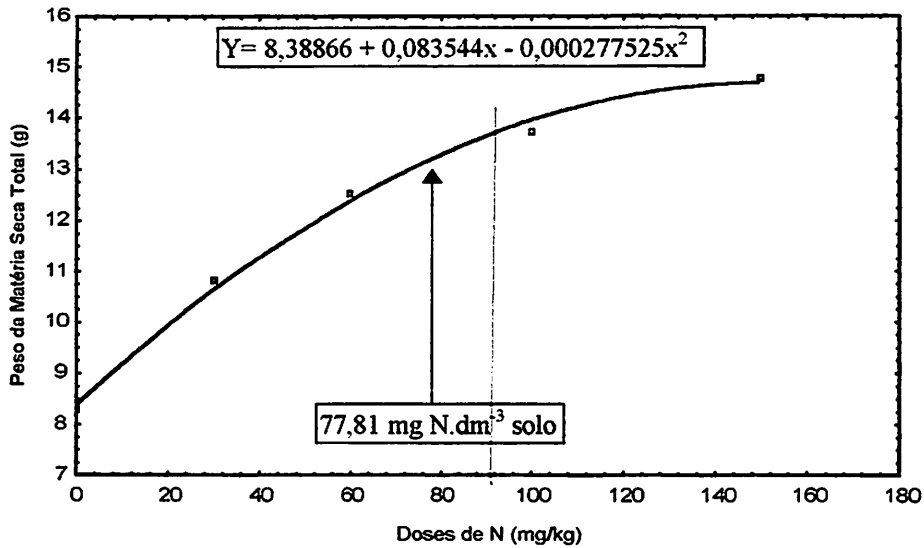


FIGURA - 11 Dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção média máxima de (MST) das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1996.

3.4.2 Teores e acúmulo de nutrientes

Observa-se no Quadro 3 que as plantas de *Phyllanthus niruri* L. tiveram uma absorção estatisticamente significativa maior dos macronutrientes P, S, Ca, e Mg nos tratamentos onde realizou-se calagem independentemente da adubação nitrogenada. O mesmo não foi observado para o K onde a maior absorção ocorreu nos tratamentos sem calagem.

O nitrogênio foi absorvido em quantidades crescentes na ausência e presença de calagem em função da adubação com o nutriente (Quadro 3). Brasil (1996) em trabalho semelhante com mudas de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*, Starf.) encontrou a máxima produção de matéria seca com adubação nas doses 180 mg N.kg⁻¹ e 120 mg P.kg⁻¹. Enquanto

Figueira et al. (1996) em estudo com *Artemisia annua* L., encontrou a máxima produção de matéria seca, de artemisinina e ácido artemisinínico com a dose de 280 mg N.L⁻¹ em cultivo hidropônico.

Esses resultados confirmam a necessidade de calagem para o cultivo de plantas de *Phyllanthus niruri* L., as quais na ausência de correção do solo, apresentam queda na absorção de P, S, Ca, Mg (Quadro3) e conseqüentemente menor altura de plantas e produção de matéria seca total (Figuras 8-11).

O conteúdo de nutrientes é utilizado para demonstrar o efeito de concentração ou diluição dos elementos nos tecidos das plantas em função da absorção dos nutrientes adicionados no solo e conseqüentemente produção de matéria seca, de acordo com Jarrel e Beverly (1981).

QUADRO.3. Teor de macronutrientes na matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas da espécie *Phyllanthus niruri* L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Doses N	Cal	N	P	K	S	Ca	Mg
mg.dm ⁻³		g.kg ⁻¹ MSPA					
0	0	13,4	2,4	18,9	2,2	12,8	1,5
30	0	23,5	3,4	25,1	2,7	13,7	1,9
60	0	24,2	2,6	25,5	2,2	14,4	1,5
100	0	24,8	2,4	23,7	1,8	13,8	1,4
150	0	30,0	2,8	28,2	1,7	14,6	1,4
0	1	13,5	3,7	14,3	2,3	15,6	3,5
30	1	16,9	3,6	14,1	2,7	16,6	3,5
60	1	21,9	3,8	16,2	2,8	18,3	3,9
100	1	23,9	4,2	15,6	2,7	18,0	3,8
150	1	25,2	4,0	16,0	2,7	17,8	3,5
DMS (1%) - Cal x N	—	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1

Nos tratamentos sem calagem o conteúdo dos macronutrientes foi estatisticamente menor que nos sob efeito de calagem (Quadro 4), demonstrando um efeito de concentração, que ocorreu em consequência da diminuição na produção de matéria seca total nestes tratamentos (Figuras 10 e 11, Quadros 3 e 4).

Nos tratamentos sem correção do solo, o conteúdo dos macronutrientes decresceu a medida que aumentou-se as doses de N no solo. Isto ocorreu em consequência do pequeno aumento na absorção dos nutrientes pelas plantas e acentuado decréscimo na produção de matéria

seca total, exceto K que apresentou uma absorção crescente a medida que aumentou-se as doses de N no solo.

O efeito sinérgico de N, P, K, S, Ca e Mg na matéria seca da parte aérea das plantas de *P. niruri* L., ocorreu nos tratamentos onde foi realizada calagem, onde houve significativo aumento do conteúdo dos macronutrientes a medida em que aumentou-se as doses de N. Este efeito de acordo com Jarrel e Beverly (1981) indica que o teor, conteúdo e produção de matéria seca aumentaram (Figura 11, Quadros 3 e 4).

De acordo com Furtini Neto (1988) a eficiência de utilização do nutriente absorvido é tão importante quanto a eficiência de absorção para a produção de biomassa em relação ao suprimento do nutriente. A eficiência de utilização do N pelas plantas de quebra-pedra na presença de calagem foi visivelmente maior (Quadro 4) e estatisticamente superior aos tratamentos sem calagem. Parece que nos tratamentos sem calagem, quanto maior a dose de nitrogênio, menor sua eficiência de utilização, embora essa tendência não tenha sido observada na dose de 60 mg.dm^{-3} . Nos tratamentos em que foi realizada calagem, a máxima eficiência de utilização ($584,8 \text{ g}^2.\text{mg}^{-1}.10^{-3}$) ocorreu na dose 30 mg.dm^{-3} de N. Todavia, a máxima eficiência ocorreu em doses menores do que as necessárias para alcançar a máxima produção da matéria seca (Figura 11 e Quadro 4)

QUADRO.4. Conteúdo de macronutrientes da matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência de utilização do N pelas plantas da espécie *Phyllanthus niruri* L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Doses de N	Cal	N	P	K	S	Ca	Mg	Ef. Util. N
mg.dm ⁻³		mg/vaso						g ² /mg.10 ⁻³
0	0	42,8	7,5	60,3	7,2	40,8	4,9	240,8
30	0	73,0	10,7	78,3	8,4	42,4	5,8	132,4
60	0	31,2	3,5	33,1	2,8	18,6	1,9	53,9
100	0	54,8	5,4	52,5	4,0	30,6	3,1	90,3
150	0	52,0	4,8	49,1	2,9	25,4	2,3	57,8
0	1	99,8	27,6	105,6	17,1	115,2	25,7	548,7
30	1	165,1	34,5	136,8	26,3	160,9	33,8	584,8
60	1	250,2	43,7	185,5	32,2	209,5	45,0	527,2
100	1	301,2	53,4	196,8	33,8	229,2	47,9	530,1
150	1	343,8	54,4	217,7	37,1	243,6	47,8	541,6
DMS(%)-Cal x N	—	10,5	2,9	7,522	1,5	7,9	2,3	36,9

O ajuste das equações do conteúdo de macronutrientes e eficiência de utilização de N na MSPA não se adequaram aos modelos testados (Quadro 5).

QUADRO.5 Equações de regressão do conteúdo de macronutrientes e eficiência de utilização de N na matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas da espécie *Phyllanthus niruri* L. submetidas a tratamentos com ou sem calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Variáveis	Equações de Regressão	R ²
Conteúdo de N	$Y = 73,430912 + 1,4497449X - 0,00413790X^2$	0,22
Conteúdo de P	$Y = 19,019618 + 0,0812308X$	0,37
Conteúdo de K	$Y = 85,720336 + 0,5558158X - 0,00161318X^2$	0,24
Conteúdo de S	$Y = 12,907966 + 0,1085520X - 0,00042002X^2$	0,65
Conteúdo de Ca	$Y = 78,795604 + 0,7731958X - 0,00264465X^2$	0,53
Conteúdo de Mg	$Y = 15,277767 + 0,1783179X - 0,00075317X^2$	0,57
Ef. Utilização de N	$Y = 370,756601 - 0,5930985X$	0,44

3.4.3 - Extração e quantificação de alcalóides

Os espectros de Infravermelho (I.V.) dos compostos isolados a partir da parte aérea de plantas de *P. niruri* L. submetidas ao tratamento 7 (com 100 mg N.dm⁻³ de solo e calagem) e tratamento 4 (com 30 mg N.dm⁻³ e sem calagem) são mostrados nas Figuras 12 e 13. Esses espectros são bastantes semelhantes entre si, apresentando sinais de absorção dos grupos mais característicos para estes tipos de compostos. Em todos os espectros pode-se observar na região

compreendida entre 2700-3000 cm^{-1} , sinais de absorção de estiramentos simétricos e assimétricos devido a sobreposição de grupos metilas ($-\text{CH}_3$); metilênicos ($-\text{CH}_2$) e metínicos ($-\text{CH}$).

Em torno de 2200-2300 cm^{-1} observa-se uma banda fina característica de uma ligação, de um éter cíclico ou de um anel heterocíclico com um átomo de N.

Verifica-se na região de frequência compreendida entre 1750-1780 cm^{-1} sinais correspondentes às vibrações de estiramento do grupo carbonila. Absorções devido a estiramento das duplas ligações aparecem nitidamente em torno de 1650 cm^{-1} , confirmando a presença da insaturação. A presença da ligação C-O é evidenciada em torno de vibrações que aparecem aproximadamente entre 1110-e 1280 cm^{-1} , respectivamente. A presença de um grupo amino terciário é verificada pela absorção que está presente em torno de 1480 cm^{-1} (Silverstein, Bassler e Morrill, 1994).

A quantidade dos alcalóides totais na matéria seca da parte aérea (MSPA) e a matéria seca da parte aérea dos tratamentos submetidos a calagem e fertilização nitrogenada é mostrada na Figura 14. Observa-se um aumento gradual na concentração de alcalóides na MSPA a medida que se aumentou as doses de nitrogênio aplicadas. A máxima produção de alcalóides totais na dose de N equivalente a 90% a máxima produção de matéria seca da parte aérea (79,89 mg N dm^{-3} solo) foi de 0,676 mg alcalóides totais/g de MSPA, justificando, portanto, uma adubação nitrogenada visando maior produção econômica de matéria seca juntamente com uma maior produção econômica de alcalóides totais nesta espécie. Nowacki, Jurzysta e Górski (1975) investigando o efeito da disponibilidade de N para síntese de alcalóides em *Nicotiana* sp e *Datura* sp encontraram acréscimo no conteúdo de N na matéria seca e aumento nos teores de alcalóides nas plantas com o aumento da adubação nitrogenada, em relação ao controle. Porém diferentes resultados foram

obtidos por Kothari, Singh e Singh (1987) trabalhando com *Mentha arvensis*, no qual não houve aumento significativo da concentração de óleo nas doses de N testadas.

A determinação da quantificação dos alcalóides totais na matéria seca da parte aérea dos tratamentos submetidos a fertilização nitrogenada e sem calagem não foram realizadas, devido a pequena quantidade de material vegetal, apresentou-se apenas os resultados da análise de espectrometria de Infravermelho (Figura 13).

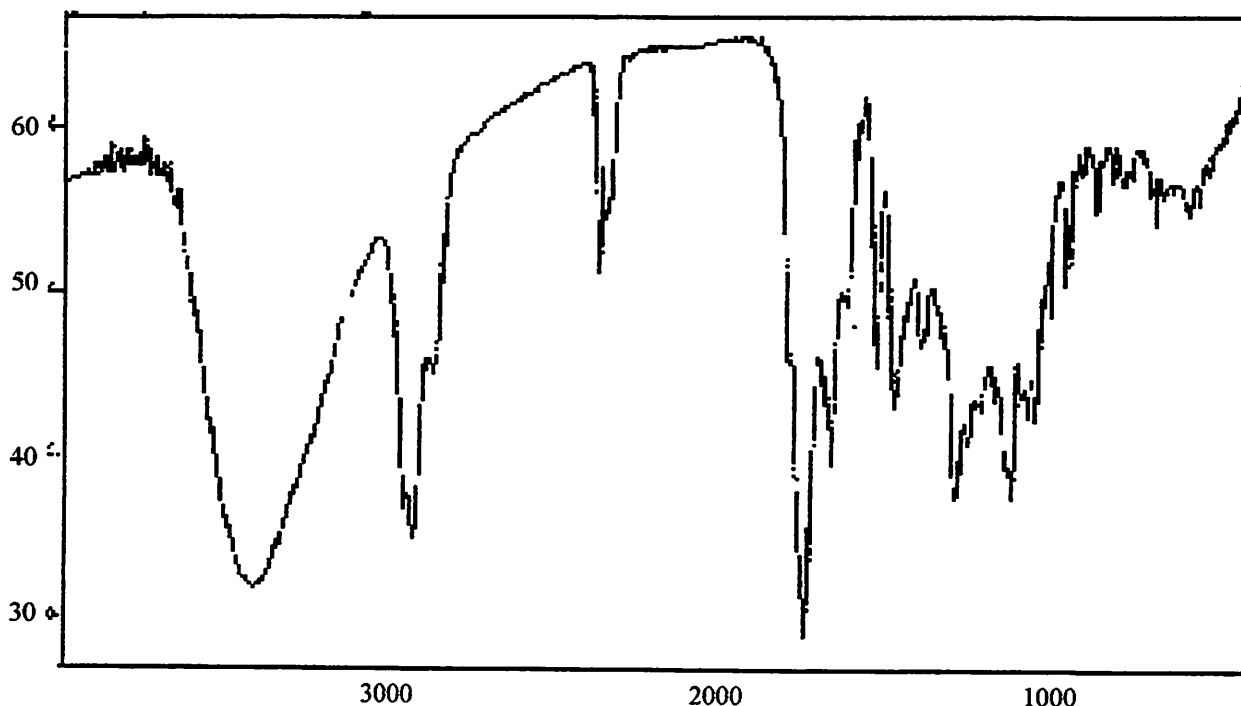


FIGURA 12 - Espectro de infravermelho de alcalóides na matéria seca da parte aérea de *Phyllanthus niruri* L., do tratamento 7 - 100% de clorofórmio, submetido a calagem e com 100 mg N.dm⁻³ de solo. UFLA, Lavras - MG, 1997.

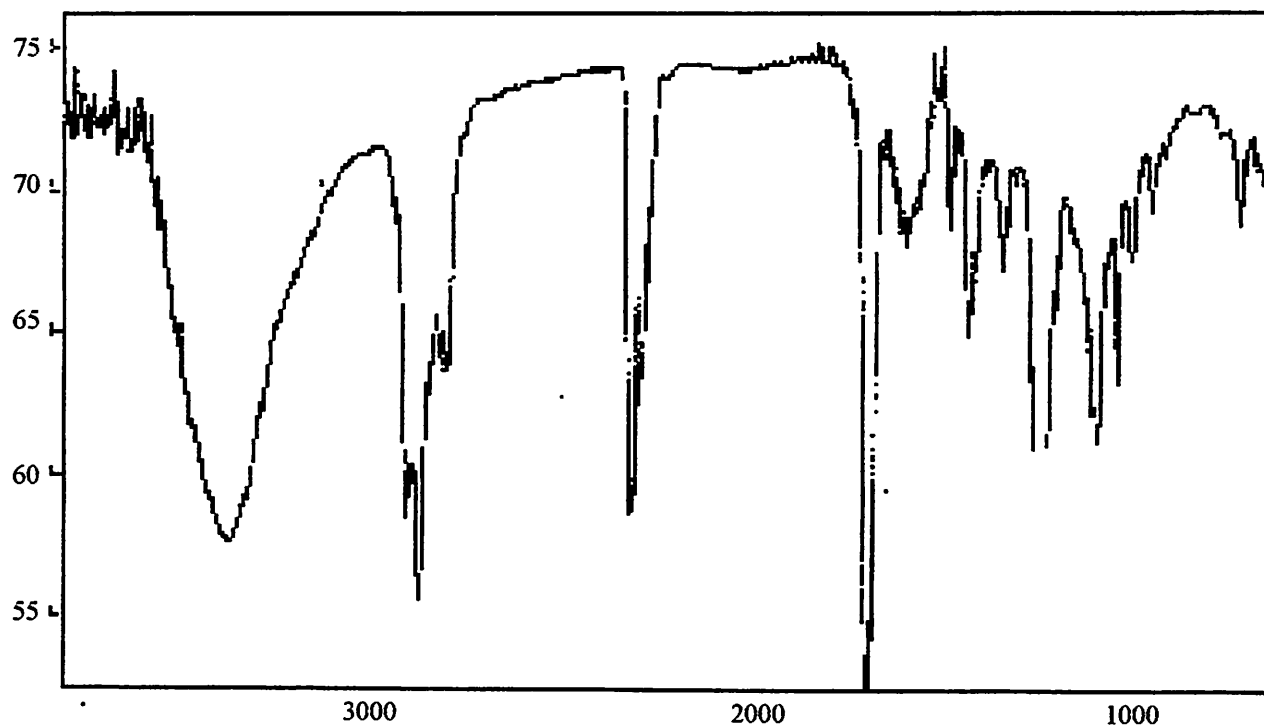


FIGURA 13 - Espectro de infravermelho de alcalóides na matéria seca da parte aérea de *Phyllanthus niruri* L., do tratamento 4 - 100% de clorofórmio, submetido a 30 mg N.dm⁻³ de solo e sem calagem. UFLA, Lavras - MG, 1997.

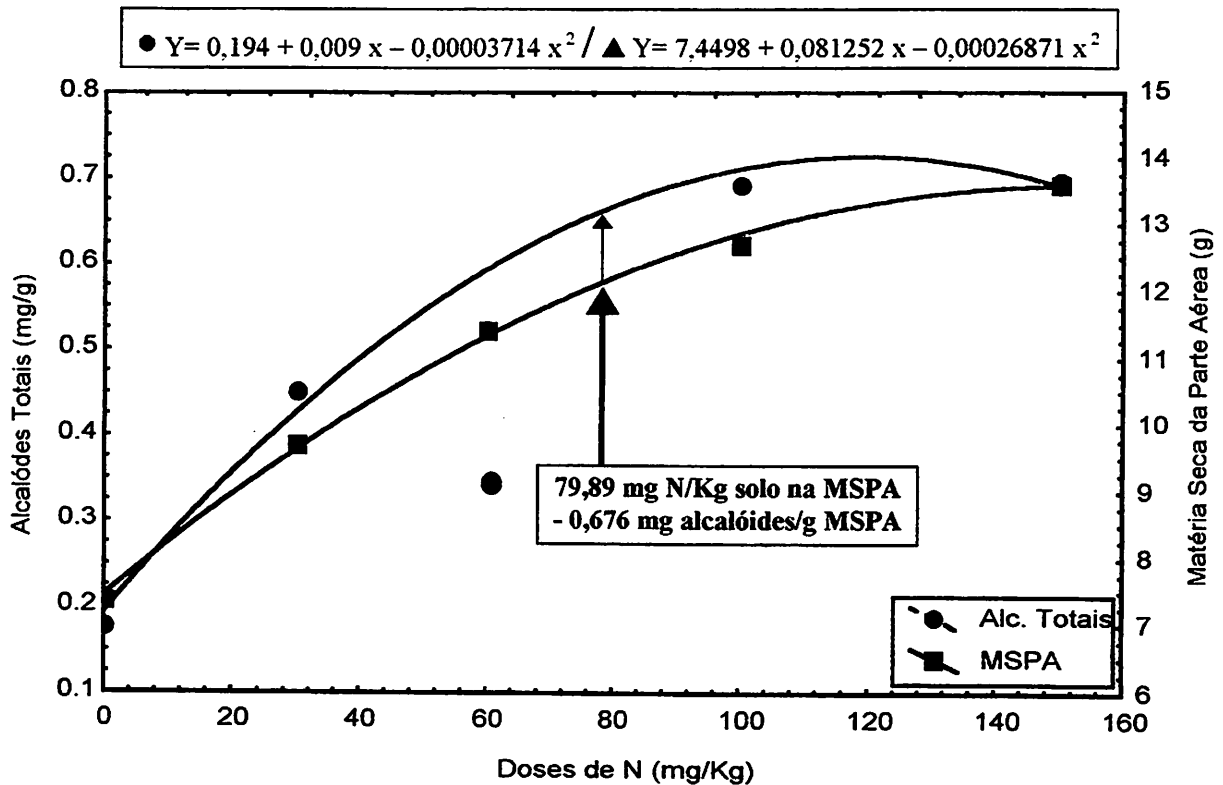


FIGURA.14 - Alcalóides totais na matéria seca da parte aérea (●), matéria seca da parte aérea (▲), máxima produção de alcalóides totais na dose de nitrogênio equivalente a 90% da produção máxima de matéria seca total das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidos a calagem e adubação nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

3.5 CONCLUSÕES

A acidez do solo foi limitante ao crescimento da espécie *Phyllanthus niruri* L.

A dose de nitrogênio equivalente a 90% da máxima produção de matéria seca da parte aérea foi de 79,89 mg N.dm⁻³ de solo, a qual proporcionou uma produção de alcalóides totais de 0,676 mg.g⁻¹ de MSPA.

O quebra-pedra é portanto uma espécie responsiva a calagem e adubação nitrogenada. Justificando, portanto, uma adubação nitrogenada visando maior produção econômica de matéria seca e alcalóides totais na parte aérea nesta espécie

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVA, A.K.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. The role of calcium in alleviating aluminum toxicity. **Austrian Journal Agricultural Research**, Melbourne, v.37,p.375-382, 1986.
- ANNETT, H.E. Factors influencing alkaloidal content and yield of latex in the opium poppy (*Papaver somniferum*). **Biochemical Journal**, London, v.14, n.2, p.618-636, 1920.
- ANWAR, M.; PATRA, D.D.; MUKHOPADHYAY, A.K.; SINGH, D.V. Relationship of manganese with iron and zinc with respect to latex yield and composition in opium poppy (*Papaver somniferum* Linn) under two fertility conditions. **Fertilizer Research**, Netherlands, v.34, n.5, p.55-58. 1993.
- BALANDRIN, M.F.; CLOKE, J.A. Medicinal, aromatic, and industrial material from plants. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v.4, 540p.
- BALL, D.M.; HOVELAND, C.S. Alkaloid levels in *Phalaris aquatica* L. as affected by environment. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, n.76, p.977-980, Nov/Dec. 1978.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO,B.V. determinação espectofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.21, n.113, p.73-85, jan/fev., 1974.
- BRASIL, E.C. Níveis de nitrogênio, fósforo e potássio na produção de mudas de jaborandi. REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 22, Manaus, 1996. **Anais...Manaus: UFAM**, 1996. p.666-667.
- BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L., (Ed.). **Methods of soil analysis; chemical and microbiological properties**. 2.ed. Madison: ASA/SSSA, 1982. v.31, p.595-624.

- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALLE, R.M.R.; RAE, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. **Brazilian Journal Medicinal Biological Research**, Ribeirão Preto, v.17, n.3 p.313-321, 1984.
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; e VALADARES, J.M.A.S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas: IAC, 1986. 94p.
- DINEV, N.; STANCHEVA, I. Changes in nitrate reductase activity, plastid pigment content, and plant mineral composition of wheat, rye, and triticale grown in the presence of aluminum. **Journal of Plant Nutrition**, Maryland, v. 16, n.12. p.2397-2409, Dec. 1993.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-Serviço Nacional de Levantamento e conservação do solo. **Manual de métodos de análise do solo**. Rio de Janeiro, 1979. n.p.
- FIGUEIRA, G.M.; DECHEN, A.R.; CARMELLO, Q.A.C.; REHDER, V.L.G. Nutrição mineral, produção e concentração de artemisinina em *Artemisia annua* L. REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 22, Manaus, 1996. **Anais...** Manaus: UFAM, 1996. p.592-593.
- FLÜCK, H. The influence of climate on the active principles in medicinal plants. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.13, n.7, p.361-383, June. 1955a.
- FLÜCK, H. The influence of the soil on the content of active principles in medicinal plants. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.13, n.7, p.153-163, June. 1955b.
- FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerances of plant species and varieties in acid soils. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, n.2, p.150-155, fev. 1975.
- FURTINI NETO, A.E. **Efeito do enxofre no crescimento e assimilação de nitrogênio por diferentes espécies de eucalipto**. Lavras:UFLA, 1988. 95p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

- GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I. Alkaloids. In: _____. **Introduction to plant biochemistry**. Oxford: Pergamon Press, 1972. p.293-308
- GORINOVA, N.I.; ATANASSOV, A.I.; STOJANOV, D.V.; TENCHEVA, J. Influence of chemical composition of soils on the galanthamine content in *Leucojum Aestivum*. **Journal of Plant Nutrition**, Maryland, v.16, n.9, p.1631-1636, Sept. 1993.
- HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecule Biology**, Palo Alto, v.45, p.257-285, 1994.
- HOFFMANN, C.R. **Nutrição mineral e crescimento da braquiária e do colômbio, sob influência das aplicações de nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre em latossolo da região noroeste do Paraná**. Lavras: UFLA, 1992. 204p. (Dissertação-Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- JARREL, W.M.; BEVERLY, R.B. The dilution effect in plant nutrition studies. **Advances in Agronomy**, New York, v.34, n.1, p.197-224, 1981.
- JOSHI, B.S.; GAWAD, D.H.; PELLETIER, S.W.; KARTHA, G.; BHANDARY, K. Isolation and structure (X-ray analysis) of ent-norsecurinine, an alkaloid from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v.49, n.4, p.614-620, 1986.
- KENNEDY, C.W.; BUSH, L.P. Effect of environmental and management factors on the accumulation of N-acetyl and N-formyl loline alkaloids in tall rescue. **Crop Science**, Madison, v.23, n.3, p.547-552, May/June. 1983.
- KHARWARA, P.C.; AWASTHI, O.P.; SINGH, C.M. Effect of nitrogen, phosphorus and time of nitrogen application on yield and quality of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). **Indian Journal of Agronomy**, New Delhi, v.31, n.1, p.26-28, Mar. 1986.
- KOTHARI, S.K.; SINGH, V.; SINGH, K. Response of Japanese mint (*Mentha arvensis*) to varying levels of nitrogen application in Uttar Pradesh foot-hills. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v.57, n.11, p.795-800, Nov. 1987.

- LINDSEY, K.; YEOMAN, M.M. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.34, n.145, p.1055-1065, 1983.
- MAHDI, M.Z.; ABOU DAHAB, A.M.; EL-KHATEEB, M.A. Effect of N. fertilization on growth and essential oil of *Eucalyptus torquata* and *E. angulosa*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.208, p.73-81, 1987.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1989. 201p.
- MANTANARI JÚNIOR, L.; FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P.M. Influência da fertilização NPK na biomassa e no teor de alcalóide de *Atropa belladonna*, Linn. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.5, n.1, p.71, jun. 1993.
- NOWACKI, E.; JURZYSTA, M.; GORSKI, P. Effect of availability of nitrogen on alkaloid synthesis in *Solanaceae*. **Bulletin de L'Académie Polonaise des Sciences**, v.23, n.3, p.219-225, 1975.
- NOWACKI, E.; JURZYSTA, M.; GORSKI, P.; NOWACKA, D.; WALLER, G.R. Effect of nitrogen nutrition on alkaloid metabolism in plants. **Biochemical Physiology**, Pflanzen, v.169,n.3, p.231-240, 1976.
- RAIJ, B. Van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Agronômica - Ceres, 1991. 343p.
- REDING, V.V.; TAYLOR, H.M. **Principles of soil-plant interrelationships**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1989. 275p.
- ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, Massachusetts, v.184, n.4135, p.430-435, Apr. 1974.
- SCHERMEISTER, L.J.; CRANE, F.A.; VOIGT, R.F. Nitrogenous constituents of *Atropa belladonna* L. grown sources of externally supplied nitrogen. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Washington, v.49, n.11, p.698-705, 1960.

- SCHERMEISTER, L.J.; VOIGHT, R.F.; MAHER, F.T. The influence of varying nitrogen levels on hydroponic growt and alkaloid production in *Hyoscyamus muticus* L. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Washington, v.39, p.669-672, 1950.
- SILVA FILHO, D.F.; NODA, H.; CLEMENT, C.R.; MACHADO, F.M. O efeito da adubação orgânica na produção de biomassa em quebra-pedra em Manaus, Amazonas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v.14, n.1, p. 120, maio 1996.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação espectométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois. 1994. 387p.
- SOUTHON, I.W.; BUCKINGHAM, J. **Dictionary of alkaloids**. New York: Chapman and Hall, 1989. 1161p.
- UNANDER, D.W.;BLUMBERG, B.S. In vitro activity of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) species against the DNA polymerase of hepatitis virus: effects of growing environment and inter- and intra-specific differences. **Economic Botany**, New York, v.45, n.2, p.225-242, 1990.
- VETTORI, L. **Métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico, 7).
- WINTER, H.F.; LOUSTALOT, A.J. The effect of light and nitrogen levels on growth and alkaloid content od young plants of *Cinchona ledgeriana*. **Plant Physiology**, Washington, v.27, n.3, p.575-583, July. 1952.
- ZAROSKI, R.J.; BURAU, R.G. A rapid nitric-perchloric acid digestion method for mult-element tissue analysis. **Communication Soil Science Plant Analysis**. New York, v.8, n.5, p. 425-436, 1977.

CAPÍTULO IV

INDUÇÃO DE CALOS E PROPAGAÇÃO IN VITRO DE QUEBRA-PEDRA (*Phyllanthus niruri* L.)

RESUMO

Objetivando definir uma metodologia para indução e manutenção de calos e multiplicação in vitro de *Phyllanthus niruri* L. realizou-se três experimentos. Para indução de calos, inicialmente estudou-se os efeitos das concentrações de três auxinas e uma citocinina respectivamente: 2,4-D (1,13; 2,26; e 4,52 μM); ANA (1,34; 2,68; e 5,37 μM); AIB (1,23; 2,46; e 4,92 μM) e TDZ (0,045; 0,45; e 4,54 μM) adicionados ao meio de cultura MS. Após inoculação do explante (segmentos internodais com 8 mm de tamanho) os frascos foram levados para dois ambientes (25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de luz ou escuro). Realizada a avaliação aos 33 dias, foram retiradas amostras de cada tratamento, dos calos mantidos na luz, e realizada sua manutenção, nas duas melhores concentrações de auxinas AIB (2,46 μM) e ANA (2,68 μM). No segundo experimento explante iguais aos do experimento anterior, da mesma espécie foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura MS suplementado com ANA (1,34; 2,68; 5,37 μM) em

combinação com AIB (1,23; 2,46; e 4,92 μ M), e mantidos na luz. O último experimento realizado com a finalidade de induzir brotações múltiplas de segmentos nodais envolveu as seguintes concentrações e reguladores: BAP (0,56; 1,11; 2,22; e 4,44 μ M) e TDZ (0,57; 1,14; 2,27; e 4,54 μ M). Os melhores resultados obtidos no primeiro experimento de indução de calos ocorreu na luz, em meios suplementados com ANA (1,34 μ M) e AIB (4,92 e 2,46 μ M). Com relação à manutenção ocorreram diferenças significativas entre os calos induzidos nos diferentes reguladores de crescimento. Assim os melhores tratamentos foram aqueles onde os calos induzidos com TDZ, especialmente na concentração 4,54 μ M, foram mantidos em meio acrescido tanto de ANA como AIB. No segundo experimento de indução de calos o melhor resultado obtido foi na concentração 4,92 μ M de AIB em combinação com 0,0 μ M de ANA; confirmando-se o melhor resultado obtido no primeiro experimento. Esta interação entre AIB e ANA mostrou, em geral, efeitos sinérgicos na indução de calos. Enquanto no terceiro experimento a concentração de sais do meio de cultura MS foi considerada inadequada, entretanto o maior número de brotações ocorreram na concentração 0,57 μ M de TDZ em média com 5,0 brotos por explante e taxa de multiplicação igual a 20; na forma de roseta com brotações alongadas.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Dentre as vantagens de se manter as plantas matrizes em casa de vegetação esta a possibilidade de homogeneizar os explantes quanto ao estágio de desenvolvimento. Além disso com o controle do fotoperíodo, intensidade luminosa e temperatura, pode-se estimular o

surgimento de novas brotações, independentemente da época do ano (Grattapaglia e Machado, 1990).

Segundo Pierik (1987) a chance de contaminação dos explantes é muito maior quando o material é proveniente do campo.

Deschamps (1993) cita ainda que os melhores explantes são aqueles obtidos de plantas matrizes em crescimento ativo e não submetidos à estresses.

Espécies herbáceas são mais fáceis de clonar *in vitro* do que espécies lenhosas (Pierik, 1987), sendo que a micropropagação *in vitro* de espécies herbáceas pode ser realizada através da multiplicação de gemas axilares; ou indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; ou ainda pela embriogênese somática (Grattapaglia e Machado, 1990).

Grattapaglia e Machado (1990) citam que diversas formulações de meios têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. A composição básica desses meios constitui-se de: água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mio-inositol, ágar e reguladores de crescimento, sendo que a adição desses últimos depende da espécie cultivada. O meio MS de Murashige e Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White (1934), citado por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990), com extratos de folhas de fumo. O meio MS bem como suas modificações e diluições, juntamente com o B5 (Gamborg et al., 1968; citados por Caldas, Haridasan e Ferreira 1990) têm apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies.

Aos meios de cultura geralmente são adicionados reguladores de crescimento com o objetivo de suprir as possíveis deficiências dos explantes em relação aos hormônios endógenos, sendo as auxinas e citocininas as classes mais utilizadas. A formação da raiz, parte aérea e calo em

cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação entre estas classes de reguladores de crescimento (Skoog e Miller, 1975) citado por Caldas, Haridasan e Ferreira (1990).

Das citocininas comerciais utilizadas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais usada, porém existem ainda a cinetina, zeatina e do tidiazuron (TDZ).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1990) o cultivo de ápices caulinares de várias espécies herbáceas, tem sido bem sucedido em meios de cultivo suplementados com 0,05 a 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

O TDZ foi descoberto pela Schering AG em 1976, para ser utilizado no desfolhamento da cultura de algodão (Lu, 1993; Mok et al., 1987; Fellman, Read e Hosier, 1987), porém tem mostrado efeitos semelhantes aos das citocininas quando aplicadas em concentrações muito reduzidas, em torno de 0,0022 à 0,088 mg/L (Lu, 1993). Este composto pertence ao grupo das feniluréias (Mok et al., 1987) e não apresenta o anel purina comum às citocininas tipo adenina, tais como, a benzilaminopurina, cinetina ou zeatina (Lu, 1993), porém semelhantemente às citocininas, promove o crescimento de calos e induz organogênese (Mok et al., 1987). A atividade citocinínica do TDZ foi detectada em calos de *Phaseolus lunatus* L. cv. Kingston, o qual mostrou-se mais ativo do que a zeatina (Mok e Mok, 1985). Souza (1995) afirma que a concentração de 0,19 mg/L de TDZ foi a mais adequada para a multiplicação “in vitro” de segmentos nodais de repolho.

O mecanismo pelo qual o TDZ induz respostas semelhantes aos das citocininas não é completamente entendido. Uma hipótese é que o TDZ promove a conversão das citocininas ribonucleotídeas em ribonucleosídeas, as quais são biologicamente mais ativas (Lu, 1993). Para Mok et al. (1987) as várias citocininas do grupo das feniluréias, inclusive o TDZ, devem possuir a

capacidade de modificar o metabolismo natural de ocorrência das citocininas, proporcionando autonomia dos tecidos vegetais em relação à sua produção. Os resultados obtidos com calos de soja por Thomas e Katterman (1986) sob dois níveis de TDZ dá suporte à esta última hipótese de que o tidiazuron induz a biossíntese de citocinina endógena.

As auxinas são também empregadas no meio de cultura visando multiplicação juntamente com as citocininas com o objetivo de estimular o desenvolvimento da parte aérea e/ou anular o efeito inibitório das citocininas (Deschamps, 1993). Das várias auxinas (AIA, AIB, ANA, 2,4-D, entre outras), o AIA é considerado instável podendo ser degradado pela luz ou microorganismos. De acordo com Grattapaglia e Machado (1990) o AIA tem sido benéfico no isolamento de segmentos nodais de eucalipto e meristemas florais de couve-flor, e o ANA é mais empregado em baixas concentrações.

O 2,4-D freqüentemente induz a formação de calo, podendo ainda ser importante na embriogênese somática, enquanto o AIB é comumente a melhor auxina na indução do enraizamento *in vitro*.

Os resultados obtidos por Moreno, Amaral e Viana (1992) com a indução de calo em segmentos de caules das espécies *Phyllanthus tenellus*, *P. niruri* e *P. corcovadensis* (quebra-pedra), no escuro; asseguram que a concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foi efetiva para as três espécies.

Alves (1992) utilizando auxinas e citocininas obteve 15 brotos por meristema de *Cecropia glaziovii* suplementando o meio MS com 10 mg.L^{-1} de BAP e 2 mg.L^{-1} de ANA, e formação de calos com a utilização de 10 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Moreno, Matos e Viana (1996) conseguiram brotações múltiplas em segmentos nodais e apicais de *Phyllanthus carolinensis* (quebra-pedra) inoculados em meio MS acrescido de 0,25 mg.L⁻¹ de BAP.

Silva, Moreno e Viana (1996a) testaram 2,4-D e AIB nas concentrações 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹, e combinações de BAP com 2,4-D e AIB em segmentos de caules de *P. urinaria* (quebra-pedra). Entre as auxinas testadas, o AIB sem o suplemento de BAP promoveu o melhor crescimento dos calos em todas as concentrações.

4.2. OBJETIVO

Objetivou-se verificar os efeitos de várias concentrações de diferentes auxinas na manutenção e indução de calos de segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L., e ainda obter uma metodologia de indução de brotações múltiplas pelo uso de diferentes concentrações de citocininas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Experimento.1: Efeito de diferentes reguladores de crescimento e do ambiente na indução e manutenção de calos de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

A espécie utilizada neste experimento foi o quebra-pedra *Phyllanthus niruri* L., que foi identificado e uma amostra foi colocada sob o n.º ID 84/96 no Laboratório de Botânica-Herbário IAN-EMBRAPA-CPATU-Belém-PA.

Sementes deste quebra-pedra envoltas em gaze foram desinfestadas em solução contendo 0,4% de hipoclorito de sódio, proveniente de solução comercial, e duas gotas de detergente comercial por 10 minutos, sendo 5 minutos sob agitação. Após serem lavadas três vezes em água esterilizada em câmara de fluxo laminar, foram colocadas em placas de Petri com papel de filtro umedecidos e mantidas em sala de crescimento, sob temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Decorridos 7 dias, as plântulas foram inoculadas, assepticamente, em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 2% de sacarose e 0,6% de ágar, os quais permaneceram por 30 dias em sala de crescimento, sob o mesmo fotoperíodo e temperatura.

Decorrido este período, segmentos internodais com 8 mm de comprimento foram excisados destas plântulas crescidas em condições assépticas, com auxílio de pinça e bisturi. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS, com 2% de sacarose e 0,6% de ágar suplementados com 2,4-D (1,13; 2,26; e 4,52 μM), ANA (1,34; 2,68; e 5,37 μM), AIB (1,23; 2,46; e 4,92 μM) e TDZ (0,045; 0,45; e 4,54 μM). O

pH dos meios foi ajustados para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem à $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Cada tubo foi vedado com tampa plástica e seus bordos protegidos com filme plástico.

Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 4 semanas em um fotoperíodo de 16 horas de luz sob $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância de lâmpadas fluorescentes brancas frias.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC) em esquema fatorial $3 \times 4 \times 2$, sendo, 4 reguladores de crescimento em 3 concentrações, dois ambientes de incubação (luz e escuro) e dez repetições por tratamento.

Aos 33 dias procedeu-se a avaliação do peso da matéria seca dos calos. Anteriormente a esta análise entretanto, foram retiradas amostras de cada tratamento até então incubados na luz para repicagem nos dois melhores meios de cultura (AIB e ANA, nas duas concentrações intermediárias testadas) visando sua manutenção.

Decorridos 30 dias após este procedimento os calos foram novamente repicados para o meio MS mantendo-se as mesmas concentrações de reguladores de crescimento escolhidos na primeira repicagem. Finalmente após 30 dias foi avaliado o peso seco dos calos.

4.3.1 Experimento.2: Efeito da interação de AIB e ANA na indução de calos de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

Com os resultados obtidos após avaliação do uso de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos de *Phyllanthus niruri* L., foi proposto este trabalho.

Segmentos internodais com 8 mm de comprimento foram excisados com auxílio de pinça e bisturi das mesmas plântulas crescidas em condições assépticas em sala de crescimento. Os explantes foram imediatamente inoculados em frascos contendo 30 ml de meio de cultura MS, com 2% de sacarose e 0,6% de ágar suplementado com ANA (1,34; 2,68; e 5,37 μM), em combinação com AIB (1,23; 2,46; e 4,92 μM). O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da sua autoclavagem à $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Cada frasco foi vedado com tampa plástica e seus bordos protegidos com filme plástico.

Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em um fotoperíodo de 16 horas de luz sob $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância de lâmpadas fluorescentes brancas frias, durante um período de 30 dias.

No experimento foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento constituído de cinco parcelas, com seis frascos cada parcela sendo que cada frasco continha um explante. O esquema fatorial foi 4×4 (quatro concentrações e quatro reguladores de crescimento).

Aos 30 dias avaliou-se o peso da matéria seca dos calos, e os tratamentos foram comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2 Experimento.3: Indução de brotações em segmentos nodais de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

Como fonte de explantes foram utilizadas plantas de *Phyllanthus niruri* L. crescidas em condições assépticas, em sala de crescimento. Segmentos nodais com 8 mm de comprimento foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e inoculados no meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com 2% de sacarose e solidificado com 0,6% de ágar, suplementado com BAP (0,56; 1,11; 2,22; e 4,44 μM) e TDZ (0,57; 1,14; 2,27; e 4,54 μM). O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes de serem autoclavados à $121 \pm 1^\circ\text{C}$, por 15 minutos.

Os explantes foram incubados em sala de crescimento a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ em um fotoperíodo de 16 horas de luz sob $25\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância de lâmpadas fluorescentes branca fria. Foram utilizados 15 tubos de ensaio com um explante por tubo, os quais constituíram as repetições de cada tratamento. As características avaliadas após 35 dias da inoculação foram: número de brotações, peso da matéria seca das brotações, porcentagem de calos formados na base dos explantes, e peso da matéria seca dos calos.

O delineamento estatístico usado foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Experimento.1: Efeito de diferentes reguladores de crescimento e do ambiente na indução e manutenção de calos de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

A indução dos calos foi influenciado pelos diferentes reguladores de crescimento e pela condição de cultivo, ou seja, luz ou escuro. Como mostra a Figura 15, os reguladores de crescimento ANA e AIB foram mais efetivos na indução, e a condição de cultivo na luz foi significativamente mais eficiente do que a condição de escuro.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva, Moreno e Viana (1996a) trabalhando com segmentos internodais de *Phyllanthus urinária*, no qual houve formação de calos em todas as concentrações de auxinas testadas, mas quando mantidos no escuro.

Na Figura 16 são mostrados os valores médios e a equação de regressão para peso da matéria seca dos calos induzidos à partir de segmentos internodais de *P. niruri* L. A coloração dos calos de *Phyllanthus niruri* L. mantidos na luz foram predominantemente verde claro, enquanto os que permaneceram no escuro foram amarelo claro. Houve indução de brotações e raízes nos tratamentos com ANA e AIB, principalmente na luz, enquanto que em calos de *Artemisia absinthium* L. obtidos em trabalhos realizados por Nin et al. (1996) o estímulo ao desenvolvimento de raízes e ocasionalmente parte aérea, ocorreu com a suplementação de 2,4-D, na concentração de 0,90 μM .

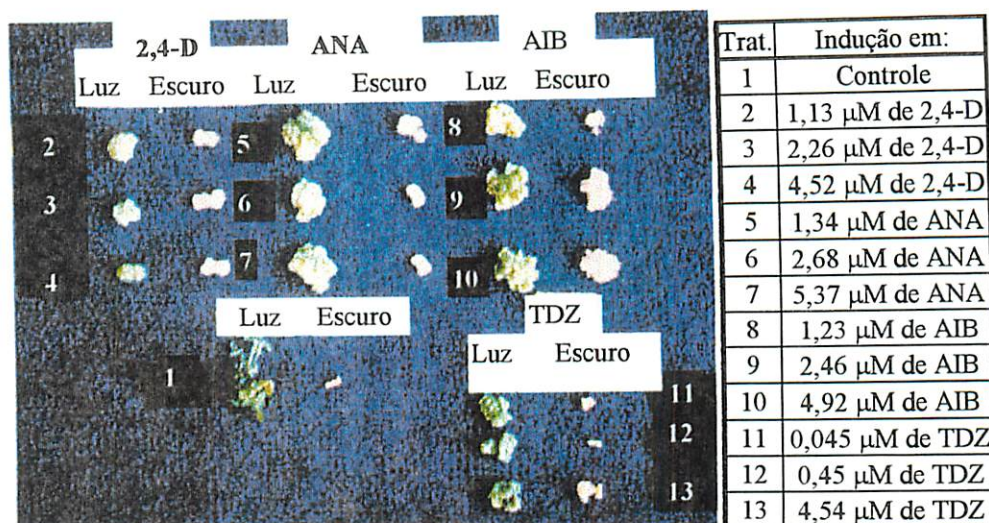


FIGURA - 15 Efeito de reguladores de crescimento na indução de calos em segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L. submetidos a dois ambientes de incubação e de várias concentrações de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva, Moreno e Viana (1996) trabalhando com segmentos internodais de *Phyllanthus urinária*, no qual houve formação de calos em todas as concentrações de auxinas testadas, mas quando mantidos no escuro.

O regulador de crescimento 2,4-D foi o de menor efetividade na indução de calos, onde obteve-se resultados iguais ou inferiores aos encontrados no controle, tanto na condição de luz ou escuro (Figura 16). Enquanto Cardoso e Oliveira (1996) trabalhando com *Hypericum brasiliense* Choisy obtiveram calos menores, mas friáveis na concentração 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Quando estes calos foram mantidos em meio de cultura MS suplementado com 2,68 μM de ANA ou 2,46 μM de AIB, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações 1,13 e 2,26 μM de 2,4-D em meio contendo AIB (Figura 17). Enquanto que a concentração 4,52 μM de 2,4-D apresentou melhor resultado quando mantido em meio contendo ANA, contudo este resultado foi inferior às outras duas concentrações de 2,4-D testadas.

O ácido naftalenoacético (ANA) foi considerado um dos melhores reguladores de crescimento testados, apresentando resultados inferiores somente aos obtidos com AIB (Figura 16). A concentração 1,34 μM de ANA, sob a condição tanto de luz como de escuro foi o segundo melhor resultado entre todos os reguladores testados. Cardoso e Oliveira (1996) trabalhando com *Hypericum brasiliense* Choisy, obteve melhores resultados da indução de calos nas concentrações 10 e 5 mg.L^{-1} de ANA. Já Abreu et al. (1997) induzindo calos em *Cissus sicyoides* L. obteve resultados significativos na concentração 21,6 μM de ANA, na condição de escuro. Quando estes calos foram mantidos em meio de cultura MS suplementado com 2,68 μM de ANA ou 2,46 μM de AIB, as três concentrações testadas apresentaram resultados semelhantes, tanto quando mantidos com ANA como AIB (Figura 17).

A condição de cultivo tanto na luz como no escuro proporcionaram maior ganho de matéria seca dos calos nas concentrações 2,46 e 4,92 μM de AIB entre todos reguladores e concentrações testadas (Figura 16). Trabalhando com segmentos internodais de *P. urinaria* Silva, Moreno e Viana (1996a) também obtiveram melhor indução de calos com AIB em todas as concentrações testadas. Entretanto, sob condição de manutenção os calos de *P. niruri* L. apresentaram melhores resultados em meio também suplementado com AIB, estes quando

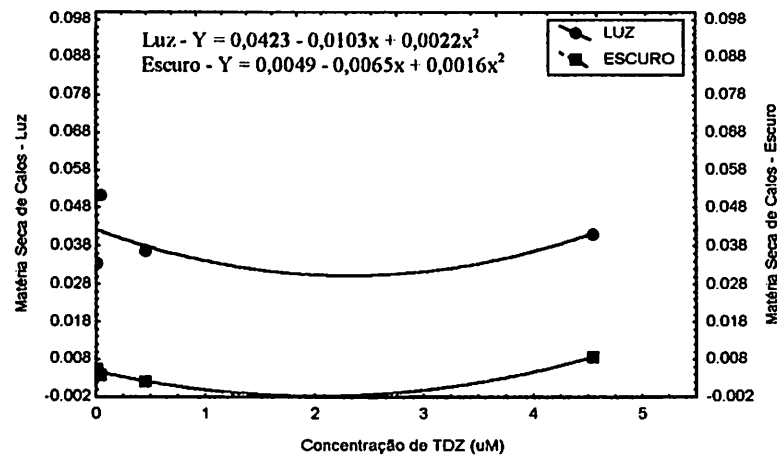
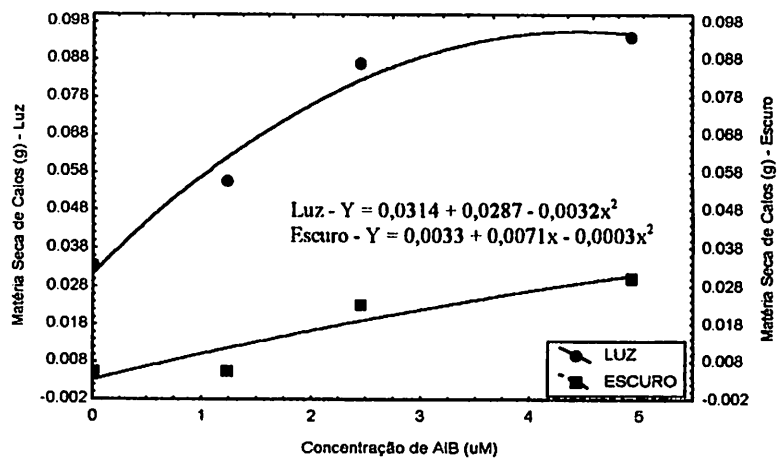
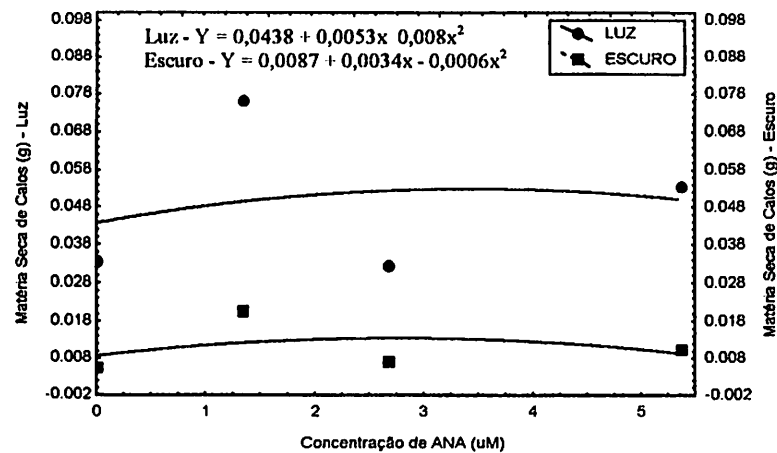
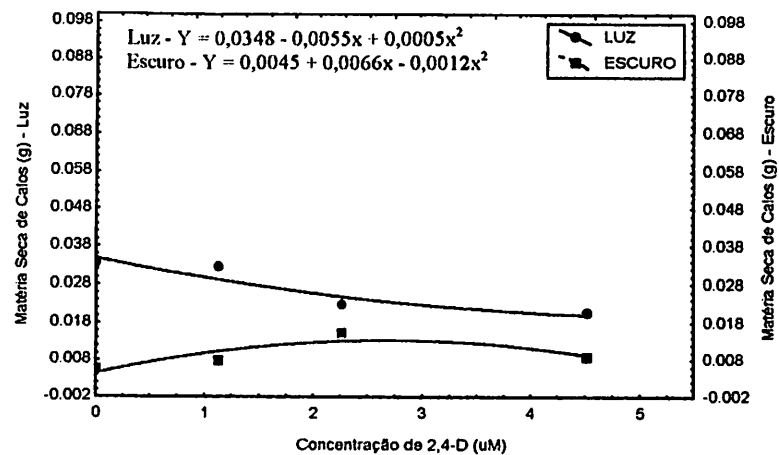


FIGURA.16 - Valores médios e equação de regressão para peso da matéria seca dos calos de segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L. submetidos a dois ambientes de incubação de várias concentrações de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras - MG, 1997.

induzidos nas concentrações 1,23 e 2,46 μM de AIB (Figura 17). Todavia, quando estes calos foram mantidos em meio com ANA, obteve-se os piores resultados.

O regulador de crescimento TDZ foi considerado um dos de menor eficiência em relação a todas as concentrações testadas na indução dos calos de segmentos internodais desta espécie (Figura 16). Resultados semelhantes foram obtidos por Miachir (1992), trabalhando com *Curcuma zedoaria* Roscoe, no qual o regulador de crescimento 2,4-D não apresentou efeito na indução de calos independentemente de luz, tipo de explante, e concentração, sendo seu melhor resultado obtido com 4,52 μM . Entretanto Lameira (1997) trabalhando com erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.) obteve 100% de indução dos calos nas concentrações 2,04 e 6,13 μM de TDZ.

Os melhores resultados dos calos de *Phyllanthus niruri* L. sob manutenção em meio suplementado com ANA ou AIB foram os induzidos com TDZ, na concentração 4,54 μM (Figura 17). Estes resultados confirmam a teoria da autonomia dos tecidos vegetais proporcionado pelo TDZ, ou seja, o tidiazuron induz a biossíntese de citocinina endógena (Mok et al., 1987). Às mesmas conclusões chegaram Thomas e Katterman (1986), estudando calos de soja sob dois níveis de TDZ e de ANA em segmentos de raízes cultivadas no escuro.

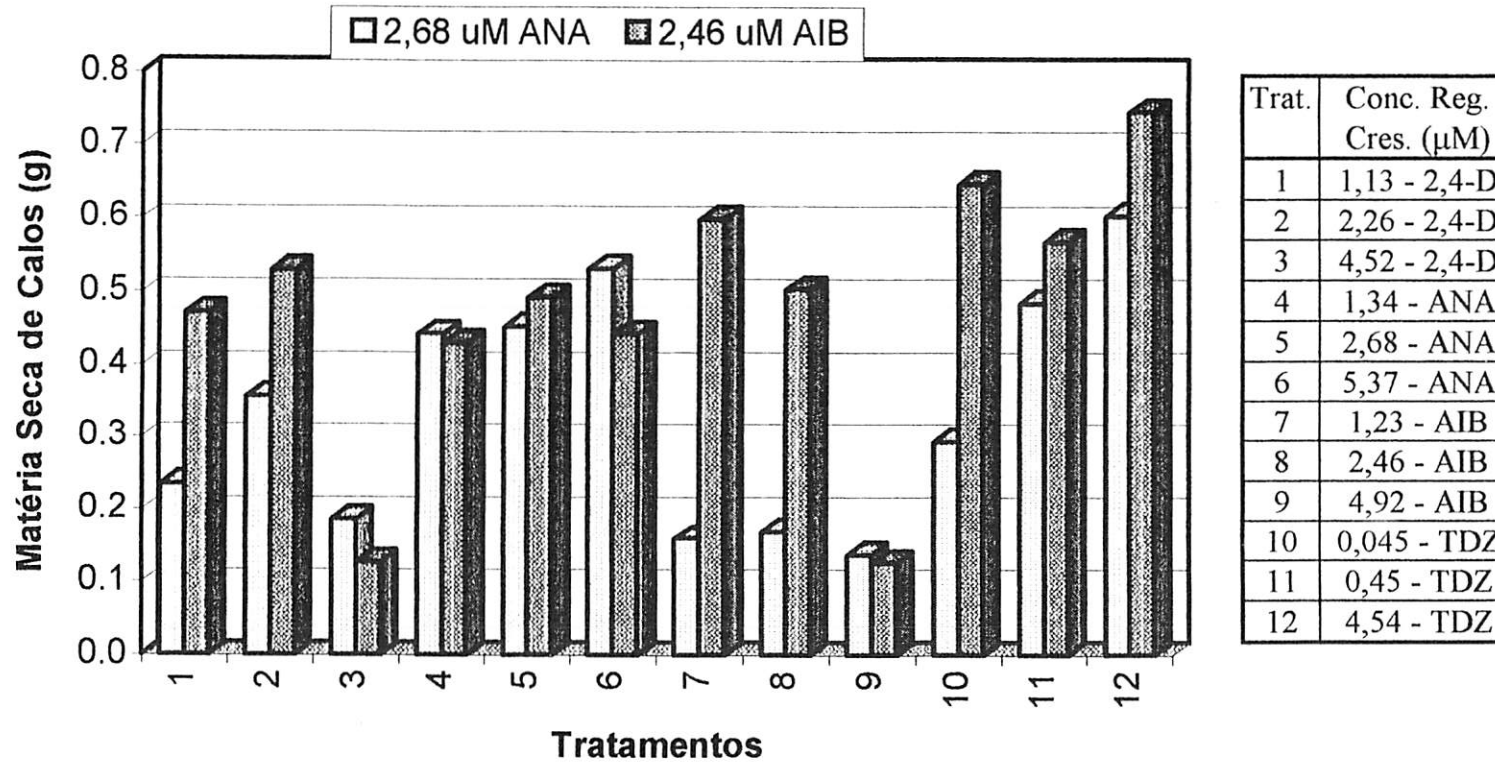


FIGURA.17 - Valores médios para peso da matéria seca dos calos obtidos a partir de segmentos internodais de *P. niruri* L. induzidos em diferentes concentrações sob manutenção em meio de cultura suplementado com 2,68 µM de ANA e 2,46 µM de AIB, os quais não foram analisados estatisticamente devido a falta de repetibilidade. UFLA, Lavras - MG, 1997.

4.4.1 Experimento.2: Efeito da interação de AIB e ANA na indução de calos de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

Os valores médios do peso da matéria seca dos calos obtidos a partir de segmentos internodais de *P. niruri* L. submetidos a 16 combinações de AIB e ANA são mostrados na Figura.18. Os calos tiveram em média coloração verde clara e houve formação de raízes nos tratamentos onde o meio de cultura foi suplementado somente com ANA. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso e Oliveira (1996), na indução de calos em explantes de *Hypericum brasiliense* Choisy. Por outro lado Nin et al. (1996) encontraram resultados diferentes na indução de calos de *Artemisia absinthium* L.; Paniego e Giulietti (1994) em *A. annua* e Benjamin, Sipahimalani e Heble (1991) em *A. pallens*, nos quais o regulador de crescimento 2,4-D foi o responsável pela indução de raízes nos calos, sendo que quando utilizado na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ produziu calos friáveis.

Os tratamentos onde houve somente suplementação com ANA foram menos efetivos na indução dos calos, como mostra a Figura 18 em relação a matéria seca. Os melhores resultados estatísticos ocorreram nos tratamentos 13 (4,92 µM de AIB e 0,0 µM de ANA), 7 (1,23 µM de AIB e 2,68 µM de ANA) e 14 (4,92 µM de AIB e 1,34 µM de ANA), respectivamente, em relação a matéria seca. Como era de se esperar o melhor tratamento do experimento anterior (trat. 10 - 4,92 µM de AIB; Figura16) coincidiu com o melhor tratamento deste experimento (trat. 13 - 4,92 µM de AIB e 0,0 µM de ANA; Figura 18). Silva, Moreno e Viana (1996a) obtiveram resultados semelhantes ao testar 2,4-D e AIB nas concentrações 0,25; 0,50 e 1,0 mg.L⁻¹ e combinações de BAP com 2,4-D e AIB em segmentos de caules de *P. urinaria* (quebra-pedra);

Trat.	AIB (μM)	ANA (μM)
1	0,0	0,0
2	0,0	1,34
3	0,0	2,68
4	0,0	5,37
5	1,23	0,0
6	1,23	1,34
7	1,23	2,68
8	1,23	5,37
9	2,46	0,0
10	2,46	1,34
11	2,46	2,68
12	2,46	5,37
13	4,92	0,0
14	4,92	1,34
15	4,92	2,68
16	4,92	5,37

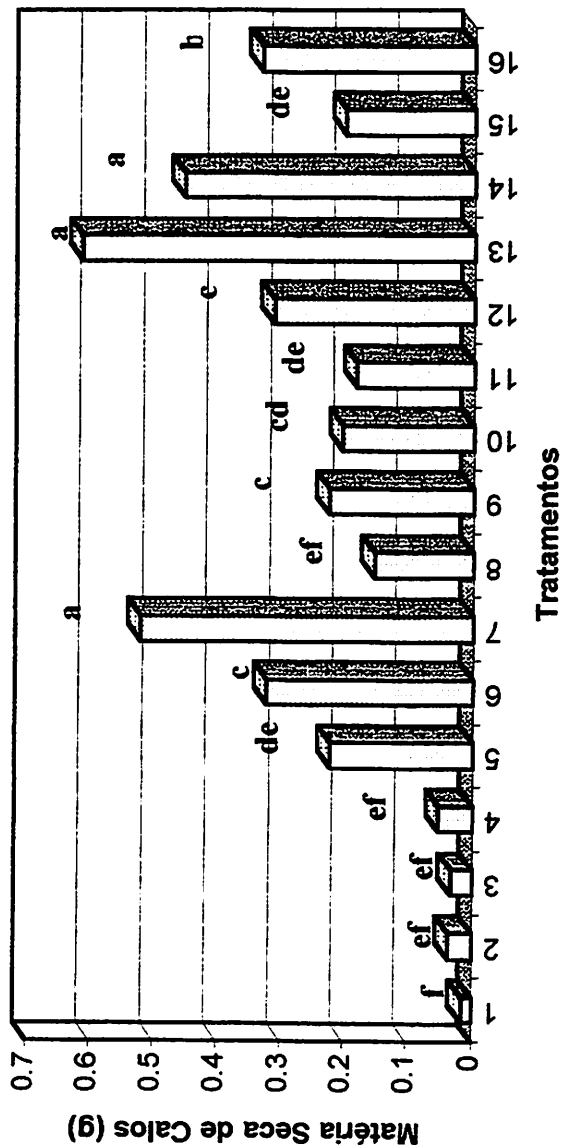


FIGURA.18 - Valores médios para peso da matéria seca dos calos obtidos a partir de segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L. induzidos em meio de cultura suplementado com a combinação entre quatro diferentes concentrações de ANA e AIB. UFLA, Lavras - MG, 1997.

no entanto, entre as auxinas testadas o AIB sem o suplemento de BAP promoveu o melhor crescimento dos calos em todas as concentrações.

Apesar do melhor resultado, nos dois experimentos, terem ocorrido nos tratamentos onde o meio foi suplementado apenas com AIB, a interação entre os reguladores de crescimento ANA e AIB, mostrou-se importante principalmente nos tratamentos 7 e 14.

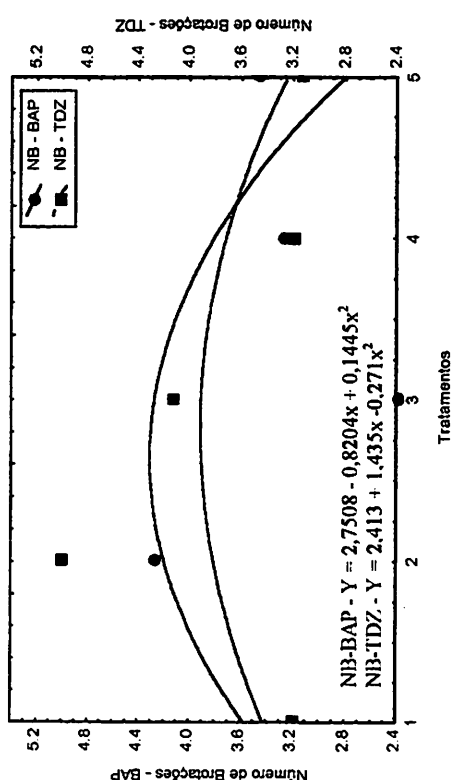
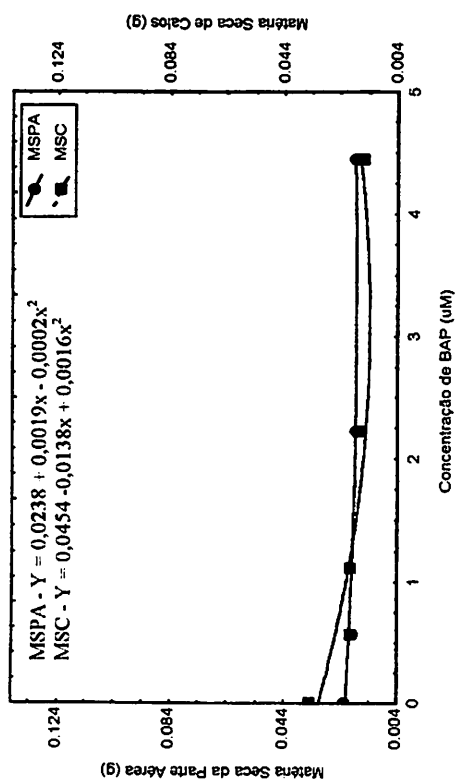
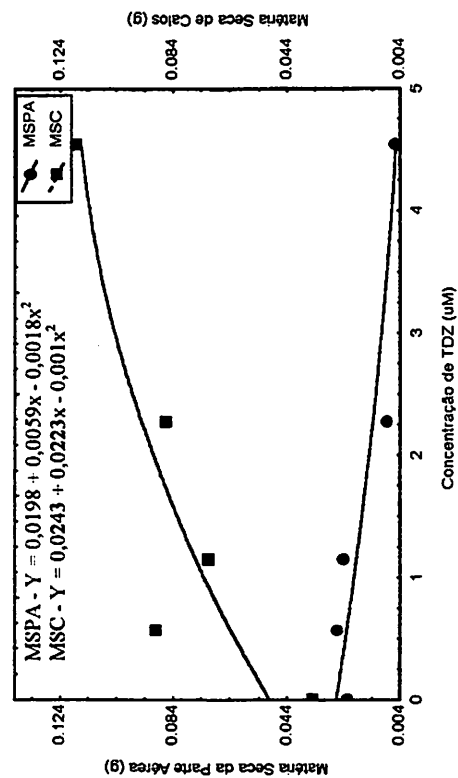
4.4.2 Experimento.3: Indução de brotações de segmentos nodais de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L.)

Os segmentos nodais provenientes de plântulas semeadas in vitro foram inoculados em meio MS suplementado com BAP e TDZ com a finalidade de induzir múltiplas brotações. Interessante que houve em média 100% de formação de calos na base dos explantes, mesmo no meio sem regulador de crescimento (Figura 19). O meio de cultura suplementado com TDZ induziu maiores formações de calos na base dos explantes, ou seja, maiores pesos médios de matéria seca. Isto pode ser atribuído pelo menos em parte, ao balanço hormonal endógeno juntamente com o meio MS, que é bastante rico em sais. Normalmente os explantes não induzem a formação de calos, a não ser com a suplementação de reguladores de crescimento. Silva, Moreno, e Viana (1996b) trabalhando com a mesma espécie encontraram resultados diferentes, indicando o meio MS com a concentração total dos sais, como um dos melhores meios de cultura para indução de brotações de *P. niruri* L. Mao et al. (1995), trabalhando com *Clerodendrum colebrookianum* Walp., encontrou resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho, no qual os meios

suplementados com TDZ após uma semana de incubação promoveram excessiva indução de calos na base dos explantes.

Houve uma queda generalizada de folhas em todos os tratamentos e presença de vitrificação no tratamento suplementado com a maior concentração de TDZ.

Esta espécie apresentou multiplicação na forma de ‘roseta’, ou seja, através de múltiplas brotações, as quais tiveram um bom alongamento. Os melhores resultados em relação ao número de brotações ocorreu na concentração 0,57 μM de TDZ, com a média de 5,0 brotos por explante (Figura 19) e uma taxa de multiplicação igual a 20. Upreti e Dhar (1996) relatam ser mais efetiva a concentração de 1,0 μM de TDZ na proliferação da parte aérea de *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott; com 5,55 brotos por explante. Moreno, Matos, e Viana (1996) estudando a espécie *P. carolinensis*, sugeriu que o meio de cultura MS suplementado com 0,25 mg/L de BAP foi adequado na indução de múltiplas brotações.



Tratamentos	Conc. Reg. Cres. (µM)	Conc. Reg. Cres. (µM)
1	0,0	0,0
2	0,56 BAP	0,57 TDZ
3	1,11 BAP	1,14 TDZ
4	2,22 BAP	2,27 TDZ
5	4,44 BAP	4,54 TDZ

FIGURA.19 - Valores médios para peso da matéria seca da parte aérea, dos calos, número de brotações e equação de regressão, obtidos a partir de segmentos nodais de *Phyllanthus niruri* L submetidos a quatro concentrações de BAP e TDZ. UFLA, Lavras - MG, 1997.

4.5 CONCLUSÕES

Visualizando os resultados dos três experimentos pode-se concluir que:

- a) A luz foi mais eficiente na indução de calos.
- b) Os reguladores de crescimento ANA (1,34 μM) e AIB (4,92 e 2,46 μM) foram os mais efetivos na indução de calos.
- c) Dos calos induzidos em meio acrescido de diferentes reguladores de crescimento, aqueles onde utilizou-se o TDZ, em especial na concentração de 4,54 μM , foram os que deram melhores resultados quando repicados para meio suplementado com ANA e AIB.
- d) A interação entre AIB e ANA mostrou, em geral, efeitos sinérgicos na indução de calos. Neste experimento confirmou-se os resultados obtidos do primeiro experimento de indução de calos em meio suplementado com três concentrações de quatro reguladores de crescimento e ambientes de cultivo, sendo o AIB (4,92 μM de AIB - 1° exp., e 4,92 μM de AIB e 0,0 μM de ANA - 2° exp.) o melhor regulador de crescimento.
- e) O maior número de brotações ocorreu na concentração 0,57 μM de TDZ em média com 5,0 brotos por explante e taxa de multiplicação igual a 20; na forma de roseta com brotações alongadas. Porém a concentração dos sais do meio de cultura MS foi considerada inadequada à indução de múltiplas brotações devido a formação excessiva de calos na base dos explantes.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; LADEIRA, A.M.; LAMEIRA, O. Diferentes tipos de explante e reguladores de crescimento na indução de calos em *Cissus sicyoides* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6. Belém, 1997. **Anais...** Belém: CPATU, 1997. p.559.
- ALVES, M.N. Cultura de tecidos de *Cecropia glaziovii* visando obter plantas com boas características agronômicas. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992. Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1992. p.220.
- BENJAMIN, B.D.; SIPAHIMALANI, A.T.; HEBLE, M.R. Tissue cultures of *Artemisia pallens*: organogenesis, terpenoid production. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Netherlands, v.21, p.159-164, 1991.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.(eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-69.
- CARDOSO, M.A.; OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.44, n.2 p.91-94, Feb. 1996.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa “in vivo” e “in vitro” de sarandi (*Sebastiania schottiana* Muell. Arg.), espécie florestal de mata ciliar**. Lavras: ESAL, 1993. 128 p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **HortScience**, Alexandria, v.22, n.6, p.1197-1200, Dec. 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.(eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-170.

1. The purpose of this document is to provide a comprehensive overview of the current status of the project and to identify the key challenges that must be addressed in order to ensure its successful completion.

2. The project has been initiated in accordance with the strategic objectives of the organization and is being managed in a structured and disciplined manner. The following table provides a summary of the project's progress to date.

3. The project team has identified several key areas of concern that require immediate attention. These include the need to improve communication, enhance resource allocation, and ensure that all stakeholders are fully informed of the project's status.

4. In order to address these challenges, the project team has developed a series of action plans that will be implemented over the next few weeks. These plans focus on improving communication, enhancing resource allocation, and ensuring that all stakeholders are fully informed of the project's status.

5. The project team is confident that these action plans will be effective in addressing the key challenges and ensuring the successful completion of the project. However, it is important to continue to monitor the project's progress and to be prepared to make adjustments as needed.

6. The project team is committed to providing regular updates to all stakeholders and to ensuring that the project remains on track. We will continue to work hard to overcome any challenges and to ensure that the project is completed on time and within budget.

7. The project team is grateful for the support and assistance of all stakeholders and looks forward to continuing to work together to achieve the project's objectives. We will continue to provide regular updates and to ensure that all stakeholders are fully informed of the project's status.

8. The project team is confident that the project will be completed successfully and that it will contribute significantly to the organization's strategic objectives. We will continue to work hard to ensure that the project is completed on time and within budget.

- LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). Lavras: UFLA, 1997. 88p. (Tese-Doutorado em Fitotecnia).
- LU, C-Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Development Biology*, Columbia, v.92, n.2, p.92-96, 1993.
- MAO, A.A.; WETTEN, A.; FAY, M.; CALIGARI, P.D.S. *In vitro* propagation of *Clerodendrum colebrookianum* Walp., a potential natural anti-hypertension medicinal plant. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.14, n.8, p.493-496, May 1995.
- MIACHIR, J.I. Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe. ESALQ: Piracicaba, 1992, 126p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas).
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [¹⁴C]- thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.65, n.4, p.427-432, Dec. 1985.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hort Science*, Alexandria, v.22, n.6, p.1194-1197, Dec. 1987.
- MORENO, F.N.; AMARAL, L.V.; VIANA, A.M. Indução de calos "in vitro" em diferentes espécies de *Phyllanthus*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992. Curitiba. *Anais...* Curitiba: UFPR, 1992. p.220.
- MORENO, F.N.; MATOS, J.Z.; VIANA, A.M. Cultura *in vitro* de *Phyllanthus caroliniensis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1996. Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: UFSC, 1996. p.228.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NIN, S.; MOROSI, E.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. Callus culture of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.45, n.1, p.67-72, Apr. 1996.

1. The first part of the document discusses the general principles of the law of contract, which are derived from the common law and have been codified in the Contract Act, 1872.

2. The second part of the document deals with the formation of a contract, which is a process involving offer, acceptance, and consideration.

3. The third part of the document discusses the performance of a contract, which is the fulfillment of the obligations created by the contract.

4. The fourth part of the document deals with the discharge of a contract, which is the termination of the contract by the parties or by the law.

5. The fifth part of the document discusses the remedies available for breach of contract, which are damages, specific performance, and injunction.

6. The sixth part of the document deals with the assignment of a contract, which is the transfer of the rights and obligations of a contract to another party.

7. The seventh part of the document discusses the novation of a contract, which is the substitution of a new contract for an existing one.

8. The eighth part of the document deals with the rescission of a contract, which is the cancellation of a contract by the parties.

9. The ninth part of the document discusses the frustration of a contract, which is the termination of a contract due to an unforeseen event.

10. The tenth part of the document deals with the assignment of a contract, which is the transfer of the rights and obligations of a contract to another party.

11. The eleventh part of the document discusses the novation of a contract, which is the substitution of a new contract for an existing one.

12. The twelfth part of the document deals with the rescission of a contract, which is the cancellation of a contract by the parties.

13. The thirteenth part of the document discusses the frustration of a contract, which is the termination of a contract due to an unforeseen event.

- PANIEGO, N.B.; GIULIETTI, A.M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, n.36, p. 163-168, 1994.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- SILVA, M.L.B.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. Indução e crescimento de calos em *Phyllanthus urinaria*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1996. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.228a.
- SILVA, M.L.B.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. Micropropagação de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1996. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 1996. p.228b.
- SOUZA, C. M. **Enraizamento de microestacas in vivo e propagação in vitro de repolho (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.)** Lavras: UFLA, 1995. 76 p. (Dissertação-Mestrado em Fitotecnia).
- THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Washington, v.81, n.2, p.681-683, june 1986.
- UPRETI, J.; DHAR, U. Micropropagation of *Bauhinia vahlii* Wight & Arnott - a leguminous liana. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n.3/4, p.250-254, Dec. 1996.

APÊNDICE

... ..

... ..

... ..

... ..

...
...
...
...
...
...

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

...
...
...
...
...
...

... ..

QUADRO 1A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) para altura de plantas, número de ramos, peso da matéria seca da parte aérea, e do sistema radicular submetidos a calagem e fertilização nitrogenada de *Phyllanthus niruri* L. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	Altura	Nº. Ramos	MSPA	MSSR
Calagem	1	3389.730 *	2172.017 *	1135.734 *	6.6830 *
Nitrogênio	4	79.5656 *	21.9417 *	11.2701 *	0.0108
Cal. X Nit.	4	120.1117 *	29.8917 *	29.6891 *	0.1075 *
Resíduo	50	3.0618	0.8967	0.3281	0.0116
C.V. (%)		5.944	12.825	8.642	15.372

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) para conteúdo de macronutrientes na matéria seca da parte aérea das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a calagem e fertilização nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	N	P	K	S	Ca	Mg
Calagem	1	5049.881*	199.0120*	1972.067*	88.9781*	3860.041*	198.669*
Nitrogênio	4	309.5809*	3.1115*	45.3841*	1.1016*	63.0920*	2.2130*
Cal. X Nit.	4	312.1422*	5.5441*	95.0193*	2.9603*	110.2661*	3.8088*
Resíduo	50	2.5863	0.1758	1.1243	0.5544	1.3206	0.1071
C.V. (%)		11.344	17.142	9.545	13.731	10.318	15.058

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

DAILY WORKING SHEET

Sl. No.	Name of the Worker	Date: _____												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	...													
2	...													
3	...													
4	...													
5	...													
6	...													
7	...													
8	...													
9	...													
10	...													
11	...													
12	...													
13	...													
14	...													
15	...													
16	...													
17	...													
18	...													
19	...													
20	...													
21	...													
22	...													
23	...													
24	...													
25	...													
26	...													
27	...													
28	...													
29	...													
30	...													
31	...													
32	...													
33	...													
34	...													
35	...													
36	...													
37	...													
38	...													
39	...													
40	...													
41	...													
42	...													
43	...													
44	...													
45	...													
46	...													
47	...													
48	...													
49	...													
50	...													
51	...													
52	...													
53	...													
54	...													
55	...													
56	...													
57	...													
58	...													
59	...													
60	...													
61	...													
62	...													
63	...													
64	...													
65	...													
66	...													
67	...													
68	...													
69	...													
70	...													
71	...													
72	...													
73	...													
74	...													
75	...													
76	...													
77	...													
78	...													
79	...													
80	...													
81	...													
82	...													
83	...													
84	...													
85	...													
86	...													
87	...													
88	...													
89	...													
90	...													
91	...													
92	...													
93	...													
94	...													
95	...													
96	...													
97	...													
98	...													
99	...													
100	...													

Signature of the Supervisor: _____ Date: _____
 Signature of the Worker: _____
 (Official Stamp)

QUADRO 2A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) para teor de nutrientes na matéria seca da parte aérea das plantas de *Phyllanthus niruri* L. submetidas a calagem e fertilização nitrogenada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	N	P	K	Ca	MG	S	Fe	Mn	Zn	Cu	B
Calagem	1	1.1454*	0.1918*	12.3289*	1.7340*	0.6650*	0.0429*	125273.7*	9261989.0*	317360.1*	71.1989*	953.2435*
Nitrogênio	4	3.4421*	0.0032*	0.5054*	0.1007*	0.0016*	0.0048*	46451.18*	58614.4*	7238.339*	14.9657*	101.8820*
Cal. X Nit.	4	0.2494*	0.0112*	0.2657*	0.0120	0.0036*	0.0061*	23322.43*	78148.48*	4405.410*	7.2386*	79.7720*
Resíduo	50	0.0274	0.0013	0.0132	0.0053	0.0006	0.0005	800.8969	1121.980	122.1475	0.4763	11.2417
C.V. (%)		7.590	11.162	5.824	4.688	9.488	9.482	9.818	6.595	9.842	7.668	7.428

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

(1) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis nula es el siguiente:
 (2) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis alternativa es el siguiente:
 (3) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la igualdad es el siguiente:
 (4) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la desigualdad es el siguiente:

Prueba de hipótesis	Resultado de la prueba	Valor p	Valor crítico	Conclusión
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ > 100	Rechazar H ₀	0.0012	1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ < 100	Rechazar H ₀	0.0012	-1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ ≠ 100	Rechazar H ₀	0.0024	±1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ > 100	No rechazar H ₀	0.0012	1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ < 100	No rechazar H ₀	0.0012	-1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ ≠ 100	No rechazar H ₀	0.0024	±1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).

(*) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la igualdad es el siguiente:

(1) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis nula es el siguiente:
 (2) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis alternativa es el siguiente:
 (3) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la igualdad es el siguiente:
 (4) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la desigualdad es el siguiente:

Prueba de hipótesis	Resultado de la prueba	Valor p	Valor crítico	Conclusión
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ > 100	Rechazar H ₀	0.0012	1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ < 100	Rechazar H ₀	0.0012	-1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ ≠ 100	Rechazar H ₀	0.0024	±1.645	El valor p es menor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ > 100	No rechazar H ₀	0.0012	1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ < 100	No rechazar H ₀	0.0012	-1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).
H ₀ : μ = 100 vs H _a : μ ≠ 100	No rechazar H ₀	0.0024	±1.645	El valor p es mayor que el nivel de significancia (α = 0.05).

(*) - El resultado de la prueba de hipótesis de la hipótesis de la igualdad es el siguiente:

QUADRO 4A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) para número de raiz > 5 mm, peso da matéria seca do sistema radicular (MSSR), número de brotações > 5 mm, e peso da matéria seca das brotações (MSB) das microestacas de *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg., submetidas ao enraizamento "in vivo". UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	G L	Número de Raíz	Peso da MSSR	Número de Brotações	Peso da MSB
Época de Av.	1	4.1344*	0.0283*	2.0795*	0.0913*
Conc. AIB	5	0.7969*	0.0086*	0.2855*	0.0172*
Ép. Av. x Conc. AIB	5	1.0719*	0.0016	0.2159*	0.0089*
Resíduo	48	0.1875	0.1713	0.02712	0.3400
C.V. (%)		28.16	40.35	49.08	32.82

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 5A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) peso da matéria fresca dos calos (PMFC) e peso da matéria seca dos calos (PMSC) dos segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L., submetidos a dois ambientes, e quatro reguladores de crescimento e três níveis cada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	(PMFC)	(PMSC)
Reg. De Cresc.	12	1,13339*	0,00477*
Ambiente	1	21,88549*	0,08891*
Reg. X Ambiente	12	0,43015*	0,00173*
Resíduo	234	0,00467	0,00003
C.V. (%)		14,38	18,92

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte de Recursos	Valor (R\$)	Valor (R\$)	Valor (R\$)
1	100000	100000	100000
2	200000	200000	200000
3	300000	300000	300000
4	400000	400000	400000
5	500000	500000	500000
6	600000	600000	600000
7	700000	700000	700000
8	800000	800000	800000
9	900000	900000	900000
10	1000000	1000000	1000000

Valor total em reais de R\$ 10.000.000,00

Fonte de Recursos	Valor (R\$)	Valor (R\$)	Valor (R\$)
1	100000	100000	100000
2	200000	200000	200000
3	300000	300000	300000
4	400000	400000	400000
5	500000	500000	500000
6	600000	600000	600000
7	700000	700000	700000
8	800000	800000	800000
9	900000	900000	900000
10	1000000	1000000	1000000

Valor total em reais de R\$ 10.000.000,00

QUADRO 6A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) peso da matéria fresca dos calos (PMFC) e peso da matéria seca dos calos (PMSC) dos segmentos internodais de *Phyllanthus niruri* L., submetidos dois reguladores de crescimento e quatro níveis cada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	(PMFC)	(PMSC)
AIB	3	7,60936*	0,04023*
ANA	3	0,62771*	0,01640
AIB x ANA	9	0,86874*	0,01030*
Resíduo	64	0,03315	0,00714
C.V. (%)		15,06	34,46

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 7A Resumo da análise de variância (Quadrado Médio) do número de brotações, peso da matéria seca das brotações (PMFB) e peso da matéria seca dos calos (PMSC) dos segmentos nodais de *Phyllanthus niruri* L., submetidos dois reguladores de crescimento e quatro níveis cada. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Fontes de Variação	GL	N. Brotações	(PMSB)	(PMSC)
Reg. De Cresc.	8	8,9685*	0,0007*	0,0228*
Resíduo	126	1,3291	0,00002	0,00008
C.V. (%)		32,36	22,00	16,42

(*) - Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

