

## COMUNICAÇÃO

### ÁCIDO GIBERÉLICO (GA<sub>3</sub>) E 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE MACELA [*Egletes viscosa* (L.) Less.]

JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ<sup>1</sup>

JACQUELINE LEITE ALMEIDA<sup>2</sup>

ANA LUISA DE ANDRADE TEIXEIRA<sup>3</sup>

EDNARDO SOUZA GOMES<sup>4</sup>

FERNANDO FELIPE FERREYRA HERNANDEZ<sup>5</sup>

**RESUMO** – A micropropagação é uma ferramenta promissora que pode ser utilizada para propagação e preservação de muitas espécies de plantas medicinais que vêm sendo exploradas de forma indiscriminada e que estão em vias de extinção. Conduziu-se este trabalho com o objetivo de induzir o crescimento *in vitro* de brotações de macela, em meio de cultura MS com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 0,1 e 0,5 mgL<sup>-1</sup>) e BAP (0; 1 e 2 mgL<sup>-1</sup>). Foram utilizadas brotações de macela com diâmetro médio de 1,5 cm, retiradas de plantas preestabelecidas *in vitro*, inoculadas em frascos contendo 40 ml do meio de cultura e mantidas em sala de

crescimento com temperatura média de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa em torno de 2000 lux fornecida por lâmpada tipo fluorescente branca fria. Utilizou-se como delineamento experimental um fatorial 3 x 3, num total de nove tratamentos com 15 explantes por tratamento. Aos 30 dias, verificou-se o maior crescimento em altura das plantas, no tratamento com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> na ausência de BAP. O maior número de brotações ou crescimento em diâmetro foi observado com maiores concentrações dos reguladores. Porém, na presença dos reguladores ocorreu um maior número de plantas com folhas hiperhídricas e malformadas.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Cultura de tecidos, proliferação, reguladores de crescimento.

### GIBERELIC ACID AND 6-BENZILAMINOPURINE ON *IN VITRO* GROWTH OF MACELA [*Egletes viscosa* (L.) Less.]

**ABSTRACT** – Micropropagation is a promising tool that can be utilized for propagation and preservation of many medicinal species that are being explored in an indiscriminated form and are under the risk of extinction. This work had as an objective to induce the growth *in vitro* of macela clusters in MS culture medium with different concentrations of GA<sub>3</sub> (0, 0.1 and 0.5 mgL<sup>-1</sup>) and BAP (0, 1.0 and 2.0 mgL<sup>-1</sup>). Macela clusters or buddings with 1.5 cm of average diameter obtained from *in vitro* established plants were inoculated in glass containing 40ml of culture medium

and kept in a growing room with light (2000 lux) supplied by cool white fluorescent lamps for 16 hours daily at 26 ± 1°C. The experiment design was 3 x 3 factorial using a total of nine treatments with 15 explants each. On the 30th day, the highest plant was observed in the treatment with 0.5 mgL<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> in the absence of BAP. The greatest number of buddings or diameter growing was observed in the highest levels of growing regulators. However in the presence of growing regulators there was a great number of ill-shaped and vitrified leaves.

**INDEX TERMS:** Tissue culture, proliferation, growth regulators.

1. Engenheiro Agrônomo, Dra., Pesquisadora do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Caixa Postal 12.168, – 60.356-001, Fortaleza, CE. dndiniz@ufc.br
2. Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Pesquisadora do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC).
3. Bolsista do PET/Agronomia. UFC, Fortaleza, CE.
4. Estudante de Agronomia. UFC, Fortaleza, CE.
5. Professor Titular, Departamento de Ciências do Solo-CCA/UFC.

O Brasil possui o maior patrimônio de diversidade genética vegetal do planeta, porém investe pouco nas pesquisas em bioquímica, genética e fisiologia referentes às plantas medicinais, e as reservas naturais estão sendo sistematicamente destruídas e milhares de espécies estão se extinguindo antes de serem pesquisadas. Além disso, os altos custos de importação fazem com que se tenha a necessidade de buscar soluções próprias para o desenvolvimento de tecnologias farmacêuticas (Costa, 1995).

Considerando o universo de espécies medicinais de intenso uso no Brasil, pode-se destacar a importância do emprego da macela (*Egletes viscosa*) na medicina popular como antiespasmódica, anti-diarréica, protetora do estômago e com atividade antiviral. No entanto, sua disponibilidade, pela forma como vem sendo explorada como matéria-prima para fitoterápicos, é preocupante, pois ainda não se sabe ao certo como cultivá-la. Seus capítulos florais são coletados de plantas silvestres quando a maioria deles mudou de cor pelo amadurecimento, além da colheita indiscriminada das inflorescências, que tem impedido sua dispersão natural (Ikuta, 1993; Matos, 1998).

As informações científico-agronômicas sobre plantas medicinais crescem em ritmo lento, havendo carência de resultados de pesquisa sobre métodos de propagação e técnicas de cultivo que possam resultar em maior produção de biomassa e ainda garantir a perpetuação da espécie (Madueño-Box, 1973; Pavarino, 1995).

A micropropagação, entre outras técnicas da cultura de tecidos de plantas, tem proporcionado a obtenção de um grande número de plantas com elevado nível qualitativo. Mais especificamente, tem permitido a eliminação, em curto espaço de tempo, de víruses do material vegetativo, proporcionando melhores benefícios aos produtores, com conseqüente aumento na produtividade (Nehra et al., 1990; Grattapaglia & Machado, 1998). É uma técnica que vem sendo utilizada para a propagação rápida de espécies que levam longo tempo para germinar, possuem baixa taxa de frutificação e que estão em via de extinção. Atualmente, muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*. Por meio da biotecnologia, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (Bajaj et al., 1988; Miachir, 1992).

Para a cultura da macela, já existem na literatura alguns relatos de trabalhos feitos com o objetivo de utilizar o método da micropropagação na sua multiplicação. O meio de cultura MS, em relação à metade dos macro e micronutrientes (MS/2), favoreceu o desenvolvimento de segmentos nodais de macela em meio sólido e de

ápices caulinares em meio líquido (Ikuta, 1998). Trabalhando com *Egletes viscosa*, Abreu & Trevisan (1999) verificaram que o meio com ácido naftalenoacético (ANA) e BAP proporcionou melhor desenvolvimento da parte aérea em segmentos de internódios, principalmente com baixas concentrações de auxina. Para induzir a organogênese em calos de *Egletes viscosa*, Almeida et al. (2001) verificaram apenas a formação de raízes e que essa foi favorecida pela ausência de luz. Na presença de BAP, houve uma redução no número de explantes com raízes, porém concentrações mais altas de sacarose favoreceram o aumento no número de explantes com raízes, na presença de luz. Com relação ao tamanho dos calos, esses autores verificaram o maior aumento médio no diâmetro e maior crescimento em altura, na presença de luz e, quando acrescentaram o BAP, houve um aumento correspondente no crescimento, tanto na presença como na ausência de luz.

Com o presente trabalho, objetivou-se induzir o crescimento *in vitro* de brotações de macela em meio de cultura com diferentes concentrações de ácido giberélico e de 6-benzilaminopurina, a fim de facilitar os processos de enraizamento e aclimação.

Gemas axilares de macela-da-terra (*Egletes viscosa*) foram coletadas de plantas cultivadas em vasos em casa-de-vegetação, tratadas assepticamente com hipoclorito de sódio (2,5%) durante 10 minutos, estabelecidas em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) (MS) com 2 mgL<sup>-1</sup> de BAP e subcultivadas no mesmo meio de estabelecimento, para a formação de novas brotações. As brotações obtidas foram subdivididas em segmentos com diâmetro médio de 1,5 cm e inoculadas em frascos com capacidade para 250 ml contendo 40 ml do meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP (0, 1 e 2 mgL<sup>-1</sup>) e de GA<sub>3</sub> (0; 0,1 e 0,5 mgL<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1, após a adição dos reguladores de crescimento e feita a esterilização em autoclave (121°C durante 15 minutos). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura média de 26 ± 1°C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa em torno de 2.000 lux, proveniente de luz fluorescente branca fria.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em um fatorial 3 x 3, totalizando nove tratamentos com 15 explantes cada tratamento. A avaliação do crescimento em altura, diâmetro, número de explantes com raízes e tipo de folhas formadas foi feita aos 30 dias e as médias, comparadas pelo teste de Tukey (1% de probabilidade).

Independentemente das concentrações de BAP, o maior crescimento em altura das plantas de macela foi

observado quando se acrescentou concentrações crescentes de GA<sub>3</sub> (Figura 1), o que foi observado também por Corrêa et al. (1991) e Luz et al. (1994) no cultivo *in vitro* de macieira e mandioquinha-salsa, respectivamente. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o efeito mais conhecido das giberelinas *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando essas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho, como foi o caso da macela. A maior concentração de GA<sub>3</sub> utilizada (0,5 mgL<sup>-1</sup>) proporcionou um maior crescimento em altura dos explantes, apresentando diferença estatística altamente significativa (1% de probabilidade) em relação aos demais tratamentos.

O maior crescimento em altura das plantas foi observado no tratamento com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> na ausência de BAP. A adição de BAP ao meio de cultura causou redução no crescimento em altura. Com relação ao diâmetro das plantas, de modo geral, verifica-se um efeito inverso ao da altura (Figura 2), ou seja, houve um aumento no diâmetro médio das brotações em detrimento do crescimento em altura quando as concentrações de BAP foram aumentadas. Isso ocorre em razão da inibição da dominância apical, resultando no desenvolvimento de brotações laterais pelo aumento dos níveis de citocinina (Hartmann et al., 1990; Grattapaglia & Machado, 1998). Pasqual et al. (1991) também observaram que a adição do GA<sub>3</sub> ao meio de cultivo, em combinação com BAP e ANA, resultou num aumento significativo do número de brotos por gema na propagação de amoreira-preta.

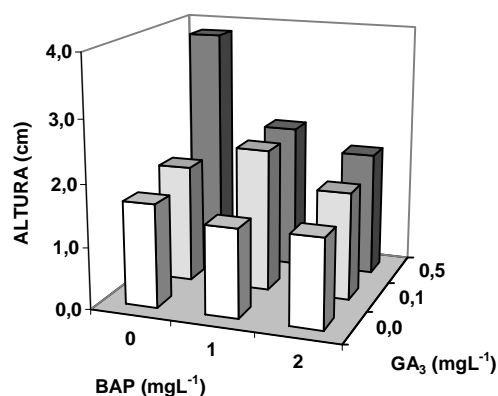
O maior número de plantas com folhas malformadas e hiperhídricas foi observado na presença de BAP e GA<sub>3</sub>, enquanto o menor número de plantas com essa característica foi verificado na ausência dos dois reguladores. Bertolucci et al. (2000), trabalhando com

segmentos nodais de *Tournifortia paniculata*, verificaram que a presença dos reguladores GA<sub>3</sub> e ANA induziu a hiperhidratação e alteração na forma das folhas nos brotos formados. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o excesso de citocinina no meio de cultura causa toxidez que se caracteriza pelo excessivo entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e hiperhidratação generalizada das culturas. Para Bornman & Vogelmann (1984), a hiperhidricidade está inversamente correlacionada com a concentração do ágar, sugerindo que o estado fisiológico do meio de cultura pode afetar a difusão de nutrientes e dos reguladores de crescimento nos tecidos em cultivo.

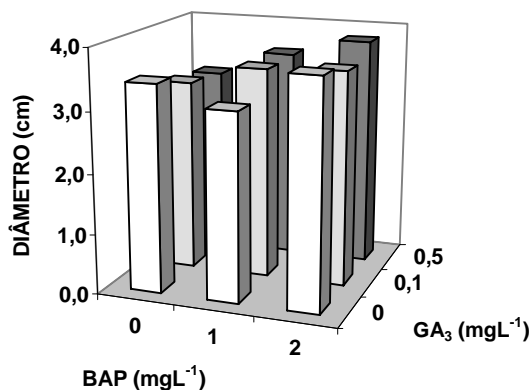
Quanto ao enraizamento, verificou-se um maior número de plantas com raízes quando foram utilizadas concentrações crescentes de GA<sub>3</sub> (Figura 3). Esses resultados concordam com os obtidos por Pasqual et al. (1990), em que o GA<sub>3</sub> aumenta a taxa de enraizamento de plantas. De acordo com Kochba et al. (1974), uma hipótese para explicar o efeito do GA<sub>3</sub> no enraizamento é que esse estimula a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou o desenvolvimento de uma zona radicular já existente. Na presença de BAP, observou-se um efeito contrário, ou seja, houve uma redução no número de explantes com raízes em maiores concentrações desse regulador.

Assim, o maior alongamento das brotações de macela foi obtido no meio de cultura com 0,5 mgL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> na ausência de BAP e o maior número de brotações foi favorecido com maiores concentrações desse regulador.

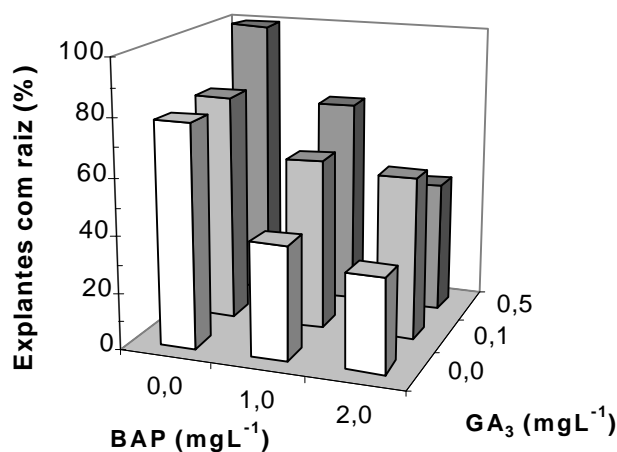
A presença dos reguladores favoreceu o desenvolvimento de plantas com folhas hiperhídricas e malformadas. O GA<sub>3</sub> favoreceu o desenvolvimento de raízes nas brotações de macela.



**FIGURA 1** – Altura de explantes de macela aos 30 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> e de BAP.



**FIGURA 2** – Diâmetro de explantes de macela aos 30 dias de cultivo em meio com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> e de BAP.



**FIGURA 3** – Porcentagem de explantes de macela com raízes aos 30 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com diferentes concentrações de BAP e de GA<sub>3</sub>.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. S. S.; TREVISAN, M. T. S. Iniciação de cultura de células, cultura de partes aéreas e micropropagação de *Egletes viscosa* Less. In: ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 18., 1999, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFC, 1999.
- ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; GOMES, E. S.; BARRETO, A. M. E. Cultivo *in vitro* de calos de macela *Egletes viscosa* (L.) Less., em meio MS com diferentes concentrações de BAP e sacarose. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 52., 2001, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: [s.n.], 2001.
- BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSK, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1988. v. 4, p. 60-103.
- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. Micropropagação de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de**

- Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.
- BORNMAN, C. H.; VOGELMANN, T. C. Effect of rigidity of gel medium on bezyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 61, p. 505-512, 1984.
- CORRÊA, D. M.; PASQUAL, M.; YUI, E. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftaleno acético na propagação *in vitro* da macieira 'Fuji'. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 1, p. 26-31, 1991.
- COSTA, M. P. **Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação**. 1995. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JÚNIOR, F. T. **Plant propagation**. New Jersey: Prentice Hall International, 1990. 647 p.
- IKUTA, A. R. Y. **Estudos sobre propagação de macela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.: compositae**. 1993. 207 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.
- IKUTA, A. R. Y. Estudos sobre propagação de macela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.: compositae. In: MING, G. L. C. (Coord.). **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: UNESP, 1998. v. 1, p. 23-42.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoides by gibberellic acid and adenine sulphate. **Annual Botany**, [S.l.], v. 38, p. 795-802, 1974.
- LUZ, J. M. Q.; PASQUAL, M.; SOUZA, R. J.; NOGUEIRA, A. M. M. Propagação "in vitro" de mandioquinha salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). **Ciência e Prática**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 399-402, 1994.
- MADUEÑO-BOX, M. **Cultivo de plantas medicinales**. 2. ed. Madrid: Aguilar, 1973. 239 p.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220 p.
- MIACHIR, J. I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zeadoaria* Roscoe**. 1992. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEHRA, N. S.; STUSLNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria X Ananassa*). **Plant Science**, Shannon, v. 66, p. 119-126, 1990.
- PAVARINO, M. A. **Viabilidade de mini-estaquia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1995. 12 p.
- PASQUAL, M.; PEIXOTO, H. P. P.; SANTOS, J. C.; PINTO, J. E. B. P. Propagação "in vitro" da amora-preta (*Rubus* sp.) cv ébano: uso de reguladores de crescimento. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-286, 1991.
- PASQUAL, M.; RIBEIRO, V. G.; RAMOS, J. D. Influência do GA<sub>3</sub> e do carvão ativado sobre o enraizamento *in vitro* de embriões de laranja 'natal'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 10, p. 1477-1482, 1990.