

# Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura

*Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) medicinal plant multiplication in culture medium

DOI 10.17648/2446-4775.2019.671

**Carneiro, Maurízia Fátima<sup>1</sup>; Duarte, Edson Ferreira<sup>2</sup>; Vargas, Laureano Magno<sup>1</sup>; Sibov, Sérgio Tadeu<sup>2</sup>; Conceição, Edemilson Cardoso da<sup>3</sup>; Nogueira, João Carlos Mohn<sup>4</sup>.**

<sup>1</sup>Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária/ Estação Experimental Nativas do Cerrado, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal. Rua R2, 1328, Chácara Califórnia, CEP: 74690-815, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Samambaia, Av. Esperança s/n. CEP: 74690-900, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Av. Universitária com 5ª Avenida s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Estadual de Goiás, Campus Palmeiras, Rua S-7, S/Nº, Setor Sul, CEP: 76190-000. Palmeiras de Goiás, GO.

\*Correspondência: [maurizia@emater.go.gov.br](mailto:maurizia@emater.go.gov.br)

## Resumo

Diante da importância da mama-cadela no tratamento do vitiligo, este estudo teve como objetivo aprimorar técnicas de micropropagação para a produção *in vitro* a partir de sementes e segmentos nodais. Plant Preservative Mixture (PPM) e Hipoclorito de Sódio, em diferentes concentrações, foram usados para desinfestação de segmentos nodais e sementes. As sementes com tegumento, sem tegumento e eixo epicótilo-radícula foram testadas em meio 1/2 Murashige e Skoog (MS) para determinar a germinação. Para a multiplicação e enraizamento foram usados segmentos nodais axênicos jovens e/ou lignificados, em meio 1/2 MS contendo diferentes concentrações de citocininas e auxinas. Constatou-se que o PPM a 4,0 e 5,0 mL.L<sup>-1</sup> proporcionou os menores graus de contaminação, enquanto o hipoclorito não se mostrou efetivo. As sementes sem tegumento apresentaram 100% de germinação. Plântulas jovens cultivadas em meio 1/2 MS com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP produziram maior número de brotos, mas estes não apresentaram um crescimento adequado. O melhor crescimento de brotos e raízes foi obtido quando se usaram segmentos nodais lignificados em meio 1/2 MS com BAP, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIA. O maior potencial de multiplicação ocorreu para sementes sem tegumento e com segmentos nodais lignificados.

**Palavras-chave:** Mama-cadela. Fitoterápico. Biotecnologia. Cultura de tecidos. Fitoreguladores.

## Abstract

Due mama-cadela importance to treatments against vitiligo, in this study the aim was to improve micropropagation techniques to *in vitro* propagation with seeds and nodal segments. Plant Preservative Mixtures (PPM) and Sodium hypochlorite in different concentrations were used to disinfection of nodal segments and seeds. Seeds with and without tegument and epicotyl-radicle axis were tested in 1/2 Murashige & Skoog (MS) medium to determine the germination. For multiplication and rooting, youths and lignified axenic nodal segments was used in 1/2 MS medium with different cytokinins and auxins concentrations. The PPM at 4.0 and 5.0 mL.L<sup>-1</sup> proportioned lower contaminations levels, but the hypochlorite was not effective. The seeds without tegument showed 100% of germination. Young plants cultivated in 1/2 MS with BAP 1.0 mg.L<sup>-1</sup> showed higher numbers of shoots, but it did not grow properly, however the better grow of shoots and roots was obtained when was used nodal segments lignified in 1/2 MS with BAP and AIA at 1.0 mg.L<sup>-1</sup> and 2.0 mg.L<sup>-1</sup>. The higher potential of multiplication occur to seeds without tegument and with nodal lignified segments.

**Keywords:** Mama-cadela. Phytotherapeutic. Biotechnology. Tissue culture. Phyto regulators.

---

## Introdução

*Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) é encontrada nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, conhecida vulgarmente como mama-cadela, mamica-de-cadela, conduru e inharé<sup>[1]</sup> entre outros nomes populares. Estudos fitoquímicos realizados<sup>[2]</sup> indicam a presença de psoralenos e bergaptenos, pertencentes a classe das furanocumarinas, em todas as partes do vegetal, com predominância no córtex da raiz. Essas substâncias são usadas para o tratamento do Vitiligo e outras enfermidades, através de aplicação tópica e ingestão do medicamento<sup>[3-9]</sup>.

A demanda por estes fármacos é considerada grande, e a sua obtenção se dá pela retirada de parte ou até mesmo pela coleta da planta inteira pelas populações locais e também por laboratórios farmacêuticos. Esta prática extrativista vem, ao longo do tempo, diminuindo o número de plantas de mama-cadela na natureza<sup>[6-10]</sup>. Outro fator é a sua inserção no cerrado, que está em constante mudança pela expansão da fronteira agrícola e por queimadas naturais, podendo levá-la à extinção nesse domínio fitogeográfico, assim como nos outros em que a espécie ocorre. Estudos sobre a conservação e propagação desta espécie ajudam a minimizar a perda da biodiversidade e a sua manutenção na natureza<sup>[8]</sup>.

Os métodos usuais para obtenção de mudas de espécies nativas são por sementes, estaquia, borbulhia e micropropagação. A micropropagação é uma ferramenta bastante significativa para acelerar a multiplicação e produção de número considerável de novos indivíduos, bem como para propagar espécies de difícil multiplicação obtendo mudas selecionadas, sadias, livre de fungos, vírus, bactérias e com alta qualidade genética<sup>[11-13]</sup>. A dificuldade desta técnica está na taxa de multiplicação *in vitro* não apresentar resultados satisfatórios, principalmente quando as sementes são recalcitrantes, apresentarem baixa longevidade e alto índice de contaminação endógena<sup>[5,14]</sup>.

Existem vários protocolos que foram estudados para diversas espécies vegetais, porém o sucesso do procedimento não depende só do protocolo, mas sim de alguns fatores importantes, como o tamanho de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz,

explante no momento da coleta e a época da coleta<sup>[15,16,13]</sup>. Neste sentido, estudos de germinação de sementes e propagação por brotações *in vitro*, se tornam tão importantes<sup>[14]</sup>.

Embora existam meios de cultura específicos para espécies arbóreas, o mais usual na multiplicação *in vitro* da mama-cadela é o MS (Murashige e Skoog)<sup>[16]</sup>, que contém substâncias essenciais para o crescimento e o desenvolvimento dos explantes, que aliado ao balanço entre a citocinina BAP (6-Benzilaminopurina) e as auxinas ANA (ácido naftalenoacético), AIB (Ácido indolil-3-butírico) e AIA (ácido indol-3-acético), promove uma maior taxa de multiplicação e enraizamento<sup>[17]</sup>. No entanto, as pesquisas já realizadas, para multiplicação *in vitro* de mama-cadela não conseguiram estabelecer um protocolo eficiente, principalmente por suas sementes e propágulos apresentarem um alto índice de contaminantes e o desenvolvimento das plântulas muito lento. Estes dois fatores têm impedido a obtenção de uma boa taxa de multiplicação e dificultado o processo de enraizamento das plântulas em laboratório<sup>[18,19,9]</sup>. Considera-se que as sementes de *B. gaudichaudii* são recalcitrantes, perdendo a sua viabilidade após secagem<sup>[9]</sup>. O objetivo deste trabalho foi contribuir para estabelecimento de um protocolo para a germinação, multiplicação e enraizamento de mama-cadela utilizando diferentes meios de cultura com concentrações variáveis de citocinina e de auxina.

## Material e métodos

Para a condução dos estudos sobre micropropagação de mama-cadela foram usados segmentos nodais de brotações jovens e sementes. As brotações foram obtidas de plantas de mama-cadela da área arborizada da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, no município de Goiânia, Goiás, no mês de outubro de 2017. As sementes foram obtidas de frutos coletados no município de Mairipotaba, localizado na Mesorregião Sul Goiano do estado de Goiás, situado na latitude S17°12'13", longitude W49°33'53,8" e altitude de 657 m. Os frutos foram colhidos no mês de setembro de 2016. Para a multiplicação e enraizamento *in vitro*, foram usados segmentos nodais axicênicos de plântulas de laboratório em diferentes estágios de lignificação.

O trabalho de micropropagação foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Emater, localizado na Estação Experimental Nativas do Cerrado, em Goiânia, Goiás.

Utilizaram-se os meios de cultura MS - Murashige e Skoog e WPM - Wood Plant Medium em diferentes concentrações, de acordo com os objetivos desejados. O meio MS foi suplementado com 6,5 g de ágar, 30 g de sacarose e o pH aferido para 5,7-5,8. No meio WPM, somente a sacarose foi alterada para 20 g. Os meios após serem distribuídos em recipientes de vidro de 250 mL e, ou tubos de ensaios de 16 cm x 2,5 cm foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. Após o estabelecimento das sementes e/ou segmentos nodais, em câmara de fluxo laminar, os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , à temperatura de 25  $\pm$  1 °C e fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro).

## Experimentos de desinfestação química

Os segmentos nodais contendo gemas foliares, coletados no campo, passaram por processos de desinfestação química, conforme recomendação do fabricante do PPM - Plant Preservative Mixture<sup>®[20]</sup> em relação a coleta e descanso em laboratório e, em seguida, foram estabelecidos em meio de cultura 1/2 MS contendo diferentes concentrações do PPM<sup>®</sup>. Os segmentos uniformizados para 2,0 cm foram estabelecidos em tubos de ensaio com 20 mL do meio 1/2 MS e em diferentes concentrações de PPM (1,0;

2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL.L<sup>-1</sup>). Os seguimentos nodais foram inoculados de forma a estarem totalmente imersos no meio de cultura, sendo avaliados quanto ao desenvolvimento de contaminantes, por um período de 30 dias, com relação a: cor do segmento, cor da gema e ocorrência de brotações.

Sementes obtidas de frutos colhidos no ponto de maturação máxima, ou seja, com coloração alaranjada, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e imersas em álcool 70% durante 1 minuto. Após a limpeza, estas foram usadas para teste de desinfestação, em concentrações diversas de hipoclorito (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 % de cloro ativo) e tempo de imersão de 10, 20 e 60 minutos e de 12 e 24 horas. Após aplicação dos tratamentos e em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada e, em seguida, retirado o seu tegumento e então, inoculadas em frascos de vidro de 250 mL, com 40 mL do meio 1/2 MS, sem uso de fitoregulador. A avaliação da germinação foi feita aos seis dias, o número de sementes contaminadas por um período de 20 dias e o desenvolvimento das plântulas aos 60 dias conferindo o tamanho do broto, número de folhas e número de gemas.

### Experimentos de germinação *in vitro*

Para estudos utilizando sementes, selecionou-se uma árvore que fosse representativa da espécie, e a coleta dos frutos foi realizada em uma sequência de três semanas consecutivas, sendo a primeira no dia 17 de setembro de 2016. Na primeira coleta, os frutos se apresentavam na cor verde com pequenos pontos alaranjados (de vez); na segunda coleta os frutos apresentavam cor amarelo–alaranjado (início de amadurecimento) e na terceira coleta os frutos apresentavam de cor alaranjada intensa (ponto máximo de maturação). Para os estudos de germinação e multiplicação foram usadas sementes de frutos da primeira coleta, no ponto de vez.

No laboratório, as sementes extraídas dos frutos, no ponto de vez, foram lavadas em água corrente por 10 minutos e em câmara de fluxo laminar, desinfestadas quimicamente com álcool etílico a 70% por 1 minuto, imersas por 30 minutos em solução de hipoclorito com 2,0% de cloro ativo e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

Em outro experimento, frascos de vidro contendo 40 mL do meio 1/2 MS receberam sementes de mamacadela com o tegumento, sem o tegumento e somente o ápice germinativo, para avaliar as variáveis germinação (%), tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVG)<sup>[21]</sup>, por um período de 30 dias. Aos 60 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao número e tamanho dos brotos, número de gemas e tamanho da raiz, quando se retiraram os segmentos nodais para multiplicação. Em seguida, a planta base, contendo uma gema foliar, foi transplantada para o mesmo meio e mantidas por mais 60 dias, para rebrota, quando se avaliou o número de brotos, número de gemas e o tamanho do maior broto.

Para a germinação e crescimento *in vitro* da mamacadela, sementes com tegumento foram desinfestadas quimicamente e estabelecidas em frascos de vidro com 40 mL de meios MS na concentração normal (MS); metade da concentração salina (1/2 MS) e um terço da concentração salina (1/3 MS), e do meio WPM em concentração normal (WPM) e metade da concentração salina (1/2 WPM). A germinação da semente foi considerada quando se observou o crescimento do eixo epicótilo-radícula, com observações aos 20, 30 e 40 dias. Aos 140 dias aferiu-se o crescimento das plântulas através do número de brotos, número de gemas foliares e o tamanho do maior broto.

Avaliou-se também, a germinação de mama-cadela em diferentes índices de pH. As sementes sem tegumento provenientes da segunda coleta e que apresentavam cor amarelo-alaranjado, ou seja, no início do amadurecimento, foram desinfestadas quimicamente e inoculadas em recipientes de vidro contendo 40 mL de meio 1/2 MS com o pH ajustado para 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,0. Em cada tratamento utilizaram-se sementes com e sem o tegumento e a germinação (em %) foi considerada quando houve a formação de hipocótilo com radícula, observadas por um período de 30 dias.

### **Experimentos de multiplicação com reguladores de crescimento e origem dos explantes**

Na multiplicação e crescimento de mama-cadela foram utilizados segmentos nodais de 2,0 cm, contendo uma gema foliar. Os explantes foram retirados de plântulas de *B. gaudichaudii* axênicas com 60 dias no laboratório, onde foi feito um corte em bisel na sua base e, em seguida, estabelecidos em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio 1/2 MS acrescido de ANA 0,3 mg.L<sup>-1</sup> e BAP (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>). As avaliações do número de brotos gerados foram feitas aos 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 dias.

Os estudos de crescimento e enraizamento de mama-cadela deram-se com segmentos nodais de brotações mantidas em laboratório por 240 dias, que passaram por duas podas apicais que apresentavam lignificação. As brotações foram divididas em: parte basal, mediana e ápice caulinar contendo uma gema lateral. A parte basal foi caracterizada por apresentar as folhas totalmente expandidas; a parte mediana as folhas estando em processo de crescimento e o ápice caulinar (1º entrenó) com as folhas em início de desenvolvimento. Estes explantes foram estabelecidos em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio 1/2 MS acrescido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA). Após 45 dias avaliou-se o número de brotos, tamanho do maior broto, número de folhas, número de gemas, número de raiz e tamanho da maior raiz.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental, para todos os experimentos, foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada vidro e, ou tubo de ensaio, com um explante, uma repetição. Todos os dados obtidos para os diferentes ensaios foram submetidos à análise não paramétrica, com as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis em nível de 5% de significância<sup>[22]</sup>.

## **Resultados**

### **Desinfestação química**

O uso de PPM, em diferentes concentrações, para impedir o desenvolvimento de contaminantes no processo inicial do estabelecimento de segmentos nodais, colhidos no campo, não foi eficiente, com 100% de contaminação na concentração de 1,0 mL.L<sup>-1</sup> e, nas concentrações mais elevadas, o índice ficou em 30%. Ao final de 30 dias nenhum explante apresentou brotação e apresentavam cor preta indicando morte, provavelmente pela ação fitotóxica do produto sobre os segmentos nodais e as gemas da mama-cadela (TABELA 1).

**TABELA 1:** Efeito do *Plant Preservative Mixture*® (PPM) em diferentes concentrações, na porcentagem de descontaminação, brotação e aspecto dos segmentos nodais e gemas de (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae), aos 30 dias.

Tratamento	Contaminantes (%)	Brotação (%)	Segmentos de cor preta (%)	Gema de cor preta (%)
1/2 MS	100	0	0	0
1/2 MS + PPM 1,0 mL/L <sup>-1</sup>	100	0	0	0
1/2 MS + PPM 2,0mL/L <sup>-1</sup>	60	0	40	40
1/2 MS + PPM 3,0mL/L <sup>-1</sup>	70	0	30	30
1/2 MS + PPM 4,0mL/L <sup>-1</sup>	30	0	70	70
1/2 MS + PPM 5,0mL/L <sup>-1</sup>	30	0	70	70

A ação do hipoclorito de sódio como agente descontaminante de sementes de mama-cadela apresentou diferença significativa entre as várias concentrações de cloro ativo. A contaminação das sementes iniciou com 2 dias após o estabelecimento *in vitro* e com 20 dias a grande maioria apresentou 100% de contaminação (**TABELA 2**) e, portanto, não apresentaram crescimento de plântulas. As sementes que germinaram e não contaminaram somente os tratamentos, com 1,0% de cloro ativo com 20 minutos e 12 horas de imersão e 2% de cloro ativo e 1 hora de imersão, tiveram crescimento das plântulas, mas de forma não satisfatória, indicando o alto grau de contaminantes das sementes retiradas de frutos quando colhidos no ponto máximo de maturação.

**TABELA 2:** Germinação (Ger), Contaminação (%) e desempenho médio de plântulas de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc. - Moraceae) de frutos colhidos no ponto máximo de maturação, quando submetidas ao tratamento com Hipoclorito de sódio em diferentes concentrações de cloro ativo (Cl) e tempo de imersão das sementes.

Tratamento	Germinação (%)	Contaminação (%)				Desenvolvimento		
	6 dias	2 dias	10 dias	20 dias	TB <sup>□</sup> (cm)	NF	NG	
1,0% Cl por 10 min	40,0 d	30,0 f	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
1,0% Cl por 20 min	10,0 f	40,0 e	80,0 c	80,0 c	0,6 c	0,8 a	0,6 b	
1,0% Cl por 01 hora	10,0 f	50,0 d	90,0 bc	90,0 bc	0,0 d	0,0d	0,0 c	
1,0% Cl por 12 horas	50,0 c	60,0 c	80,0 c	80,0 c	1,9 b	0,3c	0,5 b	
1,0% Cl por 24 horas	0,0 g	60,0 c	60,0 e	100,0 a	0,0 d	0,0d	0,0 c	
2,0% Cl por 10 min	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 20 min	20,0 e	40,0 e	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 01 hora	50,0 c	0,0 h	40,0 f	40,0 e	4,9 a	0,7b	1,5 a	
2,0% Cl por 12 horas	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
2,0% Cl por 24 horas	10,0 f	60,0 c	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 10 min	0,0 g	90,0 b	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 20 min	0,0 g	60,0 c	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 01 hora	10,0 f	90,0 b	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 12 horas	10,0 f	30,0 f	90,0 b	90,0 b	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
3,0% Cl por 24 horas	10,0 f	40,0 e	90,0 b	90,0 b	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 10 min	60,0 b	100,0 a	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 20 min	0,0 g	30,0 f	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 01 hora	10,0 f	50,0 d	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 12 horas	100,0 a	20,0 g	70,0 d	70,0 d	0,0 d	0,0 d	0,0 c	
4,0% Cl por 24 horas	50,0 c	0,0 h	100,0 a	100,0 a	0,0 d	0,0 d	0,0 c	

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

\*TB=Tamanho do Broto; NF=Número de Folhas; NG=Número de Gemas.

### Germinação de sementes *in vitro*

No experimento para verificação do efeito do tegumento na germinação da semente e no crescimento *in vitro* da mama-cadela foi possível observar o efeito positivo da remoção do tegumento (**TABELA 3**). As sementes sem o tegumento germinaram 100% até o 5º dia após o estabelecimento, e apresentaram um tempo médio de germinação (TMG) de 5 dias e índice de velocidade de germinação (IVG) igual a 2, ao passo que, as sementes com tegumento iniciaram o processo de germinação no décimo dia, e TMG de 12 dias e IVG de 0,46. Verifica-se, também, que a germinação das sementes com tegumento se deu ao longo do tempo atingindo 70% aos 30 dias, indicando que o tegumento se torna uma barreira, dificultando a uniformidade no processo germinativo.

**TABELA 3:** – Germinação média de sementes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) com tegumento (SCT), sem tegumento (SST) e, somente, o ápice germinativo (AG) e o vigor representado pelo tempo médio de germinação (TMG) e pelo índice de velocidade de germinação (IVG), ao longo do tempo.

Tratamento	Germinação (%)						Vigor	
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	TMG	IVG
SCT	0,0 b	20,0 b	40,0 a	50,0 b	70,0 a	70,0 a	12a	0,46b
SST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	5b	2a
AG	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	5b	2a

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

O crescimento das plântulas (**TABELA 4**), considerando sementes com tegumento e sementes sem tegumento, diferiu estatisticamente entre si em relação ao número de brotos, tamanho do maior broto, número de gemas e número de raízes, destacando os melhores resultados quando usadas sementes sem tegumento. Enquanto os eixos embriários sem os cotilédones, apesar de germinarem tanto quanto aqueles que tiveram apenas a remoção do tegumento, mas apresentaram menor crescimento em razão da redução das reservas presentes nos cotilédones. Também verificou-se que as plantas, após a repicagem e mantidas por mais 60 dias em laboratório, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e novamente as brotações advindas de sementes sem tegumento apresentaram os melhores resultados.

**TABELA 4:** Desempenho das plântulas de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) com tegumento (CT), sem tegumento (ST) e somente o ápice germinativo (AG), ao longo do tempo, em relação ao número de brotos (NB), tamanho do maior broto (TMB), número de gemas (NG) e número de raízes (NR).

Tratamentos	NB	TMB(cm)	NG	NR		NB	NG	TMB(cm)
	60 dias após germinação					Rebrota com 140 dias		
Semente com tegumento	0,7 c	4,4 c	4,6 b	0,6 c		1,0 c	0,9 b	3,3 b
Semente sem tegumento	3,3 a	14,2 a	7,5 a	1,0 b		3,1 a	2,1 a	7,0 a
Ápice germinativo	1,6 b	6,0 b	4,6 b	2,7 a		1,5 b	0,1 c	3,2 c

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

A germinação média das sementes com tegumento apresentou uma variação significativa entre os meios MS e WPM nas várias concentrações, por um período de 40 dias, sendo que a germinação mais efetiva foi para o meio WPM (100%). Apesar de a germinação apresentar-se acima de 70%, em todos os tratamentos, observou-se que a germinação das sementes e o crescimento das plântulas foram lentos, demonstrados pelos valores muito pequenos (<2,0) dos números de brotos e de gemas e pelo crescimento dos brotos (**TABELA 5**).

**TABELA 5:** Número total de brotos de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) ao longo do tempo, em diferentes concentrações de BAP, obtidos a partir de plântulas de 60 dias.

Tratamentos	Número de brotos						
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	60 dias
1/2 MS	0 d	1 d	2 c	4 c	4 d	4 d	7 d
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L	1 c	2 c	5 b	8 b	8 b	8 b	13 b
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 1,0 mg/L	4 a	5 b	8 a	10 a	10 a	10 a	20 a
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 2,0 mg/L	0 d	0 d	1 d	4 c	6 c	6 c	11 c
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 3,0 mg/L	2 b	6 a	8 a	8 b	8 b	8 b	14 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Os resultados em relação ao efeito do pH na germinação e crescimento *in vitro* de mama-cadela, evidenciaram diferenças significativas na germinação para as sementes com tegumento e sem tegumento. A germinação das sementes sem tegumento foi 100% em todos os pH testados, enquanto as sementes com tegumento tiveram os melhores resultados para o pH 4,5 e 5,5 com 90% germinação (**TABELA 6**). Também foi observado que a germinação das sementes com tegumento só iniciou a partir de 20 dias após o estabelecimento. O crescimento e o desenvolvimento das plântulas não ocorreram de forma uniforme, principalmente pela ação do pH e pelo desenvolvimento de microrganismos contaminantes, em todos os tratamentos, não sendo possível obter dados sobre as características dos brotos.

**TABELA 6:** Germinação média acumulada de sementes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae), com tegumento (CT) e sem tegumento (ST), em diferentes pH, ao longo do tempo.

Tratamentos		Germinação (%)					
		5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias
pH 3,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	40,0 c	60,0 c	80,0 c
pH 3,5	ST	0,0 b	100,0 a				
pH 4,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	70,0 b	90,0 b	90,0 b
pH 4,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 5,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	30,0 d	60,0 c	90,0 b
pH 5,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 6,5	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 e	30,0 d	50,0 d
pH 6,5	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
pH 7,0	CT	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 e	0,0 e	50,0 d
pH 7,0	ST	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

### Multiplicação com reguladores de crescimento e origem dos explantes

Os resultados da multiplicação e crescimento de mama-cadela por segmentos nodais podem ser conferidos na **TABELA 7**. Para a variável, quanto ao número de brotos, houve diferença significativa em função da concentração de BAP. Os melhores resultados foram para 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP que atingiu até 20 brotos por segmento nodal, aos 60 dias em laboratório. Também, verifica-se que a taxa mais alta de BAP (3,0 mg.L<sup>-1</sup>) equiparou-se aos resultados do tratamento com ausência deste regulador de crescimento.

**TABELA 7:** Número total de brotos de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) ao longo do tempo, sob diferentes concentrações de BAP, obtidos a partir de plântulas de 60 dias.

Tratamentos	Número de brotos						
	5 dias	10 dias	15 dias	20 dias	25 dias	30 dias	60 dias
1/2 MS	0 d	1 d	2 c	4 c	4 d	4 d	7 d
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L	1 c	2 c	5 b	8 b	8 b	8 b	13 b
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 1,0 mg/L	4 a	5 b	8 a	10 a	10 a	10 a	20 a
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 2,0 mg/L	0 d	0 d	1 d	4 c	6 c	6 c	11 c
1/2 MS + ANA 0,3 mg/L + BAP 3,0 mg/L	2 b	6 a	8 a	8 b	8 b	8 b	14 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para as variáveis, de crescimento e enraizamento, foram observadas diferenças significativas entre a posição de retirada dos segmentos nodais da brotação (**TABELA 8**). O melhor crescimento ocorreu para os explantes retirados da parte basal da brotação, onde se verificou maior número de brotações, mais bem estruturadas e um maior tamanho de raízes. A parte apical da brotação destacou-se em relação ao número de folhas e número de raízes, fato que pode ser justificado por ser esta a parte de crescimento do broto, onde as folhas estão no início de desenvolvimento.

**TABELA 8:** Crescimento e enraizamento médio de explantes de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trécul - Moraceae) aos 45 dias, em relação ao número de brotos (NB), tamanho do maior broto (TMB), número de folhas (NF), número de gemas (NG), número de raízes (NR) e tamanho da maior raiz (TMR) de segmentos nodais retirados da parte basal, mediana e apical da brotação de plântulas de laboratório.

Tratamentos	45 dias					
	NB	TMB (cm)	NF	NG	NR	TMR (cm)
Parte basal da brotação	1,7 a	3,4 a	2,2 b	2,2 a	3,6 a	2,6 a
Parte mediana da brotação	0,9 c	1,6 c	1,8 b	0,6 c	2,1 b	0,8 c
Parte apical da brotação	1,4 b	2,4 b	2,9 a	1,9 b	4,5 a	1,9 b

\* Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal-Wallis.

A idade do explante nodal se mostrou importante para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento da nova plântula. Quando se usaram segmentos nodais de plântulas que estavam lignificadas, mantidas em laboratório por um período mais longo, em torno de 240 dias, foi possível verificar a emissão de brotos, folhas e raízes em menor espaço de tempo e a parte aérea da muda vigorosa. Em relação às raízes, observou-se que são formadas pelas raízes principal e secundária, no entanto, estas eram duras e quebradiças, soltando-se facilmente quando da retirada da muda do meio de cultura. Esta característica das raízes acabou inviabilizando o processo de aclimatização, pois a muda não tinha capacidade de absorção dos nutrientes necessários para o desenvolvimento.

## Discussão

O primeiro aspecto analisado nesse estudo foi a eficácia do PPM sobre a contaminação dos explantes, em que concentrações maiores que 4,0 mL.L<sup>-1</sup> evitaram a contaminação em mais de 70% dos explantes, contudo, os efeitos fitotóxicos do produto ficaram evidentes pela presença de segmentos nodais e gemas enegrecidos e pela ausência de brotação em todos os tratamentos. Estudos com PPM em segmentos de erva-mate

apresentaram sobrevivência<sup>[12]</sup>, no entanto, não foi possível a sua manutenção *in vitro*. Segundo o fabricante, o produto PPM apresenta um pH extremamente ácido (3,8) e que se decompõe em CO e CO<sub>2</sub><sup>[20]</sup>, o que em meio líquido pode acidificar mais pela formação de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Assim, as condições em que os segmentos nodais estavam podem ter se tornado ácidas, o que deve ter gerado efeitos nocivos sobre a capacidade de absorção de água e nutrientes, uma vez que sob pH ácidos as aquaporinas presentes nas membranas plasmáticas das células vegetais tem sua atividade interrompida, bem como a absorção de nutrientes é limitada. O que pode somar à menor disponibilidade de O<sub>2</sub> para a atividade respiratória nos segmentos nodais, pois o CO<sub>2</sub> apresenta maior difusividade em meio aquoso, sendo esses aspectos amplamente conhecidos em vegetais<sup>[23]</sup>. Adicionalmente sabe-se que, de modo geral, a capacidade de tamponamento de meios de cultura é baixa e pode variar ao longo do cultivo, conforme foi demonstrado no cultivo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em que houve acidificação ao longo do tempo<sup>[24]</sup>. A causa da fitotoxidez observada nos segmentos nodais de mama-cadela pode estar relacionada aos aspectos descritos anteriormente, uma vez que os segmentos nodais ficaram totalmente imersos no meio de cultura. Mas, também revelam certa sensibilidade da espécie às variações no pH durante a micropropagação.

As variações no pH também puderam ser observadas na germinação das sementes, sendo verificado que sob pH mais baixos (3,5) ou mais altos (6,5 e 7,0) houve retardo e/ou redução na germinação das sementes com tegumento, o que também pode ser associado à absorção de água e/ou nutrientes na membrana plasmática de raízes geradas a partir de sementes intactas.

Outros aspectos tem sido observados em experimentos de micropropagação de mama-cadela, como a ocorrência de contaminações que inviabilizaram a avaliação do crescimento<sup>[18,5,19]</sup>. Apesar o meio WPM ter proporcionado a maior germinação em mama-cadela, em outro trabalho<sup>[19]</sup> os autores verificaram que o meio 1/2 MS promoveu um melhor desenvolvimento para as mesmas variáveis avaliadas no presente trabalho, o que sinaliza o efeito positivo desse meio no crescimento dos brotos de outras espécies e de mama-cadela.

Quando avaliados os efeitos da presença/ausência do tegumento, além dos efeitos na germinação e as diferenças no crescimento de brotos, as sementes foram estabelecidas sem o tegumento e foram observadas, também, em relação ao seu aspecto e vigor, indicando que para a multiplicação *in vitro* deve-se retirar o tegumento da semente de mama-cadela. Este fato também foi relatado em outro estudo<sup>[19]</sup>, em que a obtenção de melhores resultados foram obtidos quando usadas as sementes sem tegumento para a multiplicação *in vitro* da mama-cadela. As diferenças encontradas no crescimento das plântulas advindas de sementes sem tegumento, e somente com o eixo embrionário, são devidas às limitações oferecidas pelo tegumento e à quantidade de reserva de nutrientes encontrados nos cotilédones da semente. Esta reserva é composta de amido, proteína e lipídeo, que ajuda na manutenção da plântula até a completa formação de suas raízes<sup>[3]</sup>.

O uso de reguladores de crescimento em experimentos com mama-cadela tem demonstrado efeitos distintos. No presente estudo os melhores resultados de multiplicação foram obtidos com 0,3 mg.L<sup>-1</sup> ANA + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e, também, foram obtidos<sup>[11]</sup> resultados melhores em menores concentrações de reguladores de crescimento, indicando uma tendência na diminuição destes, em meio de cultura<sup>[11]</sup>. Apesar de a mama-cadela apresentar uma boa taxa de multiplicação, isto não significa uma boa produção de mudas viáveis em laboratório, pois os explantes multiplicaram, mas não tiveram um crescimento adequado, não alongaram e não enraizaram por um período de 120 dias. Os resultados das pesquisas de multiplicação de mama-cadela em cultura de tecidos são conflitivos e não conclusivos, em relação à possibilidade de produção de mudas viáveis<sup>[18,5,19]</sup>.

Quanto ao fato das brotações basais de mama-cadela apresentarem melhor desempenho que as medianas e apicais no cultivo *in vitro*, isso possivelmente deve-se à maior acumulação de auxinas naturais nessa região dos explantes, uma vez que são produzidas nos ápices e são transportadas basipetalmente. E como elas apresentam efeitos positivos sobre o enraizamento nas regiões proximais<sup>(24)</sup>, a absorção de água, nutrientes e o crescimento global dos segmentos nodais dessa região devem ter sido afetados positivamente.

## Conclusão

O PPM e o hipoclorito em diversas concentrações e tempo de imersão, não se mostraram eficientes por promoverem fitotoxicidade ou possibilitar o desenvolvimento de contaminações. O tegumento afeta o vigor, o grau de multiplicação e de crescimento das brotações em explantes obtidos de sementes de mama-cadela, comprovando que este é um limitador a germinação uniforme *in vitro*.

O pH afeta a geminação *in vitro* de sementes de mama-cadela, sendo recomendado que esteja entre 4,5 e 6,5 para sementes sem tegumento.

O meio 1/2 MS é mais eficiente na multiplicação da mama-cadela, sendo que o meio de cultura 1/2 MS com 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de BAP mostrou-se eficiente para a multiplicação *in vitro*. Os segmentos axênicos e lignificados promovem melhor crescimento das brotações e enraizamento.

Com os resultados obtidos com este estudo, sugere-se que os trabalhos devam continuar, pois a produção de mudas de mama-cadela em cultura de tecidos mostrou-se viável, desde que se façam alguns ajustes na metodologia em relação à concentração dos fitoreguladores para a produção de maior número de raízes e formação de mudas viáveis.

## Referências

1. Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. [\[Link\]](#). Acesso em: 19 Jul. 2018.
2. Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae): da planta ao medicamento. **Rev Cien Farm Bas Apl**. 2005; 26 (3): 159-166. ISSN: 1808-4532. [\[Link\]](#).
3. Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul, **Acta Bot Bras**. 2007; 21 (3): 575-597. ISSN: 1677-941X. [\[CrossRef\]](#)[\[Link\]](#).
4. Jacomassi E, Moscheta IS, Machado SR. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). **Rev Bras Bot**. 2010; 33 (1): 115-129. ISSN: 0100-8404. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
5. Lima MR, Santos PDA, Silveira CES, Palhares D, Pereira LAR. Cultivo *in vitro* de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Rev Bras Plan Med**. 2014; 16 (2): 462-466. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).
6. Silva DB, Bucher JP, Melo DMP, Agostini-Costa TS. *Brosimum gaudichaudii* Mamacadela. In: Vieira RF, Camillo J, Coradin L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**:

**Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste.** MMA, Brasília. 2016 (Capítulo 5 – Medicinais). ISBN: 978-85-7738-309-2. [\[Link\]](#).

7. Viu AFM, Costa EA, Viu MAO, Silva JF, Campos LZO. Avaliação do Efeito de Diferentes Substratos Sobre a Germinação e o Crescimento de Plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela), **Rev Bras Bioc.** 2007; 5 (Supl.2): 960-962. ISSN: 1679-2343. [\[Link\]](#).

8. Faria RAPG, Coelho MFB, Martinez ME, Azevedo RAB. Uso de um modelo matemático no estudo do desenvolvimento de mudas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. **Rev Verde Agro Desenv Sustent.** Mossoró. 2011; 6 (5- Ed. Esp.): 54-60. ISSN: 1981-8203. [\[Link\]](#).

9. Silva DB, Vieira RF, Cordeiro MCT, Pereira EBC, Pereira AV. Propagação vegetativa de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (mama-cadela) por estacas de raízes. **Rev Bras Plan Med.** 2011; 13 (2): 151-156. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

10. Bárbara EPS, Silva AA, Souza MMOR, Gurgel ZER, Marchi MNG, Bellintani MC. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. **Gaia Scientia.** UFPB. 2015; 9 (2): 91-96. ISSN: 1981-1268. [\[Link\]](#).

11. Chaves AC, Schuch MW, Erig AC. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Cienc Agrotec.** 2005; 29 (6): 1281-1287. ISSN: 1981-1829. [\[CrossRef\]](#) [\[Link\]](#).

12. Dutra LF, Hansel FA, Wendling L. **Introdução ao cultivo in vitro de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** 2008. Colombo: Embrapa Florestas - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38 (INFOTECA-E) ISSN: 1983-2605. [\[Link\]](#).

13. Oliveira LS, Dias PCD, Brondani GE. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesq Flor Bras.** Embrapa. 2013; 33 (76): 439-453. ISSN: 1983-2605. [\[Link\]](#).

14. Alencar DRC. Calogênese e regeneração *in vitro* de brotos a partir de raiz, entrenó e disco foliares de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). **Rev Elet Bot.** PUC/SP. 2015; 8(3): 288-298. ISSN: 1983-7682. [\[Link\]](#).

15. Gomes LZ. **Propagação in vitro e caracterização anatômica de gemas adventícias e embriões somáticos de murici (*Byrsonima basiloba* Juss., Malpighiaceae).** Brasília, 95p. Dissertação de Mestrado [Instituto de Ciências Biológicas], Universidade de Brasília, 2008. ISSN: 0102-6992. [\[Link\]](#).

16. Moraes TP, Silva SM, Luz JMQ, Silva AS. Applications of tissue culture in medicinal plants. **Rev Bras Plan Med.** 2012; 14 (1):110-121. ISSN: 1516-0572. [\[CrossRef\]](#).

17. Diniz JDN, Almeida JL, Oliveira AB, Vidal FR. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de Minirosa. **Rev Cien Agron.** Centro de Ciências Agrárias. UFC. 2014; 45(1): 68-73. ISSN: 1806-6690. [\[CrossRef\]](#).

18. Fidelis I, Pinto JBP, Castro EM, Souza AV, Lameira AO, Santiago EA, et al. Cultivo *in vitro* da planta medicinal mama-cadela. **Hortic Bras.** 2000; 18(Supl.):885-886. ISSN. [\[Link\]](#).

19. Souza AV, Pinto JEBP, Fidelis I, Lameira AO, Silva G, Santiago EA. Germinação de embrião de mamacadela “*in vitro*”. **Hortic Bras**. 2000; 18(Supl.):886-887. ISSN: 0102-0536. [Link]
20. PPM™ – **Plant Preservative Mixture**. Plant Cell Technology. [Link]. Acesso em: 20 jul 2018.
21. Santana DG, Ranal MA. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Ed. Universidade de Brasília, Brasília. 2004. 248p. ISBN: 8523007911.
22. Pimentel-Gomes F. **Curso de estatística experimental**. 14ª ed., USP/ESALQ, Piracicaba. 2000. 477p. ISBN: 978-85-7133-055-9.
23. Nicoloso FT, Ferrão GE, Castro GY. pH do meio de cultura e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Cien Rural**. 2008; 38(7): 2059-2062. ISSN: 1678-4596. [CossRef].
24. Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Artmed, Porto Alegre. 2017. 860p. ISBN: 9788582713662.

---

**Histórico do artigo** | Submissão: 17/09/2018 | Aceite: 11/03/2019 | Publicação: 05/04/2019.

**Conflito de interesses:** O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

**Como citar este artigo:** Carneiro MF, Duarte EF, Vargas LM, Sibov ST, Conceição EC, Nogueira JCM. Multiplicação da planta medicinal *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) em meio de cultura. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro. 2019; 13(1): 61-73. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/671>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

**Licença CC BY 4.0:** Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

