

Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L.

Juliana de Magalhães Bandeira¹, Cláudia Simone Madruga Lima², Sílvia Rubin¹, Márcia Vaz Ribeiro¹, Antelmo Ralph Falqueto³, José Antonio Peters⁴ e Eugenia Jacira Bolacel Braga⁴

Introdução

Devido à grande popularidade das plantas medicinais, aromáticas e condimentares nas áreas de culinária, farmacêutica e medicina natural, proporcionando investimento em pesquisas para a ampliação do conhecimento sobre os compostos fitoterápicos presentes nas espécies de interesse [1, 2].

A família Lamiaceae tem distribuição cosmopolita, é considerada de grande importância como medicinal e condimentar [3], principalmente pela presença de óleos essenciais aromáticos [4, 5], utilizados na culinária, indústria de perfumes e também na forma de aromatizante de licores [6]. O tomilho, *Thymus vulgaris* L., é uma espécie originária da Europa, contendo em seu óleo essencial o timol, carvacrol, cimol, borneol, linalol, cimeno e pineno, além de taninos.

A micropropagação consiste de uma metodologia eficiente na produção de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética. Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas sadias em grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação, obtendo avanços importantes nos campos de genética, fisiologia e patologia [7]. No entanto, há poucos trabalhos sobre a cultura *in vitro* de *Thymus vulgaris* L..

O carbono exógeno no meio de cultivo serve como fonte de energia, influenciando na fisiologia da planta, diferenciação e crescimento dos tecidos, indução e diferenciação de órgãos. Para as plantas é necessário energia, esta pode ser oriunda da fotossíntese ou de outra fonte de carboidratos [8]. Na cultura *in vitro*, geralmente utiliza-se 20-30 g L⁻¹ de sacarose, adicionados ao meio de cultivo [9].

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, mas na verdade é o responsável pela variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco, tipo de tampa e quantidade de meio presente. A forma de vedação empregada interfere nas trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, ocasionando o aumento da concentração de CO₂ e etileno dentro dos frascos se for utilizada vedação hermética [10].

O etileno é um gás produzido pelos vegetais e pode influenciar no desenvolvimento das culturas *in vitro*. Seus efeitos deletérios podem ser controlados pelo tipo de vedação dos frascos, sendo que, este fator é mais relevante do que a composição do meio de cultura [11].

Considerando o exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação e o desenvolvimento *in vitro* de tomilho sob a influência de três tipos de vedação (algodão, filme de polivinilcloreto e papel alumínio) e diferentes concentrações de sacarose.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Como explantes foram utilizados segmentos nodais, contendo duas gemas axilares, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, extraídas de plantas pré-estabelecidas *in vitro* de *Thymus vulgaris* L..

Para o desenvolvimento do experimento utilizou-se o meio MS [12] acrescido de três concentrações de sacarose (30, 40 ou 50 g L⁻¹) e 100 mg L⁻¹ de mioinositol. O pH foi ajustado para 5,8 e, subsequentemente, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar. Os meios de cultura foram distribuídos em frascos com capacidade de 300 mL (40 mL/frasco), esterilizados em autoclave por 20 minutos à temperatura de 120°C e 1 atm de pressão. Em câmara de fluxo laminar os explantes foram inoculados e os frascos vedados com alumínio, algodão ou filme de polivinilcloreto (zap). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C, 16 horas de fotoperíodo e 48 μmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons, por 40 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de um esquema fatorial 3x3, tendo como variáveis independentes a concentração de sacarose e a vedação dos frascos. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento, representadas cada uma, por um frasco contendo quatro explantes. As variáveis analisadas foram altura e comprimento da raiz principal (cm), assim como número de raízes, de folhas, entrenós, brotos e gemas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Capão do Leão, RS. Caixa Postal 354, CEP 96010-900. E-mail: bandeira_jm@hotmail.com

2. Aluna da Faculdade de Agronomia - FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Bolsista de Iniciação Científica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

4. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Apoio financeiro: CAPES e FAPERGS.

Resultados e discussões

Mediante as condições em que os explantes de *Thymus vulgaris* foram submetidos, observou-se que houve interação significativa entre os fatores para todas as variáveis analisadas.

Para a altura das plantas a maior média foi obtida com 30 g L⁻¹ de sacarose em frascos vedados com algodão (12,75 cm). Observou-se, contudo que concentrações mais elevadas de sacarose, no mesmo sistema de vedação, provocaram um déficit do crescimento da parte aérea (Tab. 1). Para a variável número de gemas, observou-se que a maior média foi obtida no tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose e vedação algodão (40,75) diferindo estatisticamente dos demais, que apresentaram médias consideravelmente menores. O aumento da concentração de sacarose ocasionou um decréscimo no número de gemas em todos os tipos de vedações (Fig. 1A). Quanto ao número médio de folhas, houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo a maior média alcançada no tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose e frascos vedados com algodão, sendo que nos outros tratamentos, as médias obtidas foram menores. O aumento das concentrações de sacarose ocasionou um decréscimo no número de folhas, fato observado para todos os tipos de vedações (Fig. 1B).

Os resultados referentes aos parâmetros de crescimento da parte aérea de plantas de tomilho, em frascos vedados com algodão, podem ser justificados pela maior aeração e maior incidência de luminosidade para as plantas. Este tipo de vedação permite maiores trocas gasosas entre o ar atmosférico e o ambiente do interior dos frascos, permitindo melhor transpiração das folhas e impedindo o acúmulo de etileno, que pode ser prejudicial à multiplicação *in vitro* [10].

Debergh *et al.* [13] confirma que a presença de etileno parece estar relacionada a uma redução na lignificação da parede celular. Assim, o tipo de vedação estaria envolvido na melhor aeração, permitindo a eliminação do etileno para o meio externo e não na redução da umidade interna do frasco.

Os dados observados correspondentes ao desenvolvimento da parte aérea de plantas de tomilho, altura, número de gemas e folhas apresentaram melhores resultados com dosagem menor de sacarose (30 g L⁻¹). Médias menores para essas variáveis foram observadas com as concentrações maiores de sacarose em qualquer sistema de vedação. Este fato pode estar relacionado com a diminuição da capacidade fotoautotrófica das plantas cultivadas com concentrações maiores de sacarose, o que afetaria o desenvolvimento da parte aérea das mesmas [14]. A atividade da enzima fixadora de carbono, RubPcase, nas folhas de certas espécies *in vitro*, é significativamente prejudicada pela sacarose exógena do meio de cultura [15], e conforme Langford e Wainwright [16], a absorção de CO₂ pode ser incrementada por meio da redução gradativa da concentração de sacarose nos sucessivos subcultivos. Os níveis de sacarose, normalmente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila [17].

Em contrapartida, Cuzzuol *et al.* [18] observou que a taxa de propagação foi 40% menor e o comprimento das

brotações decaiu 30% nos frascos vedados com algodão, em comparação aos frascos vedados com alumínio e zap. Esses resultados podem ter sido influenciados pela interação entre o tipo de vedação e o tipo de substância geleificante, neste caso "Gelrite".

Para as variáveis número e comprimento das raízes, os frascos vedados com algodão e 30 g L⁻¹ de sacarose apresentaram as maiores médias, sendo que o aumento desta concentração não foi prejudicial ao enraizamento (Tab. 1). Lane [19] constatou que concentrações inferiores a 2% e superiores à 5% prejudicam o enraizamento. Segundo Calvete *et al.* [8], para haver enraizamento, há necessidade de um nível ótimo de carboidratos, e que alguns são mais eficientes que outros. Em contrapartida, dados analisados por Riquelme *et al.* [20] em morangueiro, batata, menta e videira, demonstram que baixas concentrações de sacarose são insuficientes para o desenvolvimento das raízes.

George *et al.* [21] relatam que, para formação de raízes *in vitro* há necessidade de energia na forma carboidratos, sendo estes fornecidos através da fotossíntese (em condições autotróficas) ou oriunda de uma fonte exógena de açúcar (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos). Os resultados obtidos com vedação hermética (filme de polivinilcloro) foram influenciados negativamente pelo acúmulo de etileno. Segundo Kerbauy [22], o crescimento das raízes é promovido por concentrações baixas de etileno e inibido, em concentrações mais elevadas deste gás.

Com o presente estudo concluiu-se que o sistema de cultivo *in vitro* mais adequado para multiplicação de *Thymus vulgaris*, tanto do desenvolvimento da parte aérea quanto do sistema radicular, foi em frascos vedados com algodão contendo meio MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose.

Referências

- [1] NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. *Fitoterapia – Plantas Medicinais: Guia para Profissionais da Saúde*. Ed. Premier. São Paulo, 2002.
- [2] PANIZZA, S. *Plantas que curam – Cheiro de mato*. Ed. Ibrasa. 24ª edição. São Paulo, 2001
- [3] LIMA, C.S.M.; SANTOS L.S.; SCHMITZ, D.D.; BEDUHN, F.A.; BRAGA, E.J.B. *Estabelecimento e germinação in vitro de Pimpinella anisum L.* In: Anais do XIII Congresso de iniciação científica UFPel, 2004, Pelotas, 2004.
- [4] LEUNG, A.Y. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetic*. New York – Chichester: Wiley, 1980.
- [5] VANDEN B.C.O. *THE THERAPEUTIC VALUE OF THYMUS SPECIES*. FITOTERAPIA 1983; v.4: 171-174.
- [6] *Martindale: The Extra Pharmacopoeia, 29th edition*. (Reynolds, JEF, editor). London: The pharmaceutical Press, 1993.
- [7] PAIVA, P. D. de O. *Estabelecimento in vitro de estrelícia (Strelitzia reginae Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura*. 1998. 84 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- [8] CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, junho 2002.
- [9] TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Volume I. Embrapa/Brasília.509p. 1998.
- [10] FILHO, W. B.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus illicifolia*. *Eclética Química*. v.27 n. especial, São Paulo, 2002

- [11]TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* v. 2,1ed. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1999. 355p.
- [12]MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture tissues. *Physiological Plant*, v.15, p.473-497, 1962.
- [13]DEBERGH, P.C.; HARBAOURI, Y; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.53, p. 181-187, 1981.
- [14]LEITE G. B.; N. F.; FORTES G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira Oh X F97. *Ciência agrotecnica*, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000
- [15]GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. n.230, p.129-134,1988.
- [16]LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. Photosynthetic ability of *in vitro* grown rose shoots in relation to media components. In: *INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURES*, 2., 1986, St. Paul Abstract... St. Paul: University of Minnesota, 1986, 433p.*Abstracts*.
- [17]GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Exegetics, 1984.
- [18]CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L.A.; ALMEIDA, M. DE; CROCOMO, O.J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. *Scientia Agrícola*. Piracicaba, Braz. v.52 n.3, Piracicaba Sept./Dec. 1995.
- [19]LANE, W. D. Regeneration of wolle plants from shoot meristem tips. *Plant Science Letters*. Amsterdam, v.13, p.281-285, 1978.
- [20]RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M.E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamento y aclimataccion em condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- [21]GEORGE, E.F. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 2. Ed., Edington: Exegetics, 1996. 1361 p. Part 2: In Practice.
- [22]KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Ed. Guanabara Koogan, São Paulo-SP, 452p. 2004.

Tabela 1. Altura média (cm), número médio de raízes e comprimento médio da raiz principal (cm) de plantas de *Thymus vulgaris*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com três concentrações de sacarose e diferentes tipos de vedação nos frascos.

Vedação dos frascos	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)		
	30	40	50
Altura média (cm) das plantas			
Alumínio	5,84 b A	5,92 a A	4,17 ab B
Algodão	12,75 a A	4,27 b B	4,45 a B
Filme de polivinilcloreto	2,50 c B	3,50 b A	2,90 b AB
Número médio de raízes			
Alumínio	5,25 ab A	4,42 a A	6,00 a A
Algodão	7,65 a A	3,20 a B	7,50 a A
Filme de polivinilcloreto	4,00 b A	5,00 a A	3,25 b A
Comprimento médio da raiz principal (cm)			
Alumínio	4,68 ab A	4,70 a A	4,57 a A
Algodão	5,42 a A	3,57 a A	3,78 a A
Filme de polivinilcloreto	2,50 b B	4,02 a A	4,07 a A

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey, em cada variável analisada.

