

B20-265



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Culminação do Curso

**Efeito de diferentes Concentrações do Ácido α -naftal-
acético e da Kinetina na Indução de Brotos nos Explantes
Caulinares da *Warburgia salutaris* (Bertol.f.) Chiov.**

Autor: Joaquim Felisberto Chivambo



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Culminação do Curso

**Efeito de diferentes Concentrações do Ácido α -naftal-
acético e da Kinetina na Indução de Brotos nos Explantes
Caulinares da *Warburgia salutaris* (Bertol.f.) Chiov.**

Supervisor

Prof. Doutor Orlando Quilambo

Co-supervisores

dr. Alexandre Sitoe

dr^a Célia Martins

dr^a Annae Senkoro

Autor

Joaquim Felisberto Chivambo

Maputo, Novembro 2006

AGRADECIMENTOS

Endereço a mais profunda gratidão:

- Ao meu supervisor Prof. Doutor Orlando Quilambo pelo incansável apoio e paciência na transmissão dos seus conhecimentos.
- A dr^a Célia Martins e a dr^a Annae Senkoro pelo acompanhamento e sugestões prestadas durante a realização deste trabalho.
- Ao dr. Alexandre Siteo pelo apoio prestado durante a realização do ensaio e na análise estatística dos dados.
- A dr^a Carla, a Dona Pureza, ao Sofrimento e ao Carlitos do I.I.A.M. pela transmissão dos seus conhecimentos sobre técnicas de micropropagação.
- A Dona Helena e ao Sr. Siteo do laboratório de Fisiologia Vegetal pelo apoio durante a preparação das soluções.
- Ao dr. Maurício, ao Sr. Domingos e ao Sr. Simião pelo apoio concedido durante a realização do ensaio.
- Aos meus colegas Nédio Mabunda, Paulo Sérgio, Neto Fazenda, Dizimalta dos Santos e Inácio pelo auxílio prestado durante a inoculação dos explantes.
- Ao Sr. Porto pela montagem das lâmpadas na sala de crescimento.
- A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a minha formação.
- Finalmente a todos meus colegas que ingressaram no Departamento de Ciências Biológicas no ano 2002/2003 pela amizade concedida.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra que o presente trabalho é da minha autoria e que os dados nele apresentados reflectem a realidade.

Joaquim Felisberto Chivambo
Joaquim Felisberto Chivambo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Felisberto João Vinte, a minha mãe Lúcia Zacarias Maibaze e aos meus irmãos.

RESUMO

A exploração da *Warburgia salutaris*, planta com alto valor medicinal, de forma indiscriminada tem levado a espécie ao perigo de extinção. O desenvolvimento de uma metodologia de regeneração *in vitro* poderia auxiliar na obtenção de um grande número de mudas e constituir uma alternativa à propagação sexuada. (A propagação sexuada é limitada pelo facto de as sementes perderem rapidamente a capacidade germinativa como resultado da predacção por insectos.)

No presente trabalho, cujo objectivo era avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido α -naftaleno-acético e da kinetina na indução de brotos nos explantes caulinares da *Warburgia salutaris*, foram utilizados como explantes ápices caulinares desta planta, oriundos de planta-matriz localizada na Reserva florestal de Licuati. No laboratório, os explantes foram ^{desinfecção} lavados com água corrente e sob condições assépticas na câmara de fluxo laminar efectuou-se a sua ^{desinfecção} desinfectação com etanol a 70 % e com hipoclorito de sódio a 20 %. A ^{inoculação} inoculação foi efectuada em tubos de ensaio (20 x 100 mm) contendo 10 ml de meio de cultura para plantas lenhosas (WPM), suplementado com sacarose (3 %), agar (1 %) e quatro ^{inoculados e} combinações de fitorreguladores. Os fitorreguladores usados foram o ácido α -naftaleno-acético (ANA) nas concentrações de 0.1 e 1.5 mg/L e a kinetina (KIN) nas concentrações de 1.5 e 3.0 mg/L. No tratamento controle não houve adição de fitohormonas.

A cultura foi mantida numa sala de crescimento a temperatura de 27 °C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz / escuro) e a irradiação de cerca de $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Semanalmente efectuava-se um controle não só para retirar os tubos de ensaio contaminadas por patógenos como também para a contagem dos prováveis brotos e folhas que se formassem em cada tratamento.)

A interrupção precoce do ensaio, consequência do elevado índice de contaminação da cultura por fungos e bactérias não permitiu a avaliação do efeito de kinetina e do ácido α -naftaleno-acético na indução de brotos. Contudo, verificou-se que a adição kinetina e do ácido α -naftaleno-acético nas concentrações testadas, ao meio de cultura reduzia a formação de folhas.

ÍNDICE

1. Introdução	6
2. Objectivos	10
2.1 Objectivo geral	10
2.2 Objectivos específicos	10
3. Hipótese	10
4. Área de estudo	10
5. Material e método	11
5.1 Material e equipamento experimental	11
5.2 Reagentes e soluções	12
5.3 Metodologia	12
5.3.1 Preparação de soluções de fitohormonas	13
5.3.2 Preparação das soluções <i>stock</i>	13
5.3.3 Preparação do meio de cultura	14
5.3.4 Colheita de explantes	15
5.3.5 Esterilização e inoculação de explantes	15
5.3.6 Incubação da cultura	16
5.3.7 Controle	16
6. Resultados	17
7. Discussão	19
8. Conclusões	21
9. Recomendações	22
10. Referências bibliográficas	23
Anexos	27

1. INTRODUÇÃO

A *Warburgia salutaris* é uma planta arbustiva ou árvore de pequeno a médio porte, pertencente a família Canellaceae (Pooley, 1994). Ocorre em florestas sempre verdes e em ravinas arborizadas (Palgrave, 1981). É uma planta esbelta, geralmente com 5 a 10 m de altura, embora em algumas áreas atinja 20 m (van Wyk, 1994). As folhas são alternas ou com arranjo em espiral, cor verde-escuro brilhante na página superior, pálidas na página inferior, possuem a margem inteira, pecíolo curto e apresentam a cor azul-esverdeada quando jovens. A floração ocorre entre os meses de Abril e Maio. As flores são pequenas, amarelo-esverdeadas e encontra-se somente uma em cada axila. A frutificação ocorre no período compreendido entre os meses de Outubro e Dezembro. Os frutos têm a forma quase esférica e são de cor verde brilhante a púrpura (Pooley, 1994).

De acordo com Jansen & Mendes (1990), em Moçambique, a *Warburgia salutaris* pode ser encontrada em florestas abertas e submontanhosas do extremo sul, onde é conhecida com o nome vernacular de "chibaha".

A *Warburgia salutaris* tem aplicação medicinal desde os tempos remotos, o nome específico "*salutaris*" significa saúde. A casca contém tiamina, manitol (van Wyk 1994, van Wyk & Gericke 2000), sesquiterpenoides antibacterianos (Rabe & van Staden, 2000), sesquiterpenoides moluscidais (Appleton & Clark, 1997), a sua parte interna é avermelhada, amarga e tem uma variedade de aplicações (Palgrave, 1981). Ela providencia tratamento para úlceras (Mashimbye *et al.*, 1999), reumatismo, febre, doenças venéreas (van Wyk *et al.*, 1997), constipação comum, limpeza do seio paranasal, dores do peito e quando fervida juntamente com as raízes é considerada eficaz no tratamento contra malária (Palgrave, 1981).

Segundo Jansen e Mendes (1990), Zschocke *et al.* (2000) e Golding (2002), esta planta é uma das espécies com maior risco de extinção na África Austral, não só devido a sua destruição como consequência da extracção da casca para o uso na medicina tradicional,

como também por causa da inviabilidade das suas sementes como resultado da predacção por insectos.

De acordo com Fato (1995), os colectores que são geralmente lenhadores, caçadores, carvoeiros e cortadores de material de construção colhem várias plantas medicinais, dentre as quais a *Warburgia salutaris*, directamente no meio natural e levam-nas para o mercado, desenvolvendo-se activamente o fluxo destas espécies medicinais e sua aplicação.

Jansen & Mendes (1990) defendem que a protecção desta planta seria possível se a extracção da casca fosse feita em plantas cultivadas.

Poucas pesquisas foram publicadas acerca da propagação da *Warburgia salutaris*, dum modo geral e usando técnicas de micropropagação, em particular. Contudo, alguns experimentos realizados com vista a multiplicar esta planta através de macropropagação na Universidade Eduardo Mondlane, no Instituto de Investigação Agrária de Moçambique e no Jardim Tunduro não apresentaram resultados satisfatórios (Senkoro, em comunicação pessoal, 2006). Um outro experimento realizado por Gomane (2005), com o mesmo propósito, usando a macropropagação, foi também infrutífero.

Muitas plantas herbáceas e lenhosas têm sido vegetativamente propagadas a vários anos. Infelizmente, para algumas, as técnicas tradicionais de propagação vegetativa não são eficientes e conseqüentemente existe uma longa história sobre tentativas para se obter a regeneração controlada de plantas, *in vitro* (Bonga & Aderkas, 1992).

A micropropagação, no sentido mais amplo, é um método de propagação vegetativa *in vitro* ou sob condições estéreis. Nesta técnica, o controle do crescimento que opera numa planta intacta pode ser reduzido ou eliminado com vista a induzir a formação de vários brotos a partir dum explante inicial. Estes brotos poderão ser separados e induzidos a formarem raízes, gerando uma planta inteira. A micropropagação pode, desse modo fornecer milhões de réplicas da planta original (Baker,1992), de forma contínua,

independentemente da época do ano, e de forma mais rápida que os métodos convencionais de propagação vegetativa (Thorpe *et al.*, 1991).

A indução de possíveis respostas morfogênicas em micropropagação é dependente de factores externos (físicos e químicos), como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (Vasil, 1987), e também de factores inerentes ao material vegetal, como o estado fisiológico do explante e da planta que lhe deu origem (Thorpe *et al.*, 1991).

A combinação de diferentes proporções de citoquininas e auxinas constitui um instrumento na regulação da divisão celular, alongamento celular e formação de órgãos *in vitro* (Salisbury & Ross 1985, Pierik 1990, Dodds & Roberts 1995, Preece 1995, Hartmann *et al.* 1997, Peres & Kerbauy 1999). A alta razão citoquinina / auxina tende a promover a formação de brotos enquanto que a baixa razão induz a formação de raízes. Proporções iguais ou próximas destas hormonas favorecem a formação simultânea de brotos e raízes ou *callus* indiferenciado (Hartmann *et al.*, 1997).

Segundo Caldas *et al.* (1990), os meios de cultura controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Possuem geralmente agar ou outro produto como gerlite para garantir uma consistência semi-sólida, macro e micronutrientes, sacarose que é uma fonte primária de energia e algumas vitaminas (Hartmann *et al.*, 1997).

A grande variedade de meios de cultura que tem sido utilizada para a regeneração de espécies de diferentes gêneros foi relatada por Thorpe *et al.* (1991) entre diversos outros pesquisadores. Alguns desses meios de cultura são: Murashige-Skoog (MS), Anderson (AND), Gamborg B5 e o meio de cultura para plantas lenhosa (WPM).

O controle das condições ambientais como a temperatura e a luz é muito importante no desenvolvimento das culturas. A temperatura usada frequentemente em micropropagação varia de 25 a 27 °C (Hartmann *et al.*, 1997).

O efeito da luz tem a ver com a irradiação, o fotoperíodo e com a qualidade. Os níveis de irradiação luminosa típicos para a micropropagação situam-se entre 40 e 80 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e o fotoperíodo usado com maior frequência é de 12 a 16 horas de luz por dia. A qualidade de luz varia em função das lâmpadas utilizadas. As lâmpadas fluorescentes que produzem luz branca são usadas com maior frequência na sala de crescimento. A luz azul estimula a produção de clorofila e favorece a expansão foliar, sugerindo-se desse modo o seu uso durante a aclimatização das plântulas (Hartmann *et al.*, 1997).

Segundo Dodds & Roberts (1995) e Hartmann *et al.* (1997), a fonte de explantes deve ser cuidadosamente selecionada, uma vez que o tipo de explante utilizado muitas vezes determina o grau de sucesso na micropropagação. Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estress como seca, temperaturas excessivamente baixas ou altas, deficiência mineral e ataque de pragas ou doenças.

Com o presente trabalho pretendia-se avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido α -naftaleno-acético e da kinetina na indução de brotos nos explantes caulinares da *Warburgia salutaris*, de modo a se dar uma contribuição no estabelecimento de um protocolo para a sua regeneração através da micropropagação.

2. OBJECTIVOS

2.1 Objectivo geral

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do ácido α -naftaleno-acético (ANA) e da kinetina (KIN) na indução de brotos nos explantes caulinares da *Warburgia salutaris*.

2.2 Objectivos específicos

- Determinar as concentrações óptimas do ANA e da KIN para a indução de brotos.

3. HIPÓTESE

- Maior proporção KIN / ANA promoverá maior percentagem de formação de brotos, segundo Bonga & Aderkas (1992), Dodds & Roberts (1995) e Hartmann *et al.* (1997).

4. ÁREA DE ESTUDO

O trabalho laboratorial foi realizado no laboratório de cultura de tecidos pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane.

O laboratório estava dividido em três compartimentos fundamentais. O primeiro compartimento era a área envolvida na lavagem do material laboratorial, dos explantes, conservação de produtos químicos, para além da preparação e esterilização do meio de cultura. No segundo compartimento, existiam câmaras de fluxo laminar, nas quais foi feita a inoculação dos explantes sob condições assépticas. O último compartimento (sala de crescimento) possuía prateleiras sobre as quais colocou-se a cultura, lâmpadas fluorescentes (fonte de luz) e um aparelho de ar-condicionado que permitiu ajustar a temperatura às exigências da cultura.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Material e equipamento experimental

- Copos de vidro;
- Balões volumétricos;
- Pipetas graduadas;
- Tubos de ensaio (20 x 100 mm);
- Tinas de vidro;
- Papel de alumínio;
- Papel de filtro;
- Parafilme;
- Pinças longas;
- Bisturis;
- Máscara;
- Marcador de tinta permanente;
- Garrafa spray;
- Termómetro;
- Lamparina;
- Balanças analíticas;
- Medidor de luz;
- Autoclave;
- Geleira;
- Câmara de fluxo laminar;
- Micro-onda;
- Agitador magnético;
- Medidor de pH;

5.2 Reagentes e soluções

- Água destilada;
- Água destilada estéril;
- Agar;
- Sacarose;
- Tween 20;
- Etanol a 70%;
- Hipoclorito de sódio a 20 %
- KOH ou NaOH a 0,1N;
- HCl a 0,1N;
- Kinetina (KIN);
- Ácido α -naftaleno-acético (ANA);
- Componentes do meio de cultura WPM (Anexo nº 1).

5.3 Metodologia

O ensaio laboratorial foi composto por cinco tratamentos com vinte e sete réplicas para cada tratamento, sendo o tratamento controle, o qual não houve adição de fitohormonas ao meio de cultura e outros quatro tratamentos com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento usados foram o ácido α -naftaleno-acético (ANA) nas concentrações de 0.1 e 1.5 mg/L e a kinetina (KIN) nas concentrações de 1.5 e 3.0 mg/L, conforme ilustra a tabela 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Tabela 1 – Concentrações das fitohormonas em cada tratamento e o respectivo número de réplicas.

Tratamentos	Indução de brotos		Nº de réplicas
	Concentração (mg/L)		
	NAA	KIN	
1	0,00	0,00	27
2	0,10	1,50	27
3	0,50	1,50	27
4	0,10	3,00	27
5	0,50	3,00	27
Total			135

5.3.1 Preparação de soluções de fitohormonas

A solução de citoquinina foi preparada dissolvendo-se 15 mg de kinetina em pó em cerca de 4 ml de HCL a 0.1 N num balão volumétrico de 1L e adicionou-se água destilada até ao volume final de 1L. A preparação da solução de auxina consistiu na dissolução de 1 mg do ácido α -naftaleno-acético em cerca de 4 ml de etanol a 70 % e posteriormente adicionou-se água destilada até ao volume final de 1 L. Ambas soluções foram rotuladas e depois conservadas na geleira a 4°C.

5.3.2 Preparação das soluções *stock*

As soluções *stock A, B, C, D e E* continham macro e micronutrientes enquanto que F e G possuíam substâncias orgânicas (Anexo 1). Estas soluções eram 100 vezes mais concentradas que a solução final, tendo se usado 10 ml de cada solução *stock* por um litro de meio de cultura preparado.

Preparou-se a solução *stock A*, colocando-se cerca de 400 ml de água destilada num copo de vidro de 1L. Numa balança electrónica pesaram-se e com ajuda de um agitador magnético dissolveram-se, os nutrientes indicados no grupo A do anexo 1. Depois de se tornar homogénea, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 1L, adicionou-se água destilada até ao volume final de 1 L, rotulou-se e conservou-se na geleira a 4°C. Repetiu-se o procedimento anterior para preparar as soluções *stock B, C, D, F e G* usando os compostos indicados no grupo designado pela respectiva letra.

No caso da solução *stock E*, pôs-se cerca de 40 ml de água destilada morna num copo de vidro de 100 ml e dissolveu-se $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Num outro copo, pôs-se 40 ml de água destilada morna e dissolveu-se Na_2EDT . Juntaram-se as duas soluções, transferiu-se a solução final para um balão volumétrico de 1L, adicionou-se água destilada até ao volume final de 1 L, cobriu-se a solução com papel de alumínio para proteger da luz, rotulou-se e conservou-se a solução a temperatura ambiente para evitar a precipitação do ferro a baixas temperaturas, de acordo com Dodds & Roberts (1995).

5.3.3 Preparação do meio de cultura

Preparou-se 3 litros de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), colocando-se aproximadamente 300 ml de água destilada num copo de vidro de 1 L, adicionou-se 30 ml de cada solução stock, 90g de sacarose e dissolveu-se a mistura através de um agitador magnético. Acrescentou-se água destilada até ao volume de 800 ml e dividiu-se equitativamente a solução em cinco copos de 600 ml etiquetados de 1 a 5. Em seguida, colocaram-se 60 ml de KIN a 15 mg/L nos copos 2 e 3, nos copos 4 e 5 pôs-se 120 ml de KIN a 15 mg/L, 60 ml de ANA a 1 mg/L nos copos 2 e 4, por fim pôs-se 300 ml de ANA a 1 mg/L nos copos 3 e 5. Acrescentou-se água destilada a todos os copos até ao volume de 600 ml.

Ajustou-se o pH para $5,7 \pm 0,1$ (Owen *et al.*, 1991) usando-se HCl e NaOH. Adicionou-se a cada um dos cinco copos 6 g de agar, homogeneizaram-se as soluções num agitador magnético e colocou-se cada copo contendo o meio de cultura num micro-onda, durante 5 minutos para a dissolução do agar.

Distribuiu-se o meio de cultura contido em cada copo por vinte e sete tubos de ensaio, pipetando 10 ml para cada tubo. Taparam-se os tubos com papel de alumínio e etiquetaram-se indicando a data e o tratamento. Esterilizou-se o meio de cultura através da autoclavagem a $1,5 \text{ kg / cm}^3$ e 121°C por 15 minutos e deixou-se solidificar por 24 horas.

5.3.4 Colheita de explantes

A colheita dos explantes na Reserva Florestal de Licuati consistiu em cortar extremidades apicais do caule não lenhoso (Pasqual & Ando,1989) de *Warburgia salutaris*, com 5 cm de comprimento contendo dois ou mais nós, com auxílio duma texoura. Para prevenir a desidratação dos explantes, colocaram-se num recipiente com água. No laboratório, retiraram-se as folhas dos explantes de modo a deixar apenas as hastes caulinares que foram lavadas com água corrente.

5.3.5 Esterilização e inoculação de explantes

Trabalhou-se em meio asséptico para evitar contaminação da cultura por bactérias e fungos (Hartmann *et al.*,1997). Para tal limpou-se em primeiro lugar o local de trabalho (câmara de fluxo laminar) com algodão humedecido com água para remover o pó e as impurezas, limpou-se novamente com algodão humedecido com etanol a 70 %. A câmara de fluxo laminar manteve-se ligada 30 minutos antes da sua utilização.

A esterilização dos explantes consistiu em imergí-los em etanol a 70 % por cinco minutos, em hipoclorito de sódio a 20 % com algumas gotas de tween 20 durante quinze minutos e três lavagens com água destilada esterilizada, tendo cada lavagem durado cinco minutos (Dodds & Roberts,1995). Transferiu-se um explante de cada vez para a superfície do papel de filtro estéril, onde com ajuda de pinças e bisturís estéreis cortou-se cerca de 2-3 cm da extremidade basal de cada explante, reduzindo-os de 5 cm a cerca de 2 cm (Norton & Norton 1986, Hartmann *et al.* 1997).

A inoculação dos explantes ocorreu em tubos de ensaio contendo o meio de cultura, em seguida taparam-se os tubos de ensaio com papel de alumínio e foram selados com parafilme.

5.3.6 Incubação da cultura

A cultura foi incubado numa sala de crescimento a temperatura de 27 °C, fotoperíodo de 16/8 horas (luz / escuro) e a irradiação luminosa de cerca de $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ produzida por lâmpadas fluorescentes.

5.3.7 Controle

Semanalmente efectuava-se um controle não só para retirar parte da cultura contaminada por patógenos como também para a contagem dos prováveis brotos e folhas que se formassem em cada tratamento.

5.4 Análise estatística

Os dados foram analisados no pacote estatístico Statistix versão 2.0. A comparação dos números médios de folhas por tratamento foi feita pelo teste ANOVA *one-way* (Fowler & Cohen, 1996) e pelo teste posterior para comparação de médias, Tukey a um nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

No presente estudo não houve formação de brotos. Contudo verificou-se o surgimento de novas folhas em quase todos tratamentos. As folhas resultaram do desenvolvimento das hastes caulinares presentes nos ápices dos explantes (Figura 1), excepto no tratamento com 3.0 mg/L de kinetina e 0.5 mg/L de ácido α -naftaleno-acético (T5), no qual não se verificou a formação de novas folhas.



Figura 1. Um explante de *Warburgia salutaris* com novas folhas e contaminação fúngica, depois de duas semanas na sala de crescimento.

O tratamento controle (T1) apresentou maior número médio de folhas, não obstante o maior desvio padrão, em relação aos restantes tratamentos cujas médias foram inferiores a 0.5, tal como ilustra a figura 2.

A comparação dos números médios de folhas por tratamento, feita pelo teste ANOVA *one-way* mostrou que existem diferenças significativas entre os tratamentos (Anexo 2a).

O teste posterior de comparação de médias, Tukey ($P < 0.05$) elucidou que existem diferenças significativas apenas entre o tratamento desprovido de reguladores de crescimento (T1) e os restantes (Anexo 2b).

Os explantes mantinham um aspecto saudável em todos tratamentos, embora se destacassem os tratamentos controle e o com 1.5 mg/L de kinetina e 0.1 mg/L de ácido α -naftaleno-acético (T2). A taxa de sobrevivência nula verificada na cultura resultou da destruição da parte basal dos explantes originada pelo desenvolvimento dos fungos no meio de cultura.

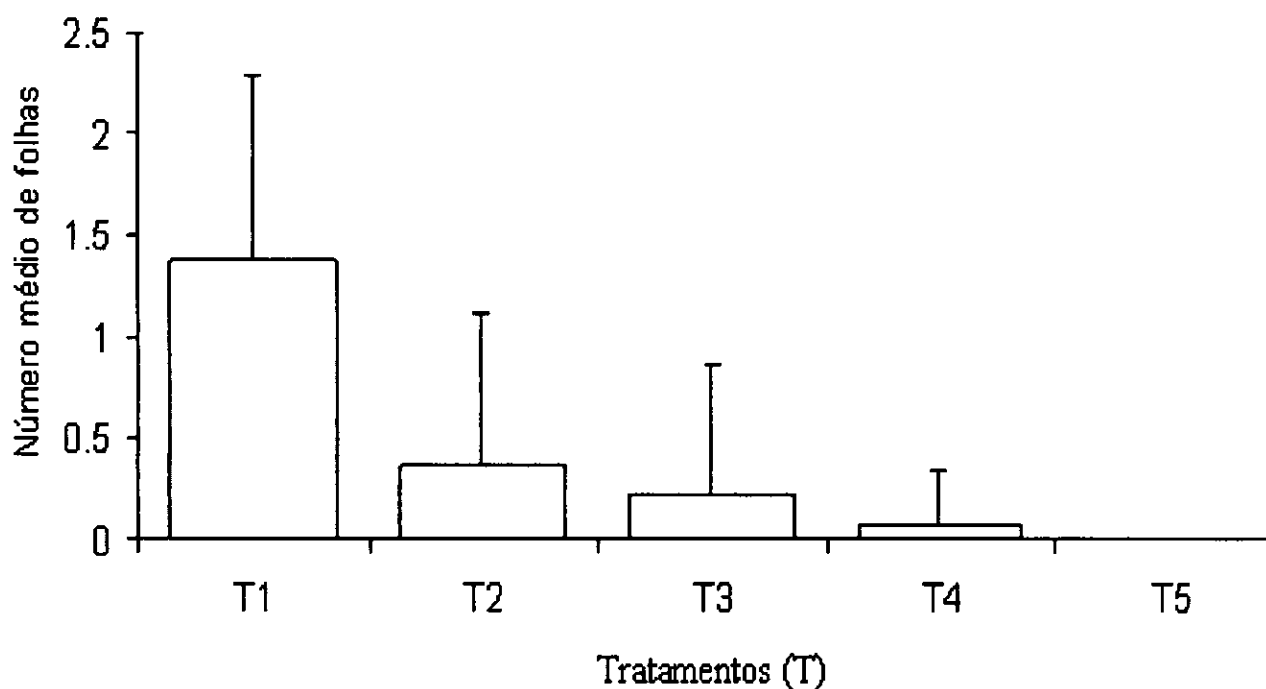


Figura 2. Número médio de folhas e o respectivo desvio padrão correspondentes aos tratamentos T1 (controle, sem fitohormonas), T2 (1.5 mg/L de KIN e 0.1 mg/L de ANA), T3 (1.5 mg/L de KIN e 0.5 mg/L de ANA), T4 (3.0 mg/L de KIN e 0.1 mg/L de ANA) e T5 (3.0 mg/L de KIN e 0.5 mg/L de ANA), no período de duas semanas.

7. DISCUSSÃO

O maior número de folhas nos explantes de *Warburgia salutaris* formou-se no tratamento sem adição de fitohormonas (Figura 2). Gomane (2005), embora através da macropropagação, teve um resultado similar ao verificar maior número de folhas no tratamento sem adição de reguladores de crescimento e que a adição do AIB (ácido-3-indol butírico) causava uma redução do número de folhas nas estacas de *Warburgia salutaris*.

A melhor resposta no crescimento e desenvolvimento num meio de cultura sem reguladores de crescimento foi também observada em *Ipomea batatas* (Martins citado por Pereira *et al.*, 2000) e em *Clusia nemorosa* (Saleh & Shepherd citado por Pereira *et al.*, 2000).

A adição exógena de fitorreguladores terá, provavelmente, causado um desbalanço hormonal endógeno. De acordo com Pinto & Pasqual citado por Pereira *et al.* (2000), certos tecidos sintetizam as quantidades de hormonas que necessitam apesar de outros serem totalmente dependentes da adição exógena.

A interrupção precoce do ensaio, consequência da contaminação das culturas por fungos e bactérias, limitou a avaliação do efeito de kinetina e do ácido α -naftaleno-acético na indução de brotos, pois o tempo necessário para a formação de brotos, segundo Dodds & Roberts (1995), pode atingir vários meses dependendo da espécie e das condições da cultura.

Esperava-se que o tratamento com maior proporção kinetina / ácido α -naftaleno-acético (T4) apresentasse melhor resultado em termos de formação de brotos, de acordo com Dodds & Roberts (1995) e Hartmann *et al.* (1997). Mas pelo facto de se ter verificado maior número de folhas no tratamento sem reguladores de crescimento, o que significou maior taxa de crescimento, provavelmente o maior número de brotos também fosse observado no mesmo tratamento. Todavia, tal situação não se verificaria caso o balanço

hormonal endógeno não fosse adequado para eliminar a dominância apical que poderia manter os brotos laterais dormentes (Salisbury & Ross 1985), se houvesse alta atividade de citoquinina oxidase (enzima que degrada citoquininas), impedindo o alcance do balanço citocinina / auxina indutor da formação de gemas (Peres & Kerbauy, 1999) ou por falta de competência (capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação de um órgão) (Christianson & Warnick, 1988). A falta de competência de um tecido pode refletir a falta de receptores para a classe hormonal que deveria induzir o processo organogênético (Cary *et al.*, 1999) mas pouco se sabe, até o momento, sobre os mecanismos envolvidos nesse processo (Dornenburg & Knorr 1995, Kerbauy citado por Peres, 2000).

A contaminação bacteriana e fúngica é, de acordo com Dodds & Roberts (1995), um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento do explante *in vitro*, principalmente a presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais. Além da contaminação superficial, é freqüente deparar-se com contaminação presente no interior dos tecidos, designada contaminação endógena, que é mais comum em explantes derivados de plantas que crescem no campo. Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfecção, devendo-se dar preferência a explantes derivadas de plantas cultivadas em ambientes controlados. Contudo, a única fonte de explantes de *Warburgia salutaris* existente eram as plantas que cresciam no meio natural.

A partilha do espaço do laboratório para a realização de outros estudos terá possivelmente contribuído para a elevada taxa de contaminação da cultura porque nem todos indivíduos que entravam no laboratório observavam as medidas de assépsia necessárias num laboratório de cultura de tecidos. É também provável que a fraca pressão do ar na câmara de fluxo laminar não tenha garantido um ambiente estéril para minimizar o risco de contaminação durante a fase de transferência dos explantes para o meio de cultura.

8- CONCLUSÕES

- Não foi possível a avaliar o efeito de kinetina (KIN) e do ácido α -naftaleno-acético (ANA) na formação de brotos nos explantes caulinares de *Warburgia salutaris* dado elevado índice de contaminação da cultura por fungos e bactérias. Portanto, não foram encontradas as concentrações ótimas de ANA e KIN para a indução de brotos.
- A adição de kinetina e do ácido α -naftaleno-acético nas concentrações testadas ao meio de cultura para plantas lenhosas, reduz a formação de folhas nos explantes caulinares de *Warburgia salutaris*.

9. RECOMENDAÇÕES

Recomenda-se:

- A colheita de explantes a partir de plantas cultivadas em estufas onde o ambiente possa ser controlado através de pulverizações periódicas e consequentemente reduzir-se o índice de contaminação da cultura por patógenos.
- A colheita de explantes a partir de plantas cuja idade é conhecida de modo a seleccionar as plantas mais jovens, nas quais a actividade metabólica é mais activa, o que proporciona maiores chances de formação de brotos.
- A melhoria no funcionamento da instalação eléctrica do laboratório o que permitirá funcionamento permanente do aparelho de ar-condicionado, evitando-se desse modo a oscilação da temperatura para além do previsto.
- A instalação de um interruptor automático para garantir o controle do fotoperíodo de forma mais eficiente.
- A assistência técnica periódica da câmara de fluxo laminar para assegurar um ambiente de trabalho asséptico e minimizando-se desse modo o risco de contaminação da cultura por patógenos.
- A melhoria da cobertura do laboratório para impedir a infiltração da água da chuva que não só dificulta a manutenção de um ambiente estéril dentro do laboratório como torna as condições de trabalho difíceis quando chove.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Appleton, C.C. & T.E. Clark (1997). The Molluscicidal Activity of *Apodytes dimidiata* E. Meyerex Arn (Icacinaceae), *Gardenia thunbergia* L.f. (Rubiaceae) and *Warburgia salutaris* (Bertol.f.) Chiov. (Canellaceae), Three South African plants, Journal of Ethnopharmacology, 56:15 -30.

Baker, F.W.G. (1992). Rapid Propagation of Fast-growing Woody Species. 125 pp. United Kingdom, C.A.B International.

Bonga, J.M. & P.V. Aderkas (1992). In Vitro Culture of Trees, volume 38. 236 pp. Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Caldas, L.S., P. Haridasan & M.E. Ferreira (1990). Meios Nutritivos. In: Torres, A.C. e L.S. Caldas (editores). Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas. Pp 37-70. Brasília, Embrapa-CNPQ

Cary, A., S.J. Uttamchandani, R. Smets, H.A. van Onckelen & S.H.H. Howell (1999). Arabidopsis Mutants With Increased Organ Regeneration in Tissue Culture are More Competent to Respond to Hormonal Signals. *Planta*, 213:700-707.

Christianson, M.L. & D.A. Warnick (1988). Organogenesis in vitro as a Developmental Process. *HortScience*, 23: 515-519.

Dodds, J.H. & L.W. Roberts (1995). Experiments in Plant Tissue culture, 3rd edition. 256 pp. United States of America, Cambridge University Press.

Dornenburg, H. & D. Knorr (1995). Strategies for the Improvement of Secondary Metabolite Production in Plant Cell Cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8): 674-684.

Fato, P. (1995). Plantas Mediciniais na Cidade de Maputo: Sua Aplicação, Proveniência e Comercialização. Tese de Licenciatura. 66 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Fowler, J. & L. Cohen (1996). Practical Statistics for Field Biology. 227 pp. New York, John Wiley & Sons.

Golding, J. (2002). Southern African Plant Red Data Lists. 237 pp. Pretoria, Sabonete.

Gomane, S.T. (2005). Efeito da Inoculação por Fungos Endomicorrizicos (visículo-arbusculares) na Propagação Vegetativa da Vagueira infausta, Securidaca longipedunculata e Warburgia salutaris. Tese de Licenciatura. 38 pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.

Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies Jr. & R.L. Geneve (1997). Plant Propagation: Principles and Practice, 6th edition. 770 pp. New Jersey, Prince-Hall.

Jansen, P.C.M & O. Mendes (1990). Plantas Mediciniais, seu Uso Tradicional em Moçambique. 302 pp. Maputo, Imprensa do Partido.

Mashimbye, M.J., M.C. Maumela & S.E. Drewes (1999). Adrimane Sesquiterpenoid Lactone from Warburgia salutaris. *Phytochemistry*, 51: 435-438.

Lloyd, G. & B. McCown (1980). Commercially-feasible Micropropagation of Mountain Laurel, Kalmia latifolia, by Use of Shoot-tip Culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427.

Norton, M.E. & C.R. Norton (1986). Explant Origin as the Determinant of *in vitro* Proliferation in Prunus and Spiraea. *Journal of Horticultural Science*, 61(1): 43-48.

Owen, H.R., D. Wengerd & A.R. Miller (1991). Culture Medium pH is Influenced by Basal Medium, Carbohydrate Source, Gelling Agent, Activated Charcoal, and Medium Storage Method. Plant Cell Reports, 10: 583-586.

Palgrave, K.C. (1981). Trees of Southern Africa, 2nd edition. 959 pp. Cape Town, Tien Wah Press (pte) Ltd.

Pasqual M. & A. Ando (1989). A Micropropagação da Laranja "valência" através da Cultura de Gemas axilares in vitro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 24 (6): 723-726.

Pereira, F.D, J. B.P. Pinto, M.D.G. Cardoso & E.O.A. Lameira (2000). Propagação in vitro de Chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma Planta Medicinal. Ciência Agrotécnica, 24: 74-80.

Peres, L. E. P. & G.B. Kerbauy (1999). High Cytokinin Accumulation Following Root Tip Excision Changes the Endogenous Auxin-to-cytokinin Ratio during Root-to-shoot Conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). Plant Cell Reports, 18: 1002-1006.

Peres, L.E.P. (2000). Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de Plantas in vitro. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 24: 74-80.

Pierik, R.L.M. (1990). Cultivo in vitro de Las Plantas Superiores, 3^a edição. 326 pp. Madrid, Mundi-Prensa.

Pooley, E. (1994). The Complete Field Guide to Trees of Natal, Zululand & Transkei. 512 pp. Durban, Natal Flora Publications Trust.

Preece, J.E. (1995). Can Nutrient Salts Partially Substitute for Plant Growth Regulator? Plan Tissue Culture and Biotechnology, 1 (1): 26-37.

Rabe, T. & J. van Staden (2000). Isolation of an Antibacterial Sesquiterpenoid from *Warburgia salutaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 171-174.

Salisbury, F.B. & C.W. Ross (1985). Plant Physiology. 540 pp. California, Wadsworth Publishing Company, Inc.

Thorpe, T.A., I.S. Harry & P.P. Kumar (1991). Application of Micropropagation to Forestry. In: Debergh, P.C. & R.H. Zummerman (editores). Micropropagation: Technology and application. Pp 311-336. Dordrecht, Kluwer Academic Press.

Van Wyk, P. (1994). Field Guide to the Threes of Kruger National Park, 3rd edition. 272 pp. Cape Town, Struik Publishers (pty) Ltd.

Van Wyk, B., B.V. Oudtshoorn & N. Gericke (1997). Medicinal Plants of South Africa. 304 pp. Pretoria, Briza Publications.

Van Wyk, B. & N. Gericke (2000). People's Plants: A Guide to Useful Plants of South Africa. 351 pp. Pretoria, Briza Publications.

Vasil, I.K. (1987). Developing Cell and Tissue Culture Systems for the Improvement of Cereal and Grap Crops. *Journal of Plant Physiology*, 128: 193-218.

Zschocke, S., T. Rabe, J.L.S. Taylor, A.K. Jäger & J. van Staden (2000). Plant Part Substitution - a Way to Conserve Endangered Medicinal Plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 281-292.

Anexos

Anexo 1 - Componentes químicos das soluções *stock* (gramas / litro) usadas na preparação do meio de cultura para plantas lenhosas (WPM) idealizado por Lloyd & McCown (1980).

Grupo	Composto	WPM
A	NH_4NO_3	40,00
	$\text{Ca}(\text{NO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	55,60
B	$\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	99,00
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,00
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,23
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025
C	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9,60
D	KH_2PO_4	17,00
	H_3BO_3	0,62
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
E	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78
	Na_2EDTA	3,73
F	Tiamina-HCl	0,10
	Acido nicotínico	0,05
	Pirodoxina-HCl	0,05
	Glicina	0,20
G	Myo-inositol	10,00

Anexo 2. Teste estatístico do número de folhas formadas pelos explantes da *Warburgia salutaris* entre diferentes tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5).

a) STATISTIX FOR WINDOWS

ONE-WAY AOV FOR: T1 T2 T3 T4 T5

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	4	33.4815	8.37037	22.16	0.0000
WITHIN	130	49.1111	0.37778		
TOTAL	134	82.5926			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 0.29602
EFFECTIVE CELL SIZE 27.0

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
T1	1.3704	27	0.9260
T2	0.3704	27	0.7415
T3	0.2222	27	0.6405
T4	0.0741	27	0.2669
T5	0.0000	27	0.0000
TOTAL	0.4074	135	0.6146

CASES INCLUDED 135 MISSING CASES 0

b) STATISTIX FOR WINDOWS

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
T1	1.3704	I
T2	0.3704	.. I
T3	0.2222	.. I
T4	0.0741	.. I
T5	0.0000	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 3.857 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.4562
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.1673

Anexo 3. Disposição da cultura durante o ensaio, na sala de crescimento.

