

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIA AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS
MEDICINAIS (*Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis*)**

MARIA ALICE ARGÔLO VICENTE

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO – 2008

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS (*Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis*)

MARIA ALICE ARGÔLO VICENTE

Engenheira Agrônoma
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2003

Dissertação submetida ao colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientador: Prof.º Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRARIAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

V632 Vicente, Maria Alice Argôlo.
Multiplicação in vitro e aclimatação de plantas
medicinais (*Vernonia condensata*; *Justicia*
pectoralis.) / Maria Alice Argôlo Vicente. - Cruz das
Almas, BA, 2008.
52 f.; il.: tab.

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida
Dissertação:(Mestrado) – Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias
Ambientais e Biológicas, 2008.

1.Plantas medicinais – cultivo in vitro. 2. Regulador
Vegetal. 3. Alumã – cultivo in vitro. 4. Anador – cultivo in
vitro. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas II.
Título.

CDD 20 ed. 581.134

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^o Dr. Weliton Antonio Bastos de Almeida
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB
(Orientador)

Prof.^a Dr.^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

Dr. Robson Rui Cotrim Duete
Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias
em.....
Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias
em.....

Aos meus pais João Vicente Neto e Vera Lúcia Argôlo Vicente
pelo amor e apoio em todos os momentos, pelo exemplo de vida.

DEDICO

Aos meus amados irmãos João Vicente Júnior e Aloísio Argôlo Vicente
e aos meus queridos sobrinhos João Roberto e Davi.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me abençoado com essa vitória em minha vida.

Aos meus pais Jonga e Vera, por todo o amor dedicado, apoio moral e financeiro, confiança e aprendizado. Pessoas essenciais no incentivo do meu sucesso pessoal e profissional, obrigada por terem apostado em mim.

Aos meus irmãos João Vicente Junior e Aloisio Argôlo Vicente pelo amor e apoio na concretização de meus objetivos de vida.

A minha querida tia Ana Lúcia Argôlo por ter me despertado o interesse em fazer o mestrado.

Ao meu noivo Allan Peixoto Nascimento pelo amor, companheirismo, confiança, paciência e compreensão nos melhores e piores momentos dedicados a essa dissertação de mestrado, obrigada pela força para seguir em frente.

A Maria de Lurdes Peixoto, Adriano Nascimento, Aldo Nascimento e Adriana Nascimento pelo amor, amizade e o apoio, minha segunda família Cruzalmense que mora em meu coração.

Ao Prof^o. Weliton Antonio Bastos de Almeida pela orientação, confiança e amizade, obrigada pelos ensinamentos durante essa importante etapa da minha vida.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A UFRB por ter me dado essa oportunidade única.

A FAMAM pela parceria junto a UFRB para realização desse trabalho.

Ao Prof^o. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho e a Prof^a. Maria Angélica pelo apoio e orientação inicial.

A pesquisadora da EMBRAPA Marilene Fancelli pelo apoio inicial e amizade.

A Robson Rui Cotrim pela co-orientação.

A prof^a. Ana Cristina Fermino pelo apoio e incentivo.

A uma amiga especial e colega de mestrado Zuzinaide Vidal Bomfim, pela amizade, incentivo inicial e dicas durante o curso.

Ao amigo e colega de mestrado Arnaldo Libório pela ajuda inicial nos trabalhos científicos, através dos quais eu consegui alcançar essa vitória.

A todos os amigos e colegas de mestrado. E em especial à Márcio Gil, Candice Brito, Tâmara, Augusto Cezar, Edivânia Vieira, Lauro Lessa, Gean Capinan, Jamile Sousa, Luana Cerqueira e Franklim Soares pela amizade.

Aos colegas de laboratório Fabíola Rebouças, Zuleide Carvalho, Fabiana Moraes e Jonas Cavalcante pela ajuda nos trabalhos.

As bibliotecárias Isaelce e Márcia pela ajuda nas correções.

Aos funcionários Sidinha e Til pela dedicação e disposição em ajudar.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ALUMÃ (<i>Vernonia condensata</i> Baker).....	19
Capítulo 2	
MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ANADOR (<i>Justicia pectoralis</i> Jack.).....	34
Capítulo 3	
ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE ALUMÃ (<i>Vernonia condensata</i> Baker) E ANADOR (<i>Justicia pectoralis</i> Jack.).....	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

(*Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis*)

Autora: Maria Alice Argôlo Vicente.

Orientador: Weliton Antonio Bastos de Almeida

RESUMO: Atualmente existe a possibilidade de micropropagação de muitas espécies medicinais. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta que permite aumentar a taxa de multiplicação dessas espécies em curto espaço de tempo. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi desenvolver procedimentos que permitissem a regeneração *in vitro* de plantas de *Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis* a partir de gemas axilares. As gemas axilares retiradas de plantas de alumã e anador foram devidamente desinfestadas e em seguida introduzidas em meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg. L⁻¹). Avaliou-se o número de brotos por explante e a percentagem de explantes responsivos. Após 45 dias de cultivo *in vitro*, observou-se que a maior taxa de explantes responsivos para o alumã foi de 84,0 % com a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 76,7% para o anador com 2,0 mg L⁻¹ de BAP. A concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP induziu o maior número de brotações, 4,0 e 6,0 respectivamente para o alumã e anador. Os brotos obtidos foram transferidos para meio de alongamento e enraizamento, MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ GA₃ e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado por 30 dias. Em relação aos brotos de anador em meio de enraizamento foram testadas concentrações de IBA (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg. L⁻¹). Após 75 dias, avaliou-se comprimento da raiz principal, altura da planta e o número de folhas. As variáveis analisadas não apresentaram diferenças significativas quando se testou as distintas concentrações de BAP associadas ao GA₃ ou IBA. A aclimação resultou na sobrevivência de 100% das plantas. Tais resultados comprovam que nas condições testadas, o desenvolvimento e a aclimação das plantas de alumã e anador são considerados satisfatórios.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, gemas axilares, reguladores vegetais.

IN VITRO MULTIPLICATION AND ACCLIMATATION OF MEDICINAL PLANTS

(*Vernonia condensata* Baker and *Justicia pectoralis* Jack)

Author: Maria Alice Argôlo Vicente.

Adviser: Weliton Antonio Bastos de Almeida

ABSTRACT: Currently there is a possibility of micropropagate many species of medicinal plants. The *in vitro* cultivation method allows increase the plants multiplication rate in a short period of time. In this regards, the present study aimed to develop procedures for the regeneration of *in vitro* plants of alumã (*Vernonia condensata* Baker) and anador (*Justicia pectoralis* Jack) from axillary buds. The axillar buds from alumã and anador were removed and sterilized, put into a MS medium supplemented with BAP (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg.L⁻¹). The number of shoots/explant and the percentage of responsive explants were evaluated. After 45 days of *in vitro* culture, it was observed that the higher rate of responsive explants to the alumã was 84.0% with a concentration of 1.0 mg L⁻¹ of BAP and 76.7% for anador with 2, 0 mg L⁻¹ of BAP. The largest number of shoots / explant for both plants occurred in the concentration of 1.0 mg L⁻¹ of BAP with 4.0 for alumã and 6.0 for anador. The shoots were transferred to a medium of elongation and rooting, MS containing 1.0 mg L⁻¹ GA₃ and 1.0 g L⁻¹ activated charcoal for 30 days. For anador shoots, in the medim of rooting, were tested concentrations of IBA (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg. L⁻¹). After 75 days, it was evaluated the main root length, plant height and number of leaves. The variables showed no significant differences when they tested the different concentrations of BAP associated with GA₃ or IBA. The acclimation resulted in 100% survival of plants. These results show that under the conditions tested, the development and acclimation of alumã and anador plants are satisfactory.

Key words: *in vitro* cultivation, axillar buds, medicinal plants, BAP

INTRODUÇÃO

A prática terapêutica com plantas vem ultrapassando todas as barreiras e obstáculos, durante o processo evolutivo do homem. As primeiras civilizações cedo se aperceberam da existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (CUNHA, 2006).

O cultivo de plantas medicinais no Brasil ainda é muito incipiente e as espécies vegetais de interesse medicinal são coletadas, na maioria das vezes, sem a identificação correta da espécie e suas variedades e, muito menos, a época ideal de coleta (BACCHI, 1996). Nos últimos dez anos, as plantas medicinais vêm despertando o interesse da comunidade científica brasileira. Porém, as informações científico-agronômicas sobre elas 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).

O consumo de cosméticos e medicamentos elaborados a partir de produtos naturais tem crescido nos últimos anos, e isso tem estimulado empresas a investir 10% de seus recursos financeiros em pesquisas com novas substâncias de origem vegetal (NADER & MATEO, 1998). A utilização de plantas medicinais tem recebido incentivos da própria Organização Mundial de Saúde (OMS). São muitos os fatores, principalmente econômicos e sociais, que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais.

Dados da OMS mostram que cerca de 80% da população mundial fez o uso de algum tipo de erva, seus extratos vegetais ou seus princípios ativos na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável (IUCN, 1993).

Os pequenos produtores rurais também começaram a lucrar com a ampliação do mercado das espécies medicinais. Segundo Gomarra (2005), todas as espécies cultivadas possuem as mesmas propriedades de princípio ativo, matéria-prima do medicamento, por serem selecionadas e padronizadas, garantindo um produto final de melhor qualidade ao contrário das plantas extraídas da mata.

Segundo Verpoorte et. al. (1988), mais de 100.000 compostos secundários de plantas já foram isolados e identificados, e a cada ano centenas de novas descobertas tem aumentado esse número. Esses compostos são consumidos por nós diariamente, na forma de dentifrícios, sabonetes, perfumes ou mesmo ingeridos em alguns alimentos, condimentos, chás, xaropes etc.

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente o que as legitimizam como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade. Estima-se ainda que o consumo de produtos fitoterápicos em todo o mundo irá triplicar nos próximos vinte anos (GRÜNWALD, 1997). Porém, a exploração ilegal das culturas medicinais prejudica o desenvolvimento de medicamentos utilizando os elementos tradicionais.

Montanari Junior (2002) assinala que, como consequência da revalorização mundial do uso de plantas medicinais, a pressão ecológica exercida sobre alguns desses recursos naturais tem sido grande nos últimos anos. Acrescenta ainda que o valor econômico dessas plantas põe em perigo a sobrevivência de muitas espécies medicinais nativas.

Devido essa grande demanda, muitos produtores têm se aventurado no cultivo de plantas medicinais, porém poucos estão obtendo êxito. Há falta de informações a respeito das técnicas de cultivo de cada região, uma vez que algumas das espécies hoje cultivadas no Brasil foram trazidas de outros países. Por essa razão torna-se necessário estudar o comportamento dessas espécies perante as práticas agrônômicas, por meio da domesticação e do cultivo (CHAVES et al., 2002), principalmente na região Nordeste, evidenciando a necessidade de estudos agrônômicos de espécies com potencial medicinal.

Alumã

A espécie *Vernonia condensata* Baker pertencente à família Asteraceae, nativa possivelmente da África tropical e trazida ao Brasil nos tempos coloniais pelos escravos (LORENZI & MATOS, 2002). Esta família consiste de aproximadamente 25000 espécies, incluída em mais de 1100 gêneros. (BARROSO, 1986). Estas espécies frequentemente apresentam hábitos herbáceos, embora arbóreos e hábitos herbáceos variados também ocorrem. (CRONQUIST, 1981). Devido a esta variedade de hábitos, a família apresenta várias estruturas anatômicas e pode ocorrer especialização em alguns processos ecológicos. Estruturas secretoras são de grande interesse taxonômico e sua restrita distribuição tem um importante valor diagnóstico (Metcalf & Chalk, citados por MILAN et al, 2006).

Os compostos secretados nessas estruturas podem ser utilizados na fabricação de óleos essenciais, ou podem possuir propriedades repelentes que dão à planta resistência contra insetos herbívoros. Frequentemente, em Asteraceae, essas estruturas ocupam posições distintas em diferentes órgãos da planta ocorrendo em todos, alguns ou em apenas um órgão (Solereder, citado por MILAN et al, 2006).

Em estudos feitos das características anatômicas das folhas Milan et al., (2006) observaram que a espécie *Vernonia condensata* não apresenta essas estruturas secretoras. De acordo com Metcalfe & Chalk, citado por Milan et al, (2006) essa diversidade anatômica é comumente observada na estrutura de folhas de espécies pertencente à Asteraceae.

A família Asteraceae é cosmopolita, estando mais bem representada nas regiões temperadas e subtropicais (CRONQUIST, 1988). A espécie *Vernonia condensata* é conhecida popularmente como alumã, boldo da Bahia, figatil e assa peixe. Está amplamente distribuída nos estados Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. O alumã é um arbusto alto, muito ramificado, atingindo até 5m de altura; de folhas alternas, alongadas ou lanceoladas; possui flores esbranquiçadas, reunidas em capítulos terminais, apresentando crescimento rápido (CARRICONDE et al., 1996).

Segundo Ribeiro & Diniz (2006), a espécie *Vernonia condensata* é perene e tropical, adapta-se às regiões subtropicais não sujeitas as geadas intensas, desenvolve-se a sol pleno, exige baixa irrigação, solo profundo com fertilidade de baixa para média, propaga-se por estacas de ramos mais novos.

Muitas espécies de Asteraceae são utilizadas como plantas medicinais, com variadas indicações terapêuticas, preparos e utilizações (FREIRE & ESTRELLA, 1999). As folhas de *Vernonia condensata* são utilizadas na preparação de infusões, ou então maceradas para preparação de "sumos". Estes são analgésicos usados para o tratamento de cefaléias de origem digestiva, possuindo ainda, ação citoprotetora da mucosa gastrintestinal (SILVA, et al., 1995). O que está de acordo também com Boorhem (1999).

O gênero *Vernonia* é frequentemente citado em levantamentos de plantas usadas em medicina popular, mas, apenas cerca de 15% das espécies foram estudadas quimicamente.

Em estudos realizados para analisar as propriedades terapêuticas da espécie *Vernonia condensata*, Valverde et al. (2001) observaram que o composto Vernonioside B2, isolado do extrato metanólico da planta também apresentou atividade analgésica e antiinflamatória em análises pré-clínicas. Frutuoso et al., (1994) também observaram que o extrato aquoso bruto apresentou atividade analgésica e anti-ulcerogênica em testes com animais. Monteiro et al., (2001) em estudos pré-clínicos indicam que o extrato aquoso possui baixa toxicidade e não apresenta riscos mutagênicos ou teratogênicos.

Anador

A espécie *Justicia pectoralis* Jacq. ocorre naturalmente nas América do Sul, do Norte, Central e Tropical, no Oeste da África e no Oeste da Índia (LEONARD & MORTON, citados por BARROS, 1992). Esta espécie pertencente à família Acanthaceae Juss., subfamília Acanthoideae Lindau, a qual compreende 250 gêneros e 2.700 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o planeta (JOLY, 1993). *Justicia* L. é o gênero mais numeroso dessa família (DURKEE, 1986), com 600 espécies, entre ervas e arbustos, com distribuição em regiões temperadas e subtropicais (MABBERLY, 1997).

No Brasil, ocorre espontaneamente no estado do Amazonas, território de Roraima, em margem de rios e em florestas secundárias (SCHULTES, 1978). Encontra-se amplamente cultivada, nas regiões Norte e Nordeste, especialmente em aldeias indígenas (SCHULTES, 1978; BARROS, 1992; LINO et al., 1997).

Espécies do gênero *Justicia* por apresentarem semelhanças morfológicas entre si, compartilham alguns nomes populares e indicações fitoterápicas. Dentre os nomes populares epítetos, chambá e anador são os mais empregados no Nordeste para *J. pectoralis* (BARROS, 1992).

Decoctos ou infusões das folhas dessa espécie são utilizadas com fins analgésicos e antiinflamatórios (OLIVEIRA, 1995). Métodos cromatográficos e espectométricos de alta resolução já foram utilizados para investigar os constituintes de *Justicia pectoralis* (MACRAE & TOWERS 1984; DE VRIES et al., 1988). Segundo Oliveira et al. (2000) duas cumarinas, 1-2 benzopirona umbeliferona foram os principais constituintes identificados na infusão metanólica foliar de *J. pectoralis*. Essas duas cumarinas são amplamente referidas na literatura, as quais são citadas como os mais prováveis constituintes bioativos da espécie (MACRAE & TOWERS, 1984; DE VRIES et al., 1988; SCHULTES, 1990; BARROS et al., 1997; LEAL et al., 2000).

A ocorrência de cumarinas em Acanthaceae é restrita a poucas espécies, *Justicia pectoralis* constitui no único representante do gênero *Justicia*, até o presente, a possuir tais substâncias. (MURRAY et al., 1982). Estudos feitos por Oliveira et al,

(2000) afirmam que a presença majoritária de cumarinas no infuso foliar de *J. pectoralis* reforça o uso popular dessa espécie como analgésica e antiinflamatória.

Os princípios ativos presentes nas plantas medicinais são produtos do metabolismo secundário, cujo mecanismo de regulação depende do controle genético inerente a cada espécie e de estímulos externos proporcionados pelo ambiente (MARTINS et al., 1995). Dentre os fatores ambientais, a exposição à luz solar direta, proporciona uma maior concentração de cumarinas totais em *J. pectoralis* (BARROS, 1992).

Segundo Dixon & Paiva (1995) a produção de cumarinas nessa espécie pode ser induzida pelo ataque de herbívoros, microorganismos (MANN, 1987), sendo também liberadas pelas raízes, exercendo efeito alelopático sobre plantas vizinhas (MELO & ANDRADE, 1989), demonstrando que sua produção na planta tem caráter defensivo.

As espécies medicinais apresentam periodicidade na produção dos princípios ativos diante das variações ambientais (MARTINS, et al., 1995). Em estudos realizados por Barros (1992), observou-se um aumento no conteúdo de cumarina, em *J. pectoralis* quando crescidas em solo adubado com matéria orgânica.

O estresse nutricional pode acarretar em maior ou menor produção de fármacos na planta. A deficiência de fósforo no solo reduz a concentração de cumarinas em *J. pectoralis*, com uma significativa redução na produção de biomassa, com a conseqüente diminuição da produção total do princípio ativo (MARTINS et al., 1995).

Apesar do grande uso de plantas de alumã e anador, especialmente na região Nordeste, essas ainda carecem de muitas informações agrônomo-científicas principalmente com relação a métodos de propagação e técnicas de cultivo. Entretanto, 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).

Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetal tem sido considerada ferramenta promissora para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 1998).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos vegetais e a de maior impacto (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo George & Sherrington (1984), a produção de mudas através da micropropagação apresenta uma série de vantagens sobre os métodos tradicionais. A técnica proporciona a obtenção de um grande número de plantas em curto espaço de tempo, com alta qualidade genética e fitossanitária em qualquer época do ano, mais especificamente, tem permitido a eliminação, em curto espaço de tempo, de viroses do material vegetativo, proporcionando melhores benefícios aos produtores, com conseqüente aumento na produtividade (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A aplicação da micropropagação destaca-se também pela hibridização e desenvolvimento de novas cultivares, na recuperação de substâncias farmacêuticas, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação, e como auxiliar na salvaguarda do patrimônio genético de plantas ameaçadas pela exploração humana (SIMÕES, 1988).

O emprego das técnicas biotecnológicas se constitui ferramenta bastante útil para a reprodução de exemplares com propriedades desejáveis (FRANÇA, 2001). A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários autores (PINTO et al., 1994; LAMEIRA, 1997) e incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente. (KAJIKI, 1996).

O cultivo de gemas axilares resulta num dos métodos de multiplicação *in vitro* mais facilmente utilizados e mais seguros para obtenção de “cópias uniformes ou semelhantes”, isentas de variações indesejáveis (PIERIK, 1990).

Para a proliferação de gemas axilares *in vitro*, utiliza-se como explantes iniciais o meristema propriamente dito, os qual é vantajoso por apresentar um broto dormente que já está diferenciado *in vivo*. Desta forma, o estabelecimento de uma planta completa requer somente alongamento e diferenciação de raízes. Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (DEBERGH & READ, 1991), uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal.

Vários fatores podem influenciar no potencial regenerativo de uma espécie, como o genótipo utilizado, os tipos e dosagens de reguladores vegetais, os tipos e tamanhos de explantes, os meios de cultura utilizados e as condições de cultivo (BERED et al., 1998).

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas. Assim, ao se excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001). Além disso, o estabelecimento *in vitro* de espécies vegetais também apresenta algumas limitações, tais como problemas com oxidação de explantes e/ou contaminação por fungos ou bactérias. A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescente de essências nativas, especialmente das tropicais, que contêm alta concentração desses componentes (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Os compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; GUERRA, 1989). Uma das possibilidades técnicas para reduzir esse problema inclui a lavagem em água corrente, dos explantes coletados antes da desinfestação, auxiliando a lixiviação de compostos fenólicos. Já o nível de contaminação é muito depende do material

vegetal utilizado para isolamento *in vitro*, que pode ser de casa de vegetação ou do campo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a adição de reguladores vegetais ao meio de cultura tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz.

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. Não há uma formulação-padrão, mas o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com suas modificações e diluições, tem sido utilizado com sucesso para diversas espécies. Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas), que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*.

Uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade quase absoluta de controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Isso não seria possível sem a adição dos reguladores vegetais ao meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado (PASQUAL, 2001).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores vegetais existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Várias são as modalidades de padrão morfogenético *in vitro*, podendo ser por via direta, com desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, como a cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese (CALDAS, 1996).

As citocininas são reguladores vegetais que desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as citocininas são indispensáveis para a quebra de

dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que tem apresentado os melhores resultados no estabelecimento *in vitro* de explantes (HU & WANG, 1983; ALMEIDA et al., 1997).

As auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura (HU & WANG, 1983). Para a indução de raízes *in vitro*, geralmente, os meios de cultura são acrescidos de diferentes tipos e concentrações de auxinas, sendo estas as variáveis que mais influenciam no sucesso do enraizamento (ROCHA, 2006). Entre as auxinas mais usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) (RADMANN, 2002).

A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos são regulados pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores vegetais (SKOOG & MILLER, 1957).

Assim, elevadas concentrações de citocininas e baixas de auxinas induzem, predominantemente, a formação de gemas em detrimento da formação de raízes e calos e vice-versa. Quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre a formação de calo (células desdiferenciadas) na base do explante comprometendo o crescimento da parte aérea e a rizogênese (SOUZA & JUNGHANS, 2006).

A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionada ao meio. O ápice meristemático é uma estrutura organizada, que pode desenvolver-se diretamente da parte aérea em meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo (TORRES et al., 1998).

Outra classe de regulador vegetal utilizada no cultivo *in vitro* são as giberelinas. 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.

Na fase de enraizamento *in vitro*, a formação de raízes em várias espécies tem sido beneficiada pelo uso de carvão ativado. Segundo Souza & Junghans (2006) o carvão reduz a disponibilidade de luz no meio de cultura e ajuda a remover inibidores da rizogênese, pela absorção de uma série de substâncias adicionadas ao meio, liberadas pelos explantes ou presente no ágar.

Os componentes presentes no meio de cultura também exercem influência sobre o enraizamento dos brotos. Altas concentrações de macronutrientes tendem a inibir o enraizamento. Concentrações de sais no meio diminuídas para 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitam melhor enraizamento (HU & WANG, 1983).

Uma etapa importante da micropropagação que inspira cuidado é a aclimatação, devido à dificuldade de transferir com sucesso plantas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e posteriormente para o campo (FRÁGUAS, 2003). A aclimatação é constituída de duas etapas: enraizamento (*in vitro* e *in vivo*) e transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas (DUNSTAN & TURNER, 1984).

A elevada umidade relativa e a baixa irradiância no ambiente *in vitro* são os principais fatores que atuam na indução de alterações e funcionalidade de órgãos e tecidos, levando-os à incapacidade de controlar as perdas de água quando são submetidos a condições adversas, como o ambiente natural (PREECE & SUTTER 1991). Brainerd & Fuchigami (1981) relatam a necessidade de aclimatação das plantas provenientes da cultura *in vitro*, em virtude de serem mais sensíveis e tenras, pois não desenvolvem a cutícula, resultando em alta evapotranspiração.

Segundo Hararika (2003) um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo. Por esse motivo, torna-se necessária uma gradual aclimatação, a fim de que as plantas sobrevivam quando transferidas para diferente condição ambiental. Para Hoffmann, (2002) o sucesso da transferência de plantas micropropagadas para a casa de vegetação é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido.

A necessidade de reposição de espécies medicinais com expressivo potencial é amplamente reconhecida, embora exista pouco relato na literatura sobre a

propagação vegetativa de *Vernonia condensata* Baker e *Justicia pectoralis* Jacq. Assim, o objetivo deste trabalho foi multiplicar *in vitro* essas plantas e estabelecer um sistema eficiente de aclimação que assegure a sobrevivência das microplantas obtidas no processo.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 101f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFL, Lavras, 1998.
- ALMEIDA, W. A. B. de; MATOS, A. P. de; SOUZA, A. da S. Effects of benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* proliferation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.425, p. 235-250, 1997.
- BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. p.169-185.
- 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.
- BARROS, R. F. M. **Efeito da radiação solar sobre o crescimento e produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* var. *Stenophylla* Leonard**. 1992. 156f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1992.
- BARROS, R. F. M., ANDRADE, L. H. C., DA SILVA, N. H. Coumarin concentration in leaves of *Justicia pectoralis* var. *Stenophylla* Leonard with different pigmentation. **Phyton**, Buenos Aires, Argentina, v. 60, p. 141-145, 1997.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, c1986.
- BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, p.1827-1833, 1998.
- BOORHEM, R. L. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999. 416 p.
- BRAINERD, K. E.; FUCCHIGAMI, L. O. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.107, n.5, p.515-518, 1981.
- CALDAS, L. S. Micropropagação de plantas do cerrado. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1996, Nova Friburgo. **Anais...** Nova Friburgo, RJ.: Sociedade Brasileira de Botânica, 1996, 22 p.

CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais e plantas alimentícias**. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular, Universidade Federal de Pernambuco, 1996. 153 p.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte**. 2002. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UNESP, Botucatu, 2002.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. Columbia: University Press, 1981.

CRONQUIST, A. **The classification of flowering plants**. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555 p.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes e fitoterapia**. ESALQ-USP: 2006. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2007.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p.1-13.

DE VRIES, J. X.; TAUCHER, B.; WURZEL, G. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. 2. Gás chromatography/ mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acids and their hydroxyl and methoxy derivatives. **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, v.15, p.413-417, 1988.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, v.7 p. 1085-1097, 1995.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and applications**. Orlando: Academic, 1984. v. 1, p.123-129.

DURKEE, L. H. Flora Costaricensis: Acanthaceae. **Fieldiana Botany**, New Series, v.18, n.1 p.87, 1986.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo-de-Valinhos' em diferentes ambientes**. 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFL, Lavras, 2003.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. Porto Alegre; UFRGS: Florianópolis: UFSC, 2001. p.105 -124.

FREIRE, S.; ESTRELLA, U. Medicinal Compositae of the Pampean biogeographic province: key for the identification of taxa and illustrations. Part II. Compositae with isomorphic florets and capillary bristles pappus (group 3). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 18, n. 4, p. 283 -294, 1999.

FRUTUOSO, V. S., et al. A Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensate*. **Planta Medica**, v. 60, n.1, p. 21-25,1994.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. England: Exegetic, 1984, 709 p.

GOMARRA, F. de L. **Validação de plantas medicinais boas práticas de cultivo e manipulação legislação para fitoterápicos**, 2005. Apostila.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, 1998, v. 1, p. 183-260.

GRÜNWARD, J. The market situation and marketing of herbal medicinal products (HMP) in Europe. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2. 1997, Mendoza (Argentina). **Abstracts...** Buenos Aires: CMAP/ISHS/SAIPA, 1997.

GUERRA, M. P. **Embriogênese somática em *Euterpe edulis* Mart. (Palmae)**. 1989. 202 f. 1989. Tese (Doutorado em Botânica) - UNESP, São Paulo, 1989.

HARARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.21-24, 2002.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMARA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983, p. 117-227.

THE INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **Guidelines on the conservation of medicinal plants**. Gland: Switzerland, 1993. 50 p.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1993. 777p.

KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ, Piracicaba, 1996.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de rescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva – baleeira (*Cordia verbenaceae* L.)**. 1997. 88 f. Tese (Doutorado) – UFL, Lavras, 1997.

LEAL, L. K. A. M. et al. Antinociceptive antiinflammatory and bronchodilatador activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, RJ, v.70, p. 151-159, 2000.

LINO, S. C. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, v.11, n. 3, p. 211-215, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v.13, p. 382-383.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858p.

MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use as a Hallucinogenic snuff ingredient. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, p.93-111, 1984.

MADUEÑO-BOX, M. **Cultivo de plantas medicinales**. 2. ed. Madrid: Aguilar, 1973. 239 p.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2.ed. New York: Oxford University, 1987. 374p.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220p.

MELO, R. F.; ANDRADE, L. H. C. Contribuição ao estudo do Chambá (*Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae). **Biológica Brasileira**, Brasília, v.1, n.2, p.195-207, 1989.

MIACHIR, J. I. **Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe**. 1992, 126f. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 1992.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative Leaf Morphology and Anatomy of Three Asteraceae Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Piracicaba-SP, Brasil, v. 49, n.1, p. 135-144, 2006.

MONTANARI JUNIOR, I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (Orgs). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, 2002. p. 35-54.

MONTEIRO, M. H. et al. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacol**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil ,v.74, n.2, p. 149-57, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S. A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry**. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

NADER, W.; MATEO, N. Biodiversity-resource for new products, development and self reliance. In: BARTHLOTT, W.; WINIGER, M. **Biodiversity: a challenge for development research and policy**. Berlin: Springer, 1998. p. 121-126.

OLIVEIRA, A. F. M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**. 1995. 125 f. Dissertação (Mestrado) – UFPE, Recife, 1995.

OLIVEIRA, A. F. M. et al. Screening Cromatográfico de Acanthaceae Medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq e *J. gendarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.3, n.1, p. 37-41, 2000.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PAVARINO, M. A. **Viabilidade de mini-estaquia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1995. 12 p.

PINTO, J.E.B.P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, 1994.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-prensa. 1990. 295p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.

RADMANN, E. B. et al. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

RIBEIRO, P.G.F. DINIZ, R.C. **Cultivo de plantas aromáticas e medicinais - IAPAR**
– Disponível em:

<<http://www.bonde.com.br/saude/saured.php?id=21LINKCHMdt=20060329>>, Acesso em : 09 nov .2006.

ROCHA, P. S. R. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus ssp.*** 2006, 101 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXV. Biodynamic Acanthaceous plants of the northwest Amazon. **Botanical Museum Leaflets**, v.26, n.8, p.267-75, 1978.

SILVA, I. et al. **Noções sobre o organismo humano e a utilização de plantas medicinais.** 3 ed. Cascavel: Assoeste, 1995. 203p.

SIMÕES, M. O. M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv Pêra cultivadas *in vitro*.** 1988, 56f. 1988. Dissertação (Mestrado) - UFV, Viçosa, 1988.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, New York, v.11, p. 118-131, 1957.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas-BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 125p.

TORRES, A. C. et al. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas.** Brasília: EMBRAPA, 2001. 20p. (Circular técnica, 24).

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A .C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI /EMBRAPA – CNPH, 1998. p 133-145.

VALVERDE, A. L. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil, v.15, n.3, p. 263-264, 2001.

VERPOORTE R, V. der H.; HOOPEN, H. H. J. G.; MEMELINK, J. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Leiden University, Leiden, The Netherlands, p. 3-20, 1998.

CAPÍTULO 1

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker)¹

¹ Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker)

RESUMO

O uso expressivo de plantas medicinais para o tratamento de diversas enfermidades necessita de matéria-prima de alta qualidade. Entretanto, a falta de informação sobre os métodos de propagação e técnicas de cultivo dessas espécies dificulta essa procura. A micropropagação por ser a aplicação mais prática da cultura de tecidos vegetais, vem sendo utilizada na multiplicação de muitas espécies medicinais no sentido de proporcionar um grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes. O objetivo deste trabalho foi multiplicar *in vitro* plantas de alumã sob diferentes concentrações de BAP. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. As gemas axilares retiradas de plantas de alumã foram desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 3:1, durante 15 minutos. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada, e introduzidas em frascos contendo meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg. L⁻¹). Em seguida foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições, contendo 10 gemas por repetição. Avaliou-se o número de brotos por explante e a percentagem de explantes responsivos. Após 30 dias de cultivo observou-se maior taxa de explantes responsivos, 84% na concentração 1,0 mg. L⁻¹ de BAP e 4,0 brotos/explante. Nos tratamentos 3,0; 4,0 e 5,0 mg. L⁻¹ ocorreu vitrificação nas folhas.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Plantas medicinais, Biotecnologia.

IN VITRO MULTIPLICATION OF ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker)

ABSTRACT

The expressive use of medicinal plants for treatment of several diseases needs raw material of high quality. However, the lack of information concern to these species, about propagation methods and cultivation techniques difficult this demand. The micropropagation is the most practical application of plant tissue culture, that's why, has been used in the proliferation of many medicinal species, obtaining a large number of plants healthy and genetically uniform. The objective of this study was to multiply in vitro alumã plants (*Vernonia condensata* Baker.) under different concentrations of BAP. The experiment was carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory at the Center for Agrarian, Environmental and Biological Sciences of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. The axillar buds removed from alumã plants (*Vernonia condensata* Baker.) were sterilized for 2 minutes in a solution of 70% alcohol and for 15 minutes in a 75% sodium hipochloride solution. Afterward, the buds were washed three times under a laminar flux chamber with distilled and autoclaved water and then put into flasks containing the MS medium supplemented with 0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg.L⁻¹ of BAP. The experimental design was entirely randomized with 5 replications, containing 10 buds per repetition. After 30 days of cultivation there were greater rate of responsive explants to the concentration 1.0 mg. L⁻¹ of BAP, with 84% of responsive explants and 4.0 shoots/explant. In treatments 3.0, 4.0 and 5.0 mg. L⁻¹ were observed vitrified leaves.

Key Words: Tissue culture, medical plants, biotechnology.

INTRODUÇÃO

A espécie *Vernonia condensata* Baker pertencente à família Asteraceae, nativa possivelmente da África tropical e trazida ao Brasil nos tempos coloniais pelos escravos (LORENZI & MATOS, 2002). A espécie possui propriedades analgésicas e de proteção gástrica (BOORHEM, 1999).

O uso das plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades é bastante expressivo. Entretanto, 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 (PAVARINO, 1995).

Quando se pretende explorar economicamente uma determinada espécie vegetal, o ponto de partida deve ser o estudo das formas de propagação e se elas apresentam viabilidade para o estabelecimento de um sistema produtivo (SCHEFFER, 1992).

Atualmente, muitas plantas medicinais já são multiplicadas *in vitro*. Entre elas: *Pfaffia glomerata* (MALDANER et al., 2006); *Lychnophora pinaster* (SOUZA et al., 2003). *Jatropha elliptica* (CAMPOS et al., 2007); *Aloe vera* (ARAÚJO, 2002), etc. Por meio da biotecnologia, é possível aumentar a produção e diminuir o preço dos princípios ativos fitoquímicos (BAJAJ et al., 1988). A proliferação *in vitro* de plantas medicinais, a partir da cultura de gemas e meristemas, é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies. Entretanto, este método pode ser usado não só para a produção de mudas saudáveis e de boa qualidade, mas também quando há escassez de material para o plantio (CUNHA et al., 1999).

A cultura de tecidos de plantas é um método biotecnológico já consagrado pelos resultados alcançados em várias culturas, as quais foram beneficiadas pela produção de plantas uniformes e saudáveis, pela velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, pela maior produção em menor tempo e espaço físico e, ainda pela obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos através da cultura de meristemas (CRÓCOMO, 1986).

A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por uma concentração adequada e balanceada de reguladores vegetais adicionada ao meio, como a citocinina que é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*. A BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Outro regulador vegetal utilizado no cultivo *in vitro* é o GA₃ (ácido giberélico). 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. (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As exigências nutricionais requeridas para o crescimento de um tecido em condições *in vitro* variam de espécie para espécie, de variedade para variedade e até mesmo dentro da própria planta, necessitando-se, assim, otimizar os meios de cultura (NAGAO, et al., 1994).

Devido à importância desta planta para obtenção dos princípios ativos e outros múltiplos propósitos, objetivou-se induzir a multiplicação de brotos de alumã *in vitro*, através da adição de reguladores de crescimento BAP e GA₃ ao meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de *Vernonia condensata* Baker oriundas do campo foram utilizadas nesse trabalho. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM).

Desinfestação do material: Gemas axilares foram lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos, em seguida foram imersas em solução de hipoclorito de sódio e água na

concentração de 3:1, durante 15 minutos em agitador magnético. O material vegetal foi lavado 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

Estabelecimento in vitro: Após processo de desinfestação, as gemas foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8, anteriormente à autoclavagem a 123° C por 20 minutos. O experimento foi conduzido em BOD, com temperatura de 27 ± 2° C e fotoperíodo de 16 horas e 40 μM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após 15 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a percentagem de explantes responsivos nas placas e percentagem de contaminação e oxidação.

Multiplicação in vitro: Os brotos de alumã obtidos nas placas foram transferidos para frascos contendo meio MS nas mesmas concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹) com o intuito de aumentar a taxa de multiplicação. Após 30 dias fez-se a contagem dos brotos, os quais foram individualizados e colocados em novo meio de cultura contendo 1 mg.L⁻¹ GA₃ + 1% de carvão ativado com o intuito de alongar e induzir a formação de raízes nas brotações. Ao final de 75 dias, avaliou-se: número de folhas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e percentagem de sobrevivência.

Delineamento experimental: Para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições, contendo 10 gemas em cada repetição. Os dados obtidos na multiplicação foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão e teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as concentrações 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP foram as que promoveram maiores percentuais de explantes responsivos (84 e 70%

respectivamente). Essa percentagem de resposta diminuiu em concentrações maiores devido possivelmente ao efeito fitotóxico da citocinina (Figura 01).

Além da provável toxidez causada pela citocinina, as perdas obtidas durante a inoculação dos explantes de alumã no meio de cultura foram de 4 a 38%, por contaminação com fungos e bactérias (Tabela 01). Segundo a análise de regressão, aumentando-se as concentrações de BAP, aumentou-se a contaminação por bactérias nas gemas axilares de *Vernonia condensata*, interferindo na resposta morfogenética. (Figura 02). É possível que as maiores concentrações do regulador vegetal (BAP) tenham contribuído para aumentar a multiplicação de bactérias. Neste caso, necessita-se de estudos mais aprofundados para melhor avaliação dos efeitos do BAP na indução de bactérias, visto que não foram encontrados relatos na literatura da existência desta correlação.

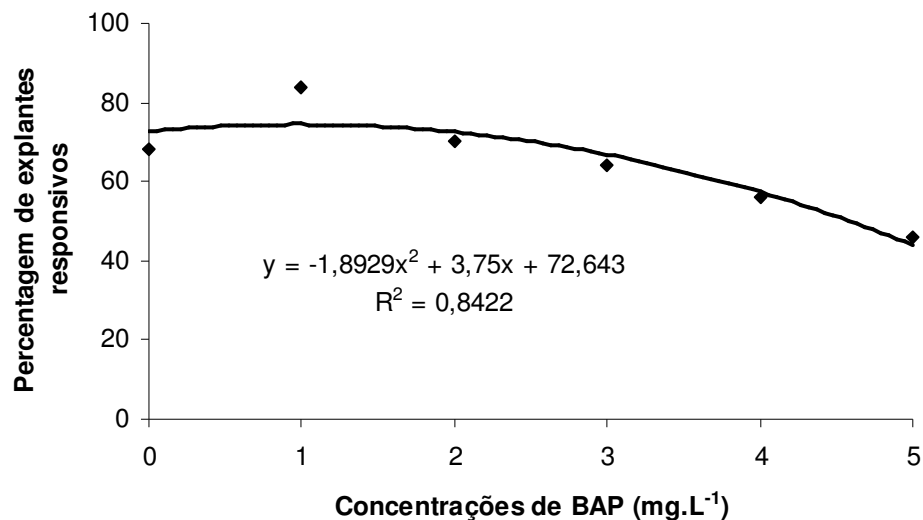


Figura 01. Comportamento *in vitro* de gemas axilares de alumã, após 15 dias de cultivo.

Tabela 01: Percentagem de perdas de explantes por contaminação e oxidação, após 15 dias de cultivo:

Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)	Contaminação por fungos (%)	Contaminação por bactérias (%)	Oxidação de explantes (%)
0,0	10a	8a	14a
1,0	8a	4a	4a
2,0	14a	10ab	6a
3,0	14a	16ab	8a
4,0	8a	28bc	8a
5,0	14a	38c	2a

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

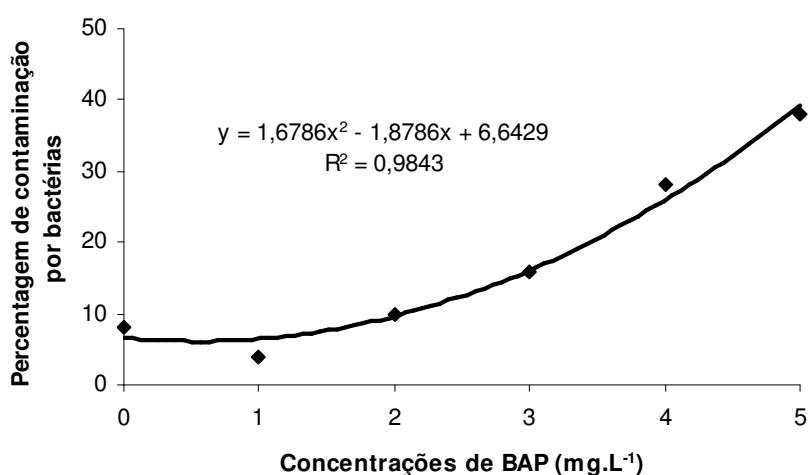


Figura 02. Percentagem de contaminação de bactérias observadas nas diferentes concentrações de BAP.

A contaminação depende do material vegetal utilizado para isolamento *in vitro*, que pode ser de casa de vegetação ou do campo. No caso da espécie *Vernonia condensata*, o material vegetal utilizado foi retirado do campo contendo elevada concentração de microrganismos. Segundo Tavares et al., (1992) uma maior destreza no isolamento dos explantes e a adoção de uma assepsia superficial mais efetiva, com emprego de uma maior concentração do agente esterilizante, maior período de tratamento ou utilização de outro composto desinfestante para o procedimento podem reduzir para níveis mais baixos as perdas aqui ocorridas.

Outro problema comum em cultura de tecidos é a oxidação de explantes, apesar do valor pequeno encontrado nesse trabalho (2 a 14%), interferiu também na resposta morfogênética dos explantes (Tabela 01). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*. Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Com relação ao número de brotações por explantes, a concentração 1,0 mg.L⁻¹ de BAP também foi a melhor, com 4,0 brotações/explante, diferindo significativamente da concentração 2,0 mg.L⁻¹, com média de 2,0 brotações/explante (Figura 03 e Tabela 02). Resultado semelhante ao encontrado por Pasqual & Ando (1989), no cultivo *in vitro* de gemas axilares de plântulas de *Poncirus trifoliata*, onde elevadas concentrações de BAP promoveram redução no percentual de explantes com brotações, sendo que a concentração ótima foi de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, a mesma encontrada no presente trabalho.

Tabela 02: Número de folhas (NF), altura média dos brotos (AMB) e comprimento médio das raízes (CMR) em função de diferentes concentrações de BAP, após 75 dias de cultivo.

C. BAP	NF (%)	AMB (cm)	CMR (cm)	NB (%)
0,0	8.25 a*	8.18 a	9.75 a	1,0b
1,0	10.88 a	8.38 a	10.38 a	4,0a
2,0	10.0 a	6.94 a	7.63 a	2,0b

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

C.BAP - Concentração de BAP (mg.L⁻¹)

NF - Número de folhas

AMB - Altura: comprimento de parte aérea (cm)

CMR - Comprimento de raiz (cm)

NB - Número de brotos/explante responsivo.

A tendência de diminuição da altura das brotações de alumã em concentrações acima de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (tabela 02) pode estar ligada ao fato de

que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até uma determinada concentração. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) essa tendência de diminuição da altura em brotações acontece a partir de determinada concentração e pode decorrer de um possível efeito fitotóxico da citocinina. A toxidez causada pelo excesso de reguladores vegetais no meio de cultura, ou pelo prolongado período de tempo em que a cultura permanece exposta a eles, pode provocar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas, resultando na redução da taxa de multiplicação e no encurtamento dos caules, o que dificulta a individualização das plantas e o processo de enraizamento (Narayanaswamy, citado por SOARES et al, 2007).

Segundo Cantagallo et al. (2005), brotações provenientes de meio de cultura com concentrações menores de reguladores apresentaram desenvolvimento vegetativo superior. Por outro lado, a ausência desse regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos em alumã (Tabela 02).

Andrade et al. (2006) verificaram que o aumento no número de brotações de *Eucalyptus grandis* foi inversamente proporcional ao aumento da dosagem e do tempo de exposição ao BAP.

O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode ser relacionado com a influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (BRUM et al. 2002).

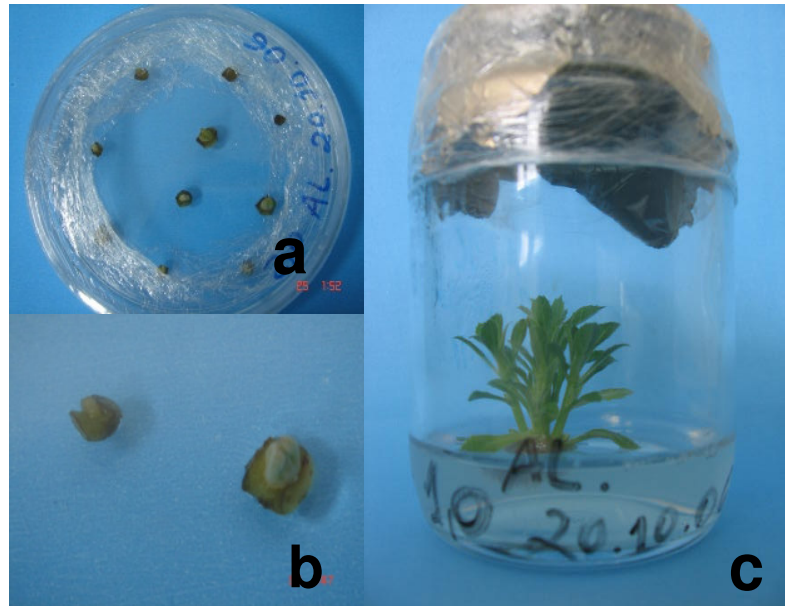


Figura 03: Multiplicação *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker a partir de gemas axilares. a) Resposta das gemas após 15 dias de cultivo. b) Detalhe da gema. c) Brotações múltiplas provenientes da concentração 1,0mg. L⁻¹.

Durante o desenvolvimento das brotações de alumã mantidas em meio de cultura contendo BAP, observou-se a ocorrência de vitrificação das folhas nos tratamentos com 3,0; 4,0 e 5,0 mg. L⁻¹ de BAP (Figura 04). A vitrificação é um evento comum na cultura de tecidos, gerando anormalidades fisiológicas e morfológicas no tecido vegetal, afetando os processos de fotossíntese e trocas gasosas da planta (ZIV, 1991). Um dos fatores que provoca essa anormalidade é o excesso de regulador vegetal. As plantas quando estão vitrificadas apresentam um aspecto de hiperhidricidade nos tecidos e não são aptas a serem aclimatadas (ABREU et al. 2003).

Pinto et al. (1994) trabalhando com segmentos nodais de *Kielmeyera coriacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com concentrações acima de 8,0 mg L⁻¹ de BAP, observaram a formação de brotações anormais.

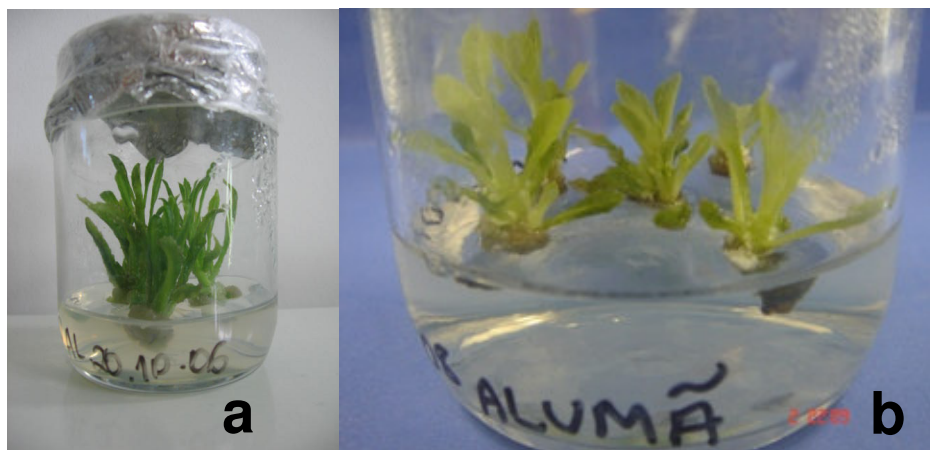


Figura 04: Vitrificação observada em brotações *in vitro* de alumã. a) Brotações de alumã apresentando aspecto de hiperidricidade nas folhas em concentrações de 4,0 e 5,0 mg L⁻¹ de BAP. b) Na concentração de 3,0 mg L⁻¹, onde o efeito foi menor.

Em algumas culturas, como a do alumã, as brotações obtidas na fase de multiplicação geralmente são pequenas e não se encontram em condições de serem individualizadas para o enraizamento, necessitando do uso de regulador vegetal que promova o alongamento da parte aérea dessas brotações.

A aplicação 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura conferiu um aumento na altura média das brotações (Figura 05), demonstrando o efeito benéfico promovido por este regulador no desenvolvimento *in vitro* de alumã. 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. Grosser & Gmitter Júnior (1990) também obtiveram alongamento satisfatório em plântulas de híbridos somáticos de citros, utilizando 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura.

O aumento do tamanho da muda proveniente da cultura de tecidos é de interesse prático, pois em razão do seu porte restrito, o manuseio torna-se mais difícil e o tempo para a produção comercial da muda é prolongado (HOFFMANN *et al.*, 2001).

Posteriormente, o enraizamento das brotações é fundamental para a obtenção de plantas aclimatizadas e em condições de serem transferidas para campo. Segundo Pasqual *et al.*, (2001) o carvão ativado em concentrações de 0,2 a 3% pode

ser utilizado para o enraizamento de diversas culturas. Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Quimicamente, retém substâncias inibitórias do meio ou produtos tóxicos liberados pelos explantes, promove o crescimento de raízes.

A utilização de 1% de carvão ativado no meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de GA_3 resultou no enraizamento das brotações de alumã, não havendo necessidade da adição de auxina (Figura 05a). Ribeiro et al., (2000), estimularam o crescimento do sistema radicular em citros com $0,5$ a $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado em cultivo *in vitro*.

Antes de serem aclimatizados, os brotos obtidos dos tratamentos 0; 1,0; e 2,0 mg. L^{-1} de BAP foram avaliados quanto ao número de folhas, comprimento da parte aérea e da raiz. De acordo com o teste de Tukey não houve diferença significativa a 0,05% (Tabela 02). Resultado semelhante foi relatado por Cantagallo et al. (2005), que trabalharam com gemas axilares de Citrumelo 'Swingle' utilizando concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e $1,5 \text{ mg. L}^{-1}$).

Dois fatores podem ter contribuído ao bom enraizamento do alumã *in vitro* sem o emprego de regulador. O primeiro devido aparentemente à produção endógena de auxina pela planta. Segundo Coll *et al.* (1988), as partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese. Um outro fator a ser considerado, é o tamanho das raízes. Brotos pequenos em geral não enraízam bem necessitando, portanto, de uma fase intermediária adicional de alongamento com o uso do GA_3 . Deste modo, baseado no excelente enraizamento (100%) obtido neste trabalho sem o uso de auxina, o tamanho dos explantes (8 a 13 cm) utilizados neste experimento revelaram competência na formação de raiz (Figura 05b).

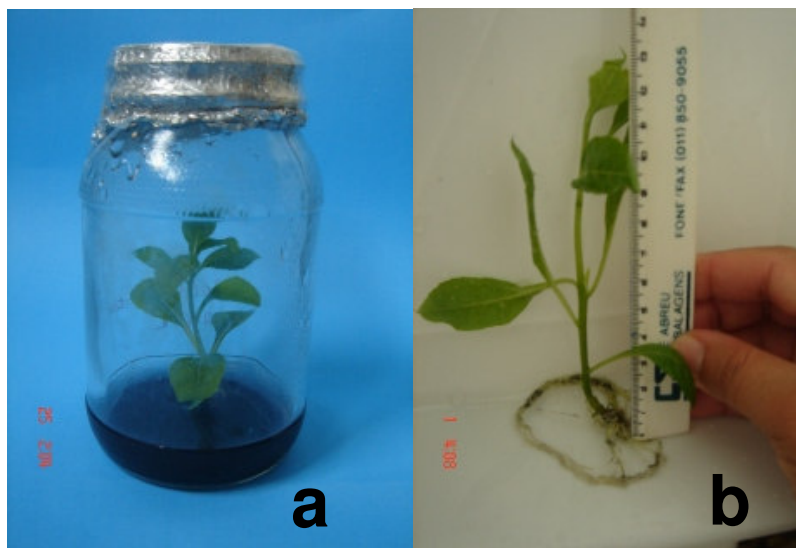


Figura 05: Alongamento e enraizamento de broto de alumã. a) MS contendo GA₃ e carvão ativado, b) Avaliação dos parâmetros antes da aclimação.

CONCLUSÕES

- A multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Vernonia condensata* Baker constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas.
- O maior número de brotações foi alcançado com a concentração de 1,0mg.L⁻¹ de BAP, possibilitando 4,0 brotações/explante.
- Foi necessário a adição de 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ para o alongamento dos brotos, antes de enraizá-los.
- A utilização de 1,0 mg.L⁻¹ de GA₃ + 1% de carvão ativado garantiu 100% de enraizamento dos brotos.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D. da; NECKEL, C. A.; LANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R. dos; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.54-7, 2002.
- ABREU, I. N. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MORAIS, A. R. de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O. A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33, n.1, p.1-7. 2003.
- ANDRADE, W. F. de; ALMEIDA M. de; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1715-1719, dezembro 2006.
- 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.
- BOORHEM, R. L. **Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais**. Reader's Digest Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1999. 416 p.
- BRUM, G. R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.) **Ciência Agrotécnica**, Lavras. Edição especial, p.1403-1409, dez., 2002.
- CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.9, n.3, p.30-36, 2007.
- CANTAGALLO, F de S.; AZEVEDO, F. A. de; SCHINOR, E. H.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 136-138, Abril 2005.
- COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCÍA, B. S.; TOMES, R. S. **Fisiologia Vegetal**. 6 ed. Madri: Pirâmide, cap.8: Morfogeneses: p.569-570, 1988.
- CRÓCOMO, O. J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANNUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., **Anais**, São Paulo. p. 53-71, 1986.
- CUNHA, G. A P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: EMBRAPA, 480 p., 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1998. 509 p.

GROSSER, J. W.; GMITTER JÚNIOR, F. G. Protoplast fusion and citrus improvement. **Plant Breeding Reviews**, Riyadh, v. 8, p. 339-374, 1990.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido', durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.31-37, 2001.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, v.13, p. 382-383, 2002.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, jul-ago, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

NAGAO, E. O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "*in vitro*" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31, 1994.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação de 'Trifoliata' através da cultura de gemas axilares *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 24, n. 2, p. 217-220, 1989.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. Aplicações no melhoramento genético de plantas. Universidade Federal de Lavras, 2001. 79 p. (**Monografia - Especialização**)

PAVARINO, M. A. **Viabilidade de mini-estaquia de raízes em cinco espécies de uso medicinal**. Brasília: Universidade de Brasília, 1995. 12 p.

PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; PINTO, C. A. B. P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyra coriaceae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.

RIBEIRO, V. G.; SANÁBIO, D.; SOUZA, C. N. de; LOPES, P. S. N.; BOCARDI, M. R.; PASQUAL, M. Efeitos de ácido giberélico e carvão ativado no cultivo *in vitro* de *Citrus limonia* Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.1, p. 27-30, 2000.

SCHEFFER, M. C. Roteiro para estudos de aspectos agronômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUSPR/ CEMEPR. **Sob Informa**, v. 10, n. 2, p. 29-31, 1992.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. de; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência agrotécnica**. v. 31 n.4 Lavras July/Aug. 2007.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R. M; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* mart. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003.

TAVARES, A. R.; CASTRO, C. E. F.; COSTA, A. M. M. Propagação *in vitro* de *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. In: CONGRESSO DA Sociedade de Botânica de São Paulo, 8., Campinas, 1990. **Anais**. São Paulo: SBSP, 1992. p. 67-69.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) **Micropropagation – Technology and Application**. Kluwer Academic Publishers, London, p.45-69, 1991.

CAPÍTULO 2

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ANADOR (*Justicia pectoralis* Jack)²

² Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE ANADOR (*Justicia pectoralis* Jack)

RESUMO

Muitas plantas medicinais vêm sendo estudadas cientificamente comprovando sua eficácia como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade. Contudo a falta de eficientes sistemas de propagação dessas plantas dificulta a disponibilidade de mudas de boa qualidade para esse recurso. Partindo desse ponto, o trabalho teve como objetivo multiplicar *in vitro* plantas de anador sob diferentes concentrações de BAP. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. As gemas axilares retiradas de plantas de anador foram desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos e em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2:1, durante 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas 3 vezes, em câmara de fluxo laminar, com água destilada e autoclavada, após que foram introduzidas em frascos contendo meio de cultura MS suplementado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg. L⁻¹). Em seguida foram mantidas em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 repetições, contendo 10 gemas por repetição. Após 30 dias de cultivo observou-se que a melhor resposta foi encontrada na concentração 2,0 mg. L⁻¹ de BAP com 76,7%. A concentração 1,0 mg. L⁻¹ de BAP promoveu o maior número de brotos, 6,0 por explante. Para indução de alongamento os brotos obtidos foram subcultivados nessa concentração por mais 30 dias. Para o enraizamento fez-se uso da auxina AIB nas concentrações (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg. L⁻¹). Os brotos emitiram raízes em todos os tratamentos, não havendo necessidade da suplementação exógena da auxina.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Plantas medicinais, Biotecnologia.

***IN VITRO* MULTIPLICATION OF ANADOR (*Justicia pectoralis* Jack)**

ABSTRACT

Many medicinal plants have been scientifically studied to prove their effectiveness as a beneficial and essential therapeutic resource to humanity. But the lack of efficient proliferation systems of these plants become difficult the availability of good quality seeds for this use. Therefore, the work aimed to multiply in vitro anador plants (*Justicia pectoralis* Jack) under different concentrations of BAP. The experiment was carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory at the Center for Agrarian, Environmental and Biological Sciences of the Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. The axillar buds removed from anador plants (*Justicia pectoralis* Jack) were sterilized for 2 minutes in a solution of 70% alcohol and for 20 minutes in a 50% sodium hypochloride solution. Afterward, the buds were washed three times under a laminar flux chamber with distilled and autoclaved water and then put into flasks containing the MS medium supplemented with 0, 1, 2, 3, 4 and 5 mg.L⁻¹ of BAP. Following they were to the greenhouse at 27 ± 2 °C in a 16 hour photoperiod. The experimental design was entirely randomized with 6 replications, containing 10 buds per repetition. After 30 days of cultivation observed that the higher rate for responsive explants were found in the concentration 1.0 mg. L⁻¹ of BAP with 76.7%. The concentration 1.0 mg. L⁻¹ BAP promoted the highest number of shoots, 6.0 by explant. For induction and elongation, the shoots obtained were subcultured in this concentration for 30 days. For the rooting was used the indole butyric acid (IBA), in concentrations (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mg. L⁻¹). The shoots sprouted roots in all treatments, so, there is no need for exogenous auxin supplementation.

Key Words: Tissue culture, medical plants, biotechnology.

INTRODUÇÃO

A espécie medicinal *Justicia pectoralis* ocorre naturalmente nas América do Sul, do Norte, Central e Tropical, no Oeste da África e no Oeste da Índia (BARROS, 1992). Pertence à família Acanthaceae Juss., subfamília Acanthoideae Lindau, a qual compreende 250 gêneros e 2.700 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o planeta (JOLY, 1993).

No Brasil encontra-se amplamente cultivada, nas regiões Norte e Nordeste, especialmente em aldeias indígenas (BARROS, 1992; LINO et al., 1997). Infusões das folhas dessa espécie, popularmente conhecida no Norte e Nordeste brasileiro como “anador”, são utilizadas como fins analgésicos e antiinflamatórios (OLIVEIRA, 1995).

As espécies medicinais apresentam periodicidade na produção dos princípios ativos diante das variações ambientais (MARTINS, et al., 1995). As plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas que pode acarretar em maior ou menor produção desses princípios ativos na planta. Assim, ao se excisar parte da planta para o cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meio nutritivo para suplementar suas necessidades exógenas, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (TORRES et al., 2001).

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).

As espécies cultivadas apresentam algumas vantagens em relação às plantas encontradas na mata, principalmente pela necessidade de serem selecionadas e padronizadas. Todas as espécies cultivadas possuem a mesma quantidade de princípio ativo, matéria - prima do medicamento. Já as plantas extraídas da mata, não possuem as mesmas propriedades e prejudicam a qualidade do produto final (GOMARRA, 2005).

Uma das peculiaridades da cultura de tecidos vegetais é a possibilidade quase absoluta de controle do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Isso não

seria possível sem a adição dos reguladores vegetais ao meio de cultura, pois são estes componentes que direcionam o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado (PASQUAL, 2001).

O uso de citocinina é muito favorável na fase de multiplicação *in vitro*, esse regulador desempenha um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos. O BAP (benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais utilizada devido a sua eficiência na multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias (HOFFMANN, et al., 1998).

Para a indução de raízes *in vitro*, geralmente, os meios de cultura são acrescidos de diferentes tipos e concentrações de auxinas, sendo estas as variáveis que mais influenciam no sucesso do enraizamento (ROCHA, 2006). Entre as auxinas mais usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido indolbutírico (AIB).

O cultivo de gemas axilares resulta num dos métodos de multiplicação *in vitro* mais facilmente utilizados e mais seguros para obtenção de “cópias uniformes ou semelhantes”, isentas de variações indesejáveis (PIERIK, 1990).

Na micropropagação, um dos fatores a ser otimizado é a redução do tempo de cultura, o que pode auxiliar o processo da propagação *in vitro*, mesmo sendo, na maioria das vezes, um processo demorado e dispendioso na obtenção do protocolo para cada espécie (PULLMAN et al., 2003).

O estabelecimento de um protocolo eficiente de produção de mudas de anador com alta qualidade a partir da cultura de tecidos será útil para a obtenção de plantas com elevado potencial produtivo de princípios ativos. Assim, objetivou-se induzir a multiplicação e enraizamento de brotos de anador *in vitro*, por meio da adição dos reguladores vegetais BAP e IBA ao meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do presente trabalho, utilizou-se plantas de *Justicia pectoralis* Jacq oriundas do campo. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM).

Desinfestação do material: Os explantes utilizados foram gemas axilares retiradas de ramos de anador, lavadas em água corrente e desinfestadas em solução de álcool etílico na concentração de 70% durante 2 minutos, em seguida foram imersos em solução de hipoclorito de sódio e água na concentração de 2:1, durante 20 minutos em agitador magnético. O material vegetal foi lavado 3 vezes em câmara de fluxo laminar com água destilada e autoclavada.

Estabelecimento in vitro: Após processo de esterilização, as gemas foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar (0,8%). O pH do meio de cultura foi ajustado a 5,8, anteriormente à autoclavagem a 123° C por 20 minutos. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, com temperatura de 27 ± 2° C e fotoperíodo de 16 horas e 40 µM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. Após 15 dias de cultivo *in vitro*, avaliou-se a percentagem de explantes responsivos, percentagem de contaminação e oxidação.

Multiplicação e enraizamento in vitro: Os brotos obtidos nas placas foram transferidos para frascos, contendo meio as mesmas concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹). Após 30 dias fez-se a contagem e individualização dos brotos. Para o primeiro subcultivo foi utilizado meio MS contendo 1 mg.L⁻¹ BAP com o intuito de aumentar a taxa de multiplicação. Ao atingir altura em torno de 8 a 10 cm, as brotações foram inoculadas em meio de enraizamento contendo AIB em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹), acrescido de 1% de carvão ativado. Ao final, avaliou-se: número de folhas, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e percentagem de sobrevivência.

Delineamento experimental: Para o estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 6 repetições,

contendo 10 gemas em cada repetição. Os dados obtidos na multiplicação e no enraizamento *in vitro* foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo a análise estatística, verificou-se que a concentração 2,0 mg.L⁻¹ de BAP foi aquela que promoveu o maior percentual de explantes responsivos (76,7%), embora não diferindo significativamente da concentração 1,0 mg.L⁻¹ (73,4%). Concentrações maiores exerceram efeito antagônico sobre esse percentual (Figura 01). Moura et al., (2001) trabalhando com segmentos de epicótilo de laranja-pêra *in vitro* apresentaram resultado semelhante, onde 3 e 4 mg.L⁻¹ de BAP conduziram à redução do percentual de explantes responsivos.

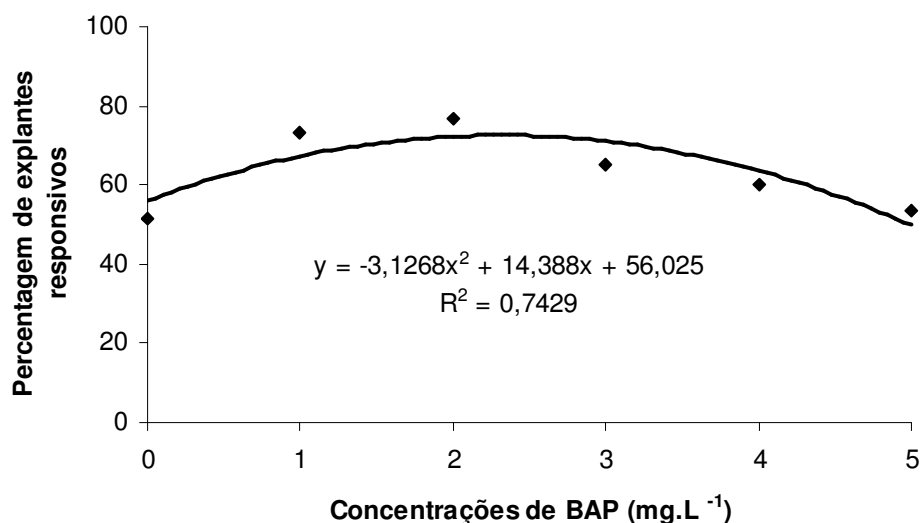


Figura 01: Explantes responsivos a partir de gemas axilares de anador (*Justicia pectoralis* Jacq.) em função de diferentes concentrações de BAP.

Segundo Souza e Junghans, (2006), a contaminação e oxidação dos explantes, está entre os mais graves problemas na cultura de tecidos de plantas, por afetar a resposta morfogênica destes *in vitro*.

Como agentes de contaminação, os fungos foram observados em maior quantidade, não havendo ocorrência de bactérias. As perdas obtidas foram de 13,3 a 40%, sendo estas constituídas por contaminação com fungos e parte pelo isolamento do meristema apical que se oxidava (10 a 28,3%) e não se desenvolveu (Tabela 01). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*. Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O estabelecimento dos ápices caulinares em condições assépticas, durante o processo de micropropagação, é uma das fases mais críticas, em função da contaminação por fungos e bactérias e pela oxidação. (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Assim, uma maior destreza no isolamento dos ápices e a adoção de uma assepsia superficial mais efetiva, com emprego de uma maior concentração do agente esterilizante, maior período de tratamento ou utilização de outro composto desinfestante para o procedimento (Tavares et al., 1992) podem reduzir para níveis mais baixos as perdas aqui ocorridas.

Tabela 01: Percentagem de perdas de explantes:

Concentração de BAP (mg.L ⁻¹)	Contaminação por fungos (%)	Oxidação de explantes (%)
0,0	20,0a*	28,3a
1,0	16,7a	10,0a
2,0	13,3a	10,0a
3,0	20,0a	15,0a
4,0	30,0a	10,0a
5,0	40,0a	21,7a

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

Com relação ao número de brotações por explantes, a concentração 1,0 mg.L⁻¹ de BAP foi a que proporcionou o maior número de brotos/explantes, no total de 6, não diferindo significativamente da concentração 2,0 mg.L⁻¹, com média de 5,2 brotações/explante. Por outro lado, a ausência desse regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos. (Figura 02).

Cantagallo et al. (2005) obtiveram maior número de brotos no cultivo *in vitro* de gemas axilares de citrumelo 'Swingle' com a concentração de 0,89 mg. L⁻¹ de BAP, notando-se ainda uma tendência de redução nas concentrações superiores. Resultado semelhante observado nesse trabalho, concentrações superiores a 1,0 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram redução no número de brotações/explante em *Justicia pectoralis*.

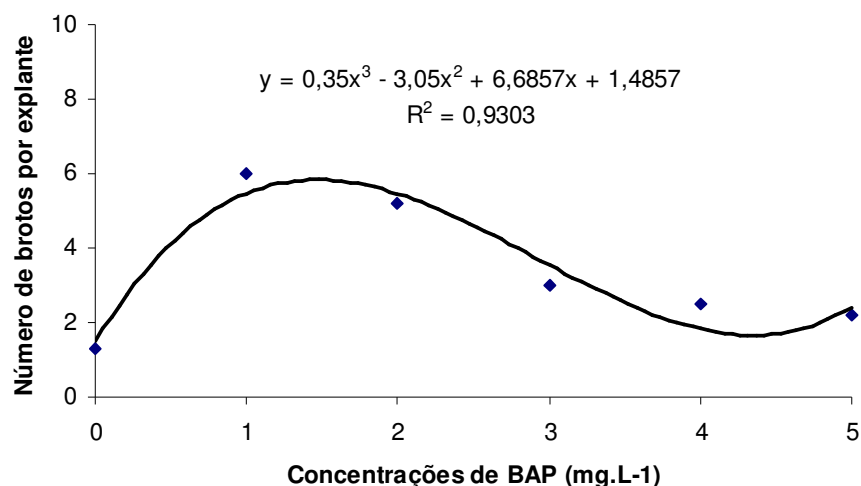


Figura 02: Número de brotações/explante em função de diferentes concentrações de BAP.

Portanto, buscou-se o balanço ideal para concentração de BAP, isto é, um ponto intermediário que combinasse o bom desenvolvimento da parte aérea, em tamanho e número de brotos. A concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu elevação na altura média e máxima das brotações (Figura 03), sem aumentar o tamanho do calo basal, demonstrando o efeito benéfico promovido por este regulador de crescimento no desenvolvimento *in vitro* de anador.

Entretanto, deve-se considerar que, na multiplicação *in vitro*, não basta conseguir-se altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter-se uma taxa média satisfatória, com o mínimo de variação das partes aéreas produzidas, pois determinarão o sucesso no enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

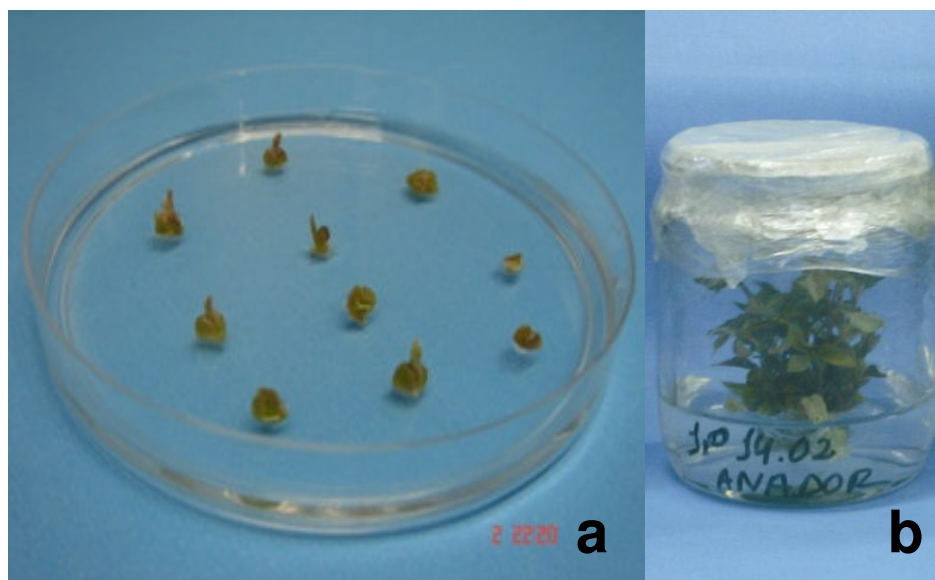


Figura 03: Multiplicação in vitro de *Justicia pectoralis*. a) Gemas axilares cultivadas em meio MS com 1 mg L^{-1} de BAP; b) Brotações adventícias provenientes dessa concentração.

Com relação à altura dos brotos, número de folhas e comprimento de raiz das brotações provenientes do cultivo em $1,0\text{ mg L}^{-1}$ de BAP, essas características avaliadas durante a fase de enraizamento não apresentaram diferenças significativas entre as concentrações de AIB utilizadas (Tabela 02).

Tabela 02: Número de folhas, altura média dos brotos e comprimento médio das raízes de anador em função de diferentes concentrações de AIB, após 75 dias de cultivo.

Concentração de AIB (mg.L^{-1})	Número de folhas	Comprimento de parte aérea (cm)	Comprimento de raiz (cm)
0,0	11,2a	9,2a	5,14a
0,5	11,6a	10,24a	4,60a
1,0	14,0a	10,7a	5,64a
1,5	13,2a	10,68a	4,66a
2,0	10,4a	8,94a	3,54a

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey 0,05).

A formação de raízes nas brotações de *J. pectoralis*, quando cultivadas em meio de cultura sem reguladores vegetais, provavelmente ocorreu devido ao acúmulo de auxinas endógenas em partes aéreas da planta (Figura 04). Assim, em algumas espécies, pode ser dispensado o uso de auxinas no enraizamento, o mesmo foi observado por Silva et al. (2007) no enraizamento *in vitro* de *Aloe vera*. Já Aggarwal & Barna (2004), que também trabalharam com *A. vera* conseguiram 100% de enraizamento *in vitro* com brotos cultivado em meio MS suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de AIB.

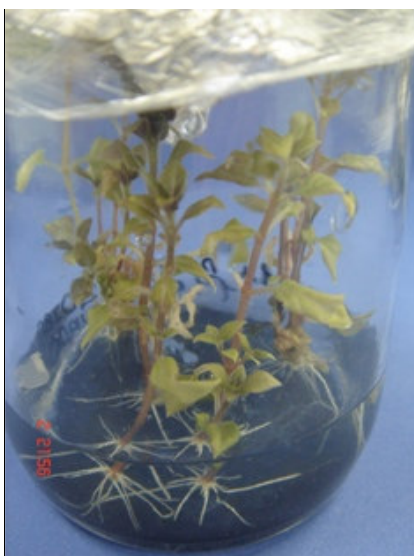


Figura 04: Enraizamento *in vitro* de *Justicia pectoralis* em meio MS com carvão ativado e sem regulador de crescimento.

CONCLUSÕES

- A adição de BAP ao meio de cultura influenciou positivamente na indução de brotações.
- O maior número de brotações foi alcançado com as concentrações 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP com 6,0 e 5,2 brotações/explante, respectivamente.
- Para o enraizamento das microplantas de anador, não se faz necessário o adicionamento de auxina exógena AIB.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; BARNA, K. S. Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v.13, p.77-9, 2004.

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, v. 4, p. 60-103. 1988.

BARROS, R. F. M. Efeito da radiação solar sobre o crescimento e produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* var. *Stenophylla* Leonard. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 143p. 1992. **(Dissertação de mestrado)**.

CANTAGALLO, F de S.; AZEVEDO, F. A. de; SCHINOR, E. H.; MOURÃO FILHO, F. de A. A.; MENDES, B. M. J. Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 136-138, Abril 2005.

GOMARRA, F. de L. **Validação de Plantas Medicinais Boas Práticas de Cultivo e Manipulação Legislação para Fitoterápicos**, Apostila, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, v. 1, p. 183-260, 1998.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.21-24, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777p.

LINO, S. C.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, v.11, n. 3, p. 211-215, 1997.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M. de, CASTELLANI, D. C., DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220p.

MIACHIR, J. I. Proposição de um protocolo de cultura de tecidos para produção de compostos secundários para *Curcuma zedoaria* Roscoe. Piracicaba, ESALQ, 1992. 126p. **(Dissertação de Mestrado)**.

MOURA, T. L. de; ALMEIDA, W. A. B. de; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Organogênese *in vitro* de *citrus* em função de concentrações de BAP e

seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 240-245, agosto 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

OLIVEIRA, A. F. M. Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 125 p.1995 (**Dissertação de Mestrado**).

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 127 p., 2001.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Ed. Mundi-prensa. Madrid, 295p. 1990.

PULLMAN, G. S.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L). Somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, v.164, p.955-969, 2003.

ROCHA, P. S. R. Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* ssp. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2006, 101 p. (**Tese Doutorado**).

SILVA, C. G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.1, p.29-35, 2007.

SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas - BA, 125p.:il, 2006.

TAVARES, A.R.; CASTRO, C.E.F.; COSTA, A.M.M. Propagação *in vitro* de *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum. In: CONGRESSO DA Sociedade de Botânica de São Paulo, 8., Campinas, 1990. **Anais**. São Paulo: SBSP, p.67-69, 1992.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de; Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, 2001. 20p. (**Circular técnica, 24**).

CAPÍTULO 3

ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker) E ANADOR (*Justicia pectoralis* Jacq)³

³ Artigo ajustado a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico: Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

ACLIMATAÇÃO DE MICROPLANTAS DE ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker) E ANADOR (*Justicia pectoralis* Jacq)

RESUMO

O alumã e o anador são plantas medicinais muito utilizadas no Nordeste para fins terapêuticos. A crescente utilização e a falta de eficientes sistemas de propagação dessas plantas justificam a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais, sendo a micropropagação uma alternativa viável. A aclimatação é uma importante etapa na micropropagação. Um dos principais obstáculos para a aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas das condições *in vitro* para *in vivo*. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo aclimatar com sucesso mudas de alumã e anador provenientes do cultivo *in vitro*, bem como a conservação de germoplasma para fins científicos, assim como preservação destas espécies. As microplantas de alumã e anador provenientes da metodologia utilizada neste trabalho alcançaram 100% de sobrevivência na aclimatação, independente da adição exógena de auxina.

Palavras-chave: Plantas medicinais, cultura de tecidos, enraizamento *ex vitro*.

**ACCLIMATATION OF ALUMÃ (*Vernonia condensata* Baker) AND ANADOR
(*Justicia pectoralis* Jack) MICROPLANTS**

ABSTRACT

The alumã (*Vernonia condensata* Baker) and anador (*Justicia pectoralis* Jacq) are widely used medicinal plants in the Northeast for therapeutic purposes. The growing use and the lack of effective systems for propagating these plants justify the need to find solution to minimize the impact of their exploration in nature reserves, and the micropropagation is a viable alternative. Acclimatization is an important step in micropropagation. One of the main obstacles to the practical tissue culture application is the difficulty in successfully transfer the seedlings under *in vitro* culture condition to *in vivo*. Given the foregoing, the present study aimed to acclimate alumã and anador seedlings from *in vitro* culture, as well, the conservation of germplasm for scientific purposes, and preservation of these species. The microplants of alumã and anador used in this study achieved 100% survival in the acclimation, regardless of the addition of exogenous auxin.

Key Words: Medical plants, tissue culture, *ex vitro* rooting.

INTRODUÇÃO

O alumã (*Vernonia condensata* Baker) pertencente à família Asteraceae, nativa possivelmente da África tropical e trazida ao Brasil nos tempos coloniais pelos escravos (LORENZI & MATOS, 2002). A espécie possui propriedades analgésicas e de proteção gástrica (BOORHEM, 1999).

Outra espécie medicinal *Justicia pectoralis* Jacq. ocorre naturalmente nas Américas do Sul, do Norte, Central e Tropical, no Oeste da África e no Oeste da Índia (Leonard e Morton, citados por BARROS, 1992). Infusões das folhas dessa espécie, popularmente conhecida no Norte e Nordeste brasileiro como “anador”, são utilizadas como fins analgésicos e antiinflamatórios (OLIVEIRA, 1995).

A crescente utilização dessas plantas medicinais no Nordeste, pelas propriedades terapêuticas, justifica a necessidade de medidas que minimizem o impacto de sua exploração nas reservas naturais. Portanto, a micropropagação parece ser uma alternativa viável, pois permite a obtenção de um grande número de plantas com autenticidade varietal em qualquer época do ano (NICOLOSO et al., 2001).

Uma etapa importante da micropropagação que inspira cuidado é a aclimação, devido à dificuldade de transferir com sucesso plantas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e posteriormente para o campo (FRÁGUAS, 2003). A aclimação é constituída de duas etapas: enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*) e transferência para condições não estéreis com temperatura e umidade controladas (DUNSTAN & TURNER, 1984).

Na fase de aclimação, as plantas obtidas no cultivo *in vitro*, aqui denominadas de microplantas, são expostas à redução de umidade do ar e temperatura instável, a fim de que possam suportar a transferência para novo substrato e, posteriormente, sobreviverem e se desenvolverem sem complicações em condições naturais de campo (SILVA et al. 1995).

Brainerd & Fucchigami (1981) relatam a necessidade de aclimação das plantas provenientes da cultura *in vitro*, em virtude de serem mais sensíveis e tenras, pois não desenvolvem a cutícula, resultando em alta evapotranspiração. Desse

modo, a transferência das condições assépticas e heterotróficas (*in vitro*) para o crescimento em ambiente externo deve ser realizada de forma gradativa e cuidadosa (CAMPOSTRINI & OTONI, 1996).

Apesar de fatores como substrato e umidade influenciarem na sobrevivência dos propágulos, o tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência. Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A baixa luminosidade e alta umidade relativa nos frascos de cultura *in vitro* dificultam o estabelecimento de condições autotróficas normais para algumas espécies, quando transferidas para aclimatização (PEDROTTI & VOLTOLINI, 2001). Além do mais, a planta deverá desenvolver mecanismos de controle de transpiração e condutância estomática (DÍAZ-PEREZ et al., 1995), ativar controle de perda de água pelas células (SUTTER, 1988) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (VANTELGEN et. al., 1992).

Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (HARARIKA, 2003). Com freqüência, um dos maiores obstáculos à aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos na propagação de plantas é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas das condições *in vitro* para o solo, devido à grande diferença entre as condições ambientais do laboratório, onde as mudas são produzidas, e o campo (HOFFMANN, 2002).

O sucesso da transferência de plantas micropropagadas para a casa de vegetação é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido (HOFFMANN, 2002). Assim, o objetivo desse trabalho foi de estabelecer um sistema eficiente de aclimação para microplantas de alumã e anador.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Centro de Ciência Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da Faculdade Maria Milza (FAMAM). As mudas utilizadas para a aclimação foram obtidas pela multiplicação *in vitro* de gemas axilares de alumã e anador.

Após 75 dias de cultivo *in vitro* (45 dias em meio de multiplicação MS com 1,0 mg. L⁻¹ de BAP e 30 dias em meio de enraizamento, sem regulador vegetal), foram selecionadas 50 microplantas de alumã e 50 microplantas de anador, que foram retiradas dos frascos, lavadas com água corrente com o objetivo de retirar o excesso do meio de cultura. As microplantas foram acondicionadas em garrafas plásticas (transparentes) de refrigerante, de dois litros, com quatro pequenos furos na base para drenagem do excesso de água. As garrafas foram cortadas na metade de sua altura para facilitar a adição do substrato (solo fértil autoclavado) e transplante da muda, após o que foram novamente fechadas por sobreposição das metades. No primeiro dia retirou-se a cápsula (tampinha) da garrafa por 10 minutos, no segundo dia por 20 minutos e foi-se aumentando o tempo gradativamente até que as mudas estivessem adaptadas ao meio ambiente. Após trinta dias as mudas encontravam-se totalmente aclimatadas. Durante o período da aclimação as garrafas com as microplantas foram mantidas em telado com 30% de sombreamento e irrigadas com auxílio de um borrifador, de forma a manter a umidade relativa do ar elevada. Esta exposição progressiva das microplantas às condições ambientais teve o objetivo de reduzir o estresse causado à mesma. A percentagem de sobrevivência foi avaliada ao final da aclimação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o maior número de brotações foi alcançado na concentração de 1,0 mg. L⁻¹ de BAP para as duas espécies, conforme (Tabela 01 e Figura 01). Em concentrações superiores a 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, as

brotações de alumã sofreram vitrificação possivelmente devido ao efeito fitotóxico da citocinina. Um dos fatores que provoca essa anormalidade é o excesso de regulador de crescimento. As plantas quando estão vitrificadas apresentam um aspecto de hiperidricidade nos tecidos e não são aptas a serem aclimatadas. (ABREU et al. 2003).

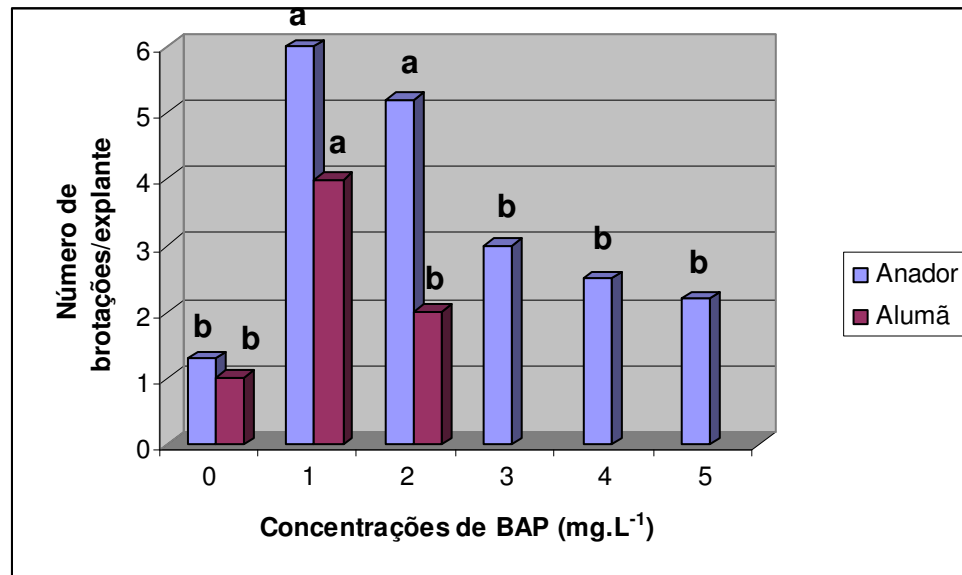


Figura 01: Número de brotos de alumã e anador em função da concentração de BAP. * Não houve formação de brotos, ocorreu vitrificação.

Conforme observado nos capítulos 01 e 02, as brotações provenientes do tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, em ambas as espécies, foi aquela que apresentou as maiores médias para os parâmetros número de folhas, comprimento de parte aérea e comprimento de raiz, embora não diferindo significativamente dos outros tratamentos. Diferentemente dos resultados aqui obtidos, Villa et al., (2006), verificaram que para essas variáveis, plantas cultivadas *in vitro* de amoreira-preta, houve interação significativa entre BAP e carvão ativado, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes.

O enraizamento *in vitro* do alumã e do anador ocorreu sem o emprego da auxina AIB, aparentemente devido à produção endógena de auxina pelas plantas (Figura 02a e 02b). Segundo Coll et al., (1988), as partes aéreas são fontes de

intensa produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimularia a rizogênese.



Figura 02: Rizogênese *in vitro* em microplantas de alumã e anador.
a) Enraizamento *in vitro* de alumã; b) Enraizamento *in vitro* de anador.

As microplantas de alumã e anador apresentaram 100% de sobrevivência e bom desenvolvimento durante o processo de aclimação, conforme (Figura 03a e 03b), independente da concentração de BAP ou IBA utilizada. Silva et. al., (2003) concluíram em seu trabalho que plantas de gloxínias apresentaram maior número de plantas sobreviventes durante o processo de aclimação, quando provenientes de cultivo *in vitro* com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.



Figura 03: Aclimação de microplantas de alumã e anador a) Microplantas de alumã; b) Microplantas de anador.

Ribas et. al., (2002) trabalharam com plantas de maracujazeiro provenientes de cultivo *in vitro* e verificaram que as concentrações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP foram fundamentais para a aclimação onde obtiveram taxa de sobrevivência em torno de 100%, independente do meio de cultura utilizado.

Araújo et al., (2002) relatam que mudas de *Aloe vera* enraizadas *in vitro* apresentam 80 a 95% de sobrevivência na aclimatização, enquanto que naquelas desprovidas de sistema radicular a taxa de sobrevivência cai para 30%. A obtenção de microplanta com sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento em novas condições ambientais, como as proporcionadas na aclimação (PIO et al., 2002).

A metodologia utilizada neste trabalho para a aclimação das microplantas de aluã e anador mostrou-se eficiente e pode ser recomendada para a micropropagação destas espécies medicinais. Além disso, constitui-se numa alternativa de reciclagem para garrafas de refrigerantes tipo PET, contribuindo para a sustentabilidade ambiental.

CONCLUSÃO

Houve 100% de sobrevivência das microplantas de aluã e anador, utilizadas neste trabalho, durante a aclimação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MORAIS, A. R. de; GEROMEL, C.; LADEIRA, A.; LAMEIRA, O. A. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33 n.1 p.1-7. 2003.

ARAUJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D. da; NECKEL, C. A.; LANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R. dos; TIEPO, E.; BACH, D.B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa *Aloe vera* L. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.54-7, 2002.

BARROS, R. F. M. Efeito da radiação solar sobre o crescimento e produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* var. *Stenophylla* Leonard. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 143p. 1992. **(Dissertação de mestrado)**.

BOORHEM, R. L. **Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais**. Reader's Digest Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1999. 416 p.

BRAINERD, K. E.; FUCCHIGAMI, L. O. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.107, n.5, p.515-518, 1981.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimatização de plantas: abordagens recentes**. ABCTP Notícias, CNPH/EMBRAPA. Brasília, DF. 12p, 1996.

COLL, J. B.; RODRIGO, G. N.; GARCÍA, B. S.; TOMES, R. S. **Fisiologia Vegetal**. 6 ed. Madri: Pirâmide, 1988. cap.8: Morfogeneses: p.569-570.

DÍAZ-PEREZ, J. C.; SUTTER; E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v.95, p.225-32, 1995.

DUNSTAN, D. I.; TURNER, K. E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I. K. (Ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and applications**. Orlando: Academic, v. 1, p.123-129, 1984.

FRÁGUAS, C. B. Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo-de-Valinhos' em diferentes ambientes. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003. **(Dissertação de Mestrado)**

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, p.99-169, 1990.

HARARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v.85, n.12, p.1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.21-24, 2002.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum**, v.13, p. 382-383, 2002.

NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p. 11-18, 2001.

OLIVEIRA, A. F. M. Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil. Departamento de Botânica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 125 p.,1995. **(Dissertação de Mestrado)**.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.234-9, 2001.

PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta enxerto de citros Tangerina sunki x Trifoliata English 63- 256 com o uso de sacarose e ácido indol-butírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.1, p.66-70, 2002.

RIBAS, A. F.; DENIS, F.; QUOIRIN, M.; AYUB, R. A. Misturas vitamínicas na regeneração do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* deg.) **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.237-241, 2002.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R.; DUTRA, L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. V.27, n.2, p.255-260, mar./abr., 2003.

SILVA, A. T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J. S.; ANTUNES, L. E. C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.49-53, 1995.

SUTTER, E. Stomatal and Cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.113, n.2, p.234-8, 1988.

VANTELGEN, H. J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botânica Neerlandica**, v.41, n.4, p.453-9, 1992.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; PIO, L. A. S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan./March, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de plantas medicinais contribui para o controle parcial ou total de alguns problemas de saúde, favorecendo para a melhoria da qualidade de vida das pessoas, além do seu uso, cultivo e comercialização, é uma alternativa de renda para agricultura familiar. É importante aumentar o apoio à pesquisa científica nesta área e investir mais no cultivo dessas plantas, com isto protege-se as espécies do extrativismo predatório.

O mercado de medicamentos fitoterápicos e, conseqüentemente, de plantas medicinais é crescente e promissor na geração de emprego e renda, segmento importante e representativo para o Brasil. Embora haja demanda de plantas medicinais, informações relacionadas às técnicas de cultivo e métodos de propagação são necessárias para aproximar os pequenos produtores desse mercado promissor.

O direcionamento das pesquisas no sentido de garantir matéria-prima suficiente para atender as exigências do mercado viabiliza a técnica de multiplicação *in vitro*. Através desse trabalho foi possível a aquisição de mudas de espécies medicinais *Vernonia condensata* e *Justicia pectoralis*, de alta qualidade fitossanitária produzidas em curto espaço de tempo.

A multiplicação *in vitro* dessas espécies foi eficiente com a utilização de gemas axilares introduzidas em meio MS com a adição da citocinina BAP, o que promoveu maior número de brotações, na concentração 1,0 mg. L⁻¹. Para o desenvolvimento destas, foi demonstrado que é possível obter-se plantas aptas para a aclimação, sem a utilização de auxina no meio de cultura.

Durante o desenvolvimento do trabalho buscou-se avaliar as condições de propagação *in vitro* que fossem capazes de garantir resultados satisfatórios para o

estabelecimento de um protocolo de multiplicação para *V. condensata* e *J. pectoralis*. Por serem espécies muito exploradas, necessitam ser multiplicadas em grande quantidade, garantindo a conservação destas em seu habitat natural sem o risco de serem extintas.

A metodologia utilizada assegurou 100% de sobrevivência das microplantas de alumã e anador durante a fase de aclimação, independente da adição exógena de BAP ou AIB. O protocolo desenvolvido pode ser utilizado como base para a obtenção de grande número de mudas de alumã e anador com o objetivo de suprir as necessidades crescentes no mercado farmacológico ou destinadas a fins científicos.