

## COMUNICAÇÃO

### INFLUÊNCIA DE EXTRATOS VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE *Rosa x hybrida*

#### Influence of plant extracts on the development *in vitro* of *Rosa x hybrida* plantlets

Dejane Santos Alves<sup>1</sup>, Denilson Ferreira de Oliveira<sup>2</sup>, Moacir Pasqual<sup>3</sup>, Douglas Antônio de Carvalho<sup>4</sup>,  
Vantuil A. Rodrigues<sup>5</sup>, Daniel Diego Costa Carvalho<sup>6</sup>

#### RESUMO

Estudou-se a influência de extratos vegetais no crescimento, *in vitro*, de plântulas de *Rosa x hybrida*, objetivando o desenvolvimento de novos reguladores vegetais para a propagação dessa planta ornamental. Extratos metanólicos de *Saintpaulia ionantha* Wendl. (folhas), *Hibiscus rosa-sinensis* L. (folhas) e *Bougainvillea spectabilis* Wild. (folhas e flores) foram obtidos nas concentrações de 150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>. Na ocasião de preparo do extrato todas as plantas se encontravam no período de floração. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos e quatro repetições. Dois desses tratamentos foram utilizados como controle: meio de cultura com e sem BAP (6-benzilaminopurina). As variáveis analisadas foram: número e comprimento de brotos, número e comprimento de raízes, e número de folhas por broto. Quanto à variável número de brotos, todos os extratos testados se comportaram como o controle sem o BAP. No que diz respeito ao número e comprimento de raízes, apenas o extrato das folhas de *H. rosa-sinensis* na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> se mostrou diferente do controle sem o BAP, com valores estatisticamente iguais ao do controle com BAP. Excetuando-se o extrato de *H. rosa-sinensis*, todos reduziram o número de folhas por broto. Embora os efeitos observados não tenham sido tão pronunciados quanto os causados pelo BAP, os resultados indicam a presença de fitormônios nos extratos estudados.

**Termos para a indexação:** Cultura de tecidos, extratos vegetais, fitormônios.

#### ABSTRACT

This work aimed to study the influence of plant extracts on the *in vitro* growth of *Rosa x hybrida* plantlets, to contribute to the development of new plant growth regulators to propagate such ornamental plant. Methanolic extracts of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (leaves), *Hibiscus rosa-sinensis* L. (leaves) and *Bougainvillea spectabilis* Wild. (leaves and flowers) were employed at 150 and 300 mg.L<sup>-1</sup>. Flowering plants were used to obtain the extracts. The experiment was carried out in a randomized design, with ten treatments and four repetitions. Culture medium with and without BAP (6-benzylaminopurine) were used as controls. The analyzed variables were shoot number and length, root number and length, and leaves per shoot. Regarding shoot number, all extracts were statistically identical to the control without BAP. When root number and length were taken into account, only the extract of *H. rosa-sinensis* leaves at 300 mg.L<sup>-1</sup> differed from the control without BAP, with values statistically identical to the control with BAP. Except for the *H. rosa-sinensis* extract, all the others reduced the number of leaves per shoot. Although the observed effects were not as pronounced as those obtained with BAP, these results indicate the presence of plant growth regulators in the studied extracts.

**Index terms:** Tissue culture, plant extracts, growth regulators.

(Recebido em 18 de maio de 2006 e aprovado em 9 de janeiro de 2007)

As exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais, acumularam valores da ordem de US\$ 23,5 milhões no ano de 2004. Para que tal montante fosse alcançado, o seguimento de flores frescas de corte, dentre as quais destacam-se as rosas, contribuiu com vendas

externas em torno de US\$ 4,9 milhões (IBF, 2005).

Para solucionar vários dos problemas relacionados à cultura de rosas, a manipulação de tecidos vegetais *in vitro* apresenta-se como uma excelente alternativa, já que permite a produção de plantas mais uniformes e mais saudáveis.

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – dejane\_bio@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Professor Associado – Departamento de Química/DQI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – denilson@ufla.br

<sup>3</sup>Professor Titular – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br.

<sup>4</sup>Professor Titular – Departamento de Biologia/DBI – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – douglasc@ufla.br

<sup>5</sup>Técnico – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – vantuilmaraja@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Mestrando em Fitopatologia – Departamento de Fitopatologia/DFP – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ufla-ddcc@bol.com.br

em maior número, menos tempo e menor espaço físico. Além disso, permite a obtenção de plantas livres de vírus e de outros patógenos (CROCOMO, 1986). Dubois et al. (1988), por exemplo, estudando a propagação de plantas de roseira, observaram que a taxa de multiplicação *in vitro* foi duas vezes maior que da multiplicação *in vivo*.

O crescimento de plantas *in vitro* exige a adição ao meio de cultura de reguladores de crescimento. Essas substâncias são essenciais para a multiplicação da parte aérea no cultivo *in vitro* de algumas espécies vegetais, embora o seu excesso possa ser tóxico, o que é caracterizado principalmente por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (LESHEM et al., 1988). Além disso, cada planta requer diferentes tipos e concentrações de fitoreguladores (MISAWA, 1994).

As citocininas e auxinas correspondem aos mais importantes grupos de reguladores de crescimento e da morfogênese de tecidos e órgãos vegetais (PASQUAL, 2001). Essas substâncias são essenciais para o desenvolvimento dos explantes e estão intimamente relacionadas com a divisão celular e o crescimento do meristema (MARQUES, 1996). As citocininas, a exemplo do BAP (6-benzilaminopurina), agem induzindo a quebra da dominância apical e proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

No caso específico da micropropagação de roseira, há ainda várias questões a serem resolvidas. Além do custo elevado, problemas como a dominância apical, vitrificação e a senescência da folha dificultam o uso dessa técnica na multiplicação da referida planta (DEBERGH & CZIMMERMAN, 1991). Conseqüentemente, tem-se observado uma forte demanda por novos fitoreguladores, mais estáveis, com preços mais acessíveis e com menos efeitos adversos.

Uma possível alternativa para contornar os problemas enfrentados na multiplicação *in vitro* de plantas consiste no desenvolvimento de novos produtos de origem vegetal. Existem relatos na literatura da influência de produtos de origem natural no crescimento e desenvolvimento de plantas. Por exemplo, Suzuki et al. (2002) observaram a capacidade de oligossacarídeos provenientes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em promover o crescimento de *Celosia argentea* L.. Marino et al. (2004), por sua vez, verificaram a influência do extrato aquoso de *Amaranthus retroflexus* L. sobre o desenvolvimento de raízes e de calos de *Actinidia deliciosa* Lang & Ferguson cultivada *in vitro*. Têm-se ainda os brassinoesteróides, extraídos primariamente de

*Distylium racemosum* Siebold & Zucc. e *Brassica napus* L.. De acordo com Cutler (1994), esses são os únicos reguladores do crescimento de plantas com potencial para aumentar a produção de hortaliças.

São inúmeros os relatos na literatura da identificação de citocininas de ocorrência natural. Strnad et al. (1992) verificaram a ocorrência de N6-(O-hidroxibenzilamino)purina em folhas de *Populus x canadensis* Moench cv. Robusta. Ernst et al. (1983) relataram a ocorrência de 6-benzilaminopurinoribosídeo em cultura de células de *Pimpinella anisum* L.. Strnad et al. (1997), por sua vez, relataram a alta atividade de N6-(*m*-hidroxibenzil)adenina em folhas de *Populus x canadensis* Moench cv. Robusta.

A concentração de um determinado fitormônio pode variar conforme a parte da planta analisada. Saenz et al. (2003), analisando a concentração de citocininas isoprenóides e aromáticas em diferentes partes de plantas adultas de *Cocos nucifera* L., observaram que as maiores concentrações totais desses fitormônios foram encontradas no embrião e na inflorescência imatura. Ahmadi & Baker (2000) quantificaram e identificaram citocininas endógenas em folhas jovens e maduras, botões laterais, caule e casca de *Pistacia vera* L. cv. Ohadi. Diidroxizeatina e zeatina ribosídeo foram encontradas em grande quantidade tanto nas folhas jovens como nas maduras, sendo a última substância também encontrada em elevada concentração na casca. Nos brotos laterais e nas folhas foi observado um aumento da quantidade de isopenteniladenina com o decorrer da maturação. Assim, os autores sugeriram que a ocorrência de diferentes citocininas em variadas concentrações era resultado de diferenças metabólicas entre as partes analisadas.

Considerando-se o potencial das plantas para produção de fitormônios e os indícios de que a concentração dos mesmos nos tecidos vegetais é maior durante o período de floração, desenvolveu-se este trabalho com o objetivo de verificar a influência de extratos de flores e de outras partes de plantas em floração, sobre o desenvolvimento *in vitro* de mini-roseira.

Partes de espécies vegetais em florescimento (Tabela 1), coletadas no Campus da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, foram picadas e maceradas em metanol por 48 horas. Em seguida, as misturas foram filtradas em algodão hidrófilo e os resíduos colocados novamente em metanol por mais 48 horas. As novas misturas foram filtradas e as soluções combinadas com as soluções resultantes da primeira filtração. Posteriormente, os líquidos foram concentrados até *secura* sob pressão reduzida. Parte de cada um dos resíduos (300 mg), obtidos

na concentração dos extratos, foi dissolvida em 2 mL de DMSO (dimetilssulfóxido), completando-se o volume para 100 mL com água destilada, para serem adicionados ao meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Preparou-se o meio de cultura MS solidificado com ágar (concentração de 7 g.L<sup>-1</sup>) e acrescentaram-se os extratos vegetais nas concentrações de 150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>, ajustando-se o pH para 5,8 com NaOH 0,5 M e HCl 0,5 M. Em seguida, 15 mL do meio foram colocados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) e autoclavados a 120 C ° e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Segmentos nodais provenientes de plântulas de mini-roseira (*Rosa x hybrida*), mantidas *in vitro* por meio de sucessivas repicagens no Laboratório de Cultura de Tecidos/UFLA, foram transferidos asépticamente para tubos de ensaio contendo o meio MS mais extratos vegetais e mantidos em sala de crescimento por 90 dias, a 27 C °, com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 32 mmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, suprida por lâmpadas grow-lux e branca fria.

Os tratamentos foram constituídos dos quatro extratos vegetais em duas concentrações (150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>), utilizando-se como controle (sem extrato) o meio MS sem e com BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Empregou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições e parcela constituída por quatro tubos de ensaio, sendo cada um com uma plântula. As variáveis analisadas foram: número e comprimento de brotos, número e comprimento de raízes, e número de folhas por broto. Procedendo a análise estatística, os dados foram transformados ( $X' = [X+0,5]^{0,5}$ ), visando atender a pressuposição de normalidade. Em seguida, procedeu-se à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Scott- Knott a 5 % de probabilidade (SCOTT & KNOTT, 1974). A análise de variância foi realizada por meio do programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2000).

Tabela 1 – Materiais vegetais empregados no preparo dos extratos metanólicos.

Espécie	Família	Parte coletada
<i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl.	Gesneriaceae	Folhas
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Malvaceae	Folhas
<i>Bougainvillea spectabilis</i> Wild.	Nyctaginaceae	Folhas
<i>Bougainvillea spectabilis</i> Wild.	Nyctaginaceae	Flores

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. Os tratamentos de extratos vegetais, a exceção daquele proveniente de *H. rosa-sinensis* na concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>, diferiram do tratamento controle MS sem BAP para comprimento de brotos. Ademais, tiveram comportamento semelhante ao tratamento controle MS com BAP, indicando que tais extratos vegetais possuem alguma substância com características semelhantes a do regulador vegetal BAP.

Em relação ao número de brotos, todos os extratos vegetais testados se comportaram como o controle MS sem o BAP, indicando que não apresentam potencial para aumentar o número de plantas a serem produzidas. Esse comportamento foi diferente do apresentando pelo controle BAP, que reduziu o comprimento e aumentou o número de brotos.

Quanto ao desenvolvimento das raízes (número e crescimento de raízes), apenas o extrato das folhas de *H. rosa-sinensis* na concentração de 300 mg.L<sup>-1</sup> se mostrou diferente do tratamento controle MS sem BAP, com valores estatisticamente iguais ao controle MS com BAP. Como era de se esperar, esse pequeno desenvolvimento das raízes ocasionou maior crescimento vegetativo da parte aérea. Com isso, o extrato de *H. rosa-sinensis*, que tinha acarretado número de brotos estatisticamente igual à testemunha, proporcionou a obtenção de maior número de folhas por broto. Ainda que em menor intensidade, os outros extratos causaram o mesmo efeito. Ou seja, apesar de ficar nítida a presença nos extratos de substâncias capazes de influenciar o crescimento das plântulas de mini-roseira, o efeito obtido não foi o desejado. O interessante seria obter um maior número de brotos, o que proporcionaria um aumento no número de mudas a serem produzidas.

Apesar dos resultados não terem sido satisfatórios, mostram-se bastante promissores, uma vez que confirmam a presença de substâncias que podem influenciar o crescimento de plântulas de mini-roseira. É possível que ajustes nas concentrações dos extratos possam maximizar o efeito desejado. Jones et al. (1995), por exemplo, estudando o desenvolvimento anormal de inflorescências de *Elaeis guineensis* Jacq., observaram que diferenças na concentração de certas citocininas tinham grande influência sobre o desenvolvimento das inflorescências, determinando se este seria normal ou anormal. De forma análoga, Mithila et al. (2003) verificaram que o tratamento de *Saintpaulia ionantha* Wendl. com o regulador de crescimento thidiazuron (TDZ), induziu organogênese do broto quando aplicado em baixas concentrações e embriogênese somática em altas concentrações.

Tabela 2 – Efeito de diferentes extratos vegetais em meio de cultura no número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e número de folhas por broto (NFB) em plântulas de mini-roseira. Lavras, UFLA, 2006.

Tratamentos	CB (cm)	NB	NR	CR (cm)	NFB
Testemunha MS	1,38 b	1,25 a	1,41 b	1,10 b	3,74 c
BAP	1,21 a	2,56 b	0,71 a	0,71 a	3,01 a
<i>Saintpaulia ionantha</i> (folhas) 150 mg. L <sup>-1</sup>	1,22 a	1,25 a	2,31 b	0,78 b	3,49 b
<i>Saintpaulia ionantha</i> (folhas) 300 mg. L <sup>-1</sup>	1,20 a	1,22 a	1,68 b	1,08 b	3,32 b
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (folhas) 150 mg.L <sup>-1</sup>	1,32 b	1,29 a	1,27 b	1,18 b	3,89 c
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (folhas) 300 mg.L	1,24 a	1,22 a	0,83 a	0,82 a	3,61 c
<i>Bougainvillea spectabilis</i> (folhas) 150 mg.L <sup>-1</sup>	1,23 a	1,25 a	1,53 b	1,20 b	3,35 b
<i>Bougainvillea spectabilis</i> (folhas) 300 mg.L <sup>-1</sup>	1,19 a	1,22 a	1,35 b	1,08 b	3,37 b
<i>Bougainvillea spectabilis</i> (flores) 150 mg.L <sup>-1</sup>	1,22 a	1,27 a	1,49 b	1,14 b	3,39 b
<i>Bougainvillea spectabilis</i> (flores) 300 mg.L <sup>-1</sup>	1,23 a	1,25 a	1,18 b	0,99 b	3,46 b
CV (%)	12,08	15,49	42,12	30,18	11,33

No presente estudo, embora os efeitos observados não tenham sido tão pronunciados quanto os causados pelo BAP, os resultados indicam a presença de substâncias que podem influenciar o crescimento de plântulas de mini-roseira. No entanto, há a necessidade de se realizar novas pesquisas para averiguar o efeito de outras concentrações desses extratos no desenvolvimento das mini-roseiras.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, M.; BAKER, D. A. Identification and quantification of the major endogenous cytokinins in pistachio seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 351-357, Nov. 2000.
- CROCOMO, O. J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brasil. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., 1990, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 1986. p. 53-71.
- CUTLER, H. G. Advances in the use of brassinosteroids. **Natural and Engineered Pest Management Agents Acs Symposium Series**, Washington, v. 551, p. 85-102, 1994.
- DEBERGH, P.; CZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. 484 p.
- DUBOIS, L. A. M.; ROGGEMANS, J.; SOYEURT, G.; DEVRIES, D. P. Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated in vitro and in vivo by softwood cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 35, n. 3/4, p. 293-299, June 1988.
- ERNST, D.; SCHAFFER, W.; OESTERHELT, D. Isolation and identification of a new, naturally-occurring cytokinin (6-benzylaminopurineriboside) from an anise cell-culture (*Pimpinella anisum* L.). **Planta**, New York, v. 159, n. 3, p. 222-225, Nov. 1983.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/CNPq, 1998. p. 183-260.

- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **Instituto Brasileiro de Floricultura**. Disponível em: <http://www.ibraflor.com.br>. Acesso em: 14 jul. 2005.
- JONES, L. H.; HANKE, D. E.; EEUWENS C. J. An evaluation of the role of cytokinins in the development of abnormal inflorescences in oil palms (*Elaeis-guineensis* Jacq) regenerated from tissue-culture. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 14, n. 3, p. 135-142, 1995.
- LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.
- MARINO, G.; HERNANDEZ, M.; LUCCHI, A.; ROMBOLA, A. Responses of in vitro cultured kiwifruit shoots to treatments with green amaranth aqueous extracts. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 79, n. 5, p. 759-763, Sept. 2004.
- MARQUES, D. A. **Influência de fitorreguladores e fontes de nitrogênio na morfogenese “in vitro” de *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Tzvelev cv. Amarelo**. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1996.
- MISAWA, M. **Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites**. Toronto: FAO, 1994. 87 p.
- MITHILA, J.; HALL, J. C.; VICTOR, J. M. R.; SAXENA, P. K. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, n. 5, p. 408-414, Jan. 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Meios de cultura, cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.
- SAENZ, L.; JONES, L. H.; OROPEZA, C.; VLACIL, D.; STRNAD, M. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 205-215, Mar. 2003.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 502-512, 1974.
- STRNAD, M.; HANUS, J.; VANEK, T.; KAMINEK, M.; BALLANTINE, J. A.; FUSSELL, B.; HANKE, D. E. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench, cv Robusta). **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 213-218, May 1997.
- STRNAD, M.; PETERS, W.; BECK, E.; KAMINEK, M. Immunodetection and identification of N(6)-(O-hydroxybenzylamino) purine as a naturally-occurring cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv Robusta leaves. **Plant Physiology**, Washington, v. 99, n. 1, p. 74-80, May 1992.
- SUZUKI, T.; TOMITA-YOKOTANI, K.; TSUBURA, H.; YOSHIDA, S.; KUSAKABE, I.; YAMADA, K.; MIKI, Y.; HASEGAWA, K. Plant growth-promoting oligosaccharides produced from tomato waste. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 91-96, Jan. 2002.