

Estabelecimento *in vitro* de *Matricaria recutita* Utilizando Diferentes Condições de Cultivo

Letícia Vesz Cattelan¹; Vanessa Cristina Stein²; Sérgio Alessandro Souza³; Gustavo Heiden⁴;
Míriam Valli Büttow⁵; Vera Lúcia Bobrowski⁶

Introdução

O comércio de plantas medicinais e produtos fitoterápicos encontra-se em expansão em todo o mundo em razão de diversos fatores, como o alto custo dos medicamentos industrializados ou o próprio modismo. A má qualidade destes produtos no Brasil, no entanto, é um fato conhecido [10] [6].

No momento, um grande número de plantas têm sido consideradas de potencial como produtoras de metabólitos secundários e algumas já se encontram em franco processo de utilização industrial e comercial, mas devido ao grande número de espécies vegetais existentes, podemos considerar que ainda há muito a ser pesquisado. Entre as espécies de camomila mais conhecidas está a *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), originária da Europa e Norte da África e, atualmente, está dispersa em praticamente todos os continentes [3]. A camomila é uma planta perene, herbácea, ramosa e rasteira, apresenta ramos com 10 a 30 cm de comprimento, com muitas raízes adventícias junto ao solo.

Segundo Dalla Costa [4], no país produz-se o suficiente para o consumo interno, cerca de 150 toneladas de capítulos florais secos por ano, e se a produção aumentar e os capítulos produzidos forem de boa qualidade, é possível a exportação, principalmente para a Europa, onde o consumo é grande.

A *M. recutita* L. é uma das poucas plantas medicinais cujos constituintes químicos foram exaustivamente avaliados farmacologicamente, inclusive em testes clínicos. A atividade antiinflamatória da droga deve-se à presença de óleos essenciais, ricos em azuleno, matricina e alfa-(-)-bisabolol, enquanto a atividade espasmolítica é atribuída à presença de grande concentração de flavonóides e outros constituintes fenólicos [1].

A regeneração de plântulas *in vitro*, freqüentemente utilizada para obtenção de clones que mantêm todas as características da planta mãe, é uma técnica especialmente vantajosa para a obtenção de genótipos produtores de compostos medicinais.

Segundo Torres [12] são utilizados diversos meios nutritivos, porém os meios B5 (GAMBORG) [7] e o meio MS (MURASHIGE & SKOOG) [9] são os mais

usados no cultivo *in vitro* da maioria das espécies.

Entretanto, algumas modificações genótipo-específicas devem ser feitas, no chamado meio básico, com a intenção de otimizar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada [11]

Este trabalho teve como objetivo estabelecer o cultivo *in vitro* de *M. recutita* L., para tanto foram testados os efeitos de diferentes meios e condições.

Material e Métodos

A. Experimento 1:

Para o estabelecimento *in vitro* de camomila foram utilizadas sementes obtidas comercialmente, desinfestadas em álcool etílico 70% por 2 mim e hipoclorito 20% por 20 mim, germinadas em tubos de ensaio contendo ágar MS. Após 120 dias em meio MS (meio básico), os explantes foram submetidos a meio MS com as concentrações 0; 0,22 e 0,44 e 0,66 μM de BAP (benzilaminopurina) combinados com 0 e 0,27 μM de ANA (ácido naftalenoacético). Os meios de cultivos tiveram o pH ajustado para 5,8 utilizando NaOH 1N ou HCl 1N e autoclavados a 120°C e 1,5 atm. de pressão por 20 minutos (Tab. 1).

Após inoculação o material foi mantido em câmara de crescimento a 25 \pm 1°C, fotoperíodo de 16h e 42 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Os explantes foram avaliados aos quatro, 14 e 28 dias, foram analisados a comprimento e o número de folhas por explante. O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de cinco explantes. A análise da variação foi realizada utilizando-se o programa estatístico SANEST [13].

B. Experimento 2:

Foram utilizadas plantas de camomila húngara (*Matricaria recutita* L.), onde os segmentos nodais foram repicados e colocados em frascos contendo 30mL do meio de cultura MS/2 (meio Murashige & Skoog, 1962) [9] com metade da concentração total dos sais, acrescidos de 0,89 μM de BAP.

1. Mestranda em Agronomia-Genética e Melhoramento de Plantas – Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário – C.P. 3037 - CEP 37200-000 – Lavras, MG E-mail: lvcatte@yahoo.com.br
 2. Doutoranda em Agronomia-Fisiologia Vegetal – Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário – C.P.: 3037 - CEP 37200-000 – Lavras, MG
 3. Mestrando em Genética e Melhoramento de Plantas – CCTA – Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamego, 2000 – Horto CEP: 28013-602 - Campos dos Goytacazes, RJ
 4. Biólogo - Bolsista Embrapa Clima Temperado. Rodovia BR 392, km 78 C.P. 403 - CEP: 96001-970- Pelotas, RS
 5. Mestranda em Agronomia – Fitomelhoramento, Universidade Federal de Pelotas. C.P: 354 - CEP: 96010-900 Pelotas, RS
 6. Profª Adjunta – Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas. C.P: 354 - CEP: 96010-900 Pelotas, RS
- Apoio Financeiro: CNPq.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, teve como unidade experimental cinco explantes por frasco e constou de quatro repetições por tratamento. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e diferentes densidade de fluxo luminoso (8, 22 e $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Aos quinze e trinta dias de cultivo, o material foi avaliado quanto ao comprimento do explante e número de folhas. Para análise dos resultados obtidos, as variáveis foram transformadas segundo arco $\sqrt{x+1}$ foi aplicado o teste de Duncan para comparação de médias através da utilização do pacote estatístico SANEST [13].

Resultados e Discussão

A. Experimento 1:

A análise da variação para número médio de folhas/explante e comprimento médio dos explantes obtidos nos diferentes meios testados e avaliadas em três tempos distintos permitiu observar que houve diferença significativa para os fatores espécie, meios, tempo, além de diferenças para a interação espécie x meio de cultivo e espécie e tempo em cultivo ($p < 0,05$). Porém, não houve diferença estatística significativa para a interação espécie x meios x tempo ($p > 0,05$).

Para a variável comprimento médio do explante o melhor meio (melhor desenvolvimento/crescimento) foi o M6 (MS + $0,22 \mu\text{M}$ BAP + $0,27 \mu\text{M}$ de ANA) e o pior meio o M5 (MS + $0,66 \mu\text{M}$ BAP) (Tab. 2).

Estes resultados demonstram que as respostas às diferentes concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultivo são espécie-específica, sendo a espécie *M. recutita* sensível às variações do meio.

De acordo com Dodds e Roberts [5] a suplementação de auxina-citocinina é necessária na regulação da divisão celular, alongamento celular, diferenciação celular e formação de órgãos.

B. Experimento 2:

Através da análise da variância foi possível determinar que a interação entre os fatores luz e período de cultivo apresentou diferença estatisticamente significativa (Tab. 3).

De acordo com o observado, houve diferença estatística na radiação de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no número de folhas e na altura aos 30 dias. Leite [8] descreve que a intensidade de luz pode ter um efeito pronunciado no desenvolvimento foliar e pode modificar certas características da folha, o que podemos observar neste experimento, pois nas radiações de $22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve um aumento significativo em relação a radiação mais baixa.

Costa & Ayub [3] utilizando folhas de maracujazeiro para obtenção de organogênese determinou que numa

ampla faixa de radiação $0,25$ a $9,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obtinha-se organogênese, o que corrobora a idéia de que a radiação fotossinteticamente ativa necessária para a cultura de vários órgãos e tecidos, difere entre os estágios de micropropagação, o tipo de explante e as diferentes espécies vegetais.

Conclusões

Através deste trabalho podemos concluir que para alongação do explante o meio M6 apresentam os melhores resultados. Nas condições em que o presente trabalho foi conduzido, é possível concluir que o uso de radiações fotossinteticamente ativas de 22 e $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ afetam significativamente o desenvolvimento de folhas em camomila húngara, sendo recomendado para obter maior desenvolvimento do explante radiações equivalentes às utilizadas neste experimento.

Referências

- [1] ACHTERRATH-TUCKERMANN, K. R.; FLASKAMP, E.; ISAAC, O. & THIEMER, K., 1980. Pharmakologische Untersuchungen von Kamillen-Inhaltsstoffen. *Planta Medica*, 39:38-50.
- [2] AMAT, A.G. Morfologia y anatomia comparadas de *Chamaemelum nobile* (L.) All., *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert espécies adulterantes. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, La Plata, v.1, n.2, p.81-94, 1982.
- [3] COSTA, C. M.; AYUB, R. A. Fluxo radiante na organogênese do maracujazeiro amarelo. *Scientia Agrária*. v.3, n.1-2, p.103-106, 2002.
- [4] DALLA COSTA, M.A. Processo de produção agrícola da cultura da camomila no município de Mandirituba - PR. Curitiba, 2001. 69 p. (Tese mestrado). UFPR.
- [5] DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. Experiments in plant tissue culture. Cambridge: University Press, 1999. 256p.
- [6] FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; P ETROVICK, P. R., 1985. O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Cadernos de Farmácia*, 1:73-82.
- [7] GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.151-158, 1968.
- [8] LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "in vitro" do porta-enxerto de pereira OH X F97¹. *Ciênc. Agrotec.*, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun. 2000.
- [9] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, v.15, p. 473-497, 1962.
- [10] STELLFELD, C., 1955. Da necessidade da regulamentação do comércio de plantas medicinais. *Tribuna Farmacêutica*, 22:185-189.
- [11] TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização de laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. TORRES, A.C. *et al* (eds). Brasília. EMBRAPA. Vol II.1998. 864p.
- [12] TORRES, A.C. *et al*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos. Brasília: ABCP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.
- [13] ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST- Sistema de análise estatística para microcomputadores. pelotas, RS, 1984.

Tabela 1. Nomenclatura dos meios de cultivo utilizados.

M1	MS sem reguladores
M2	MS + 0,27µM de ANA
M3	MS + 0,22µM BAP
M4	MS + 0,44µM BAP
M5	MS + 0,66µM BAP
M6	MS + 0,22µM BAP + 0,27µM de ANA
M7	MS + 0,44µM BAP+ 0,27µM de ANA
M8	MS + 0,66µM BAP+ 0,27µM de ANA

Tabela 2. Avaliação do efeito de diferentes meios de cultivo sobre número de folhas/explante e comprimento médio dos explantes para *Matricaria recutita* L.

	Número médio de folhas por explante		Comprimento médio dos explantes (cm)	
M1	2,0	A	1,8	D
M2	1,8	AB	1,8	D
M3	1,5	AB	2,3	B
M4	1,5	AB	2,3	C
M5	0	C	0,9	E
M6	1,4	B	4,0	A
M7	1,7	AB	1,8	D
M8	0,1	C	2,0	CD

-Médias seguidas de letras maiúsculas diferem entre meios dentro das colunas (P<0,05).

Tabela 3. Efeito das diferentes densidades luminosas testadas sobre a produção de folhas e comprimento de explantes de *Matricaria recutita* L. *in vitro*.

Densidade do fluxo luminoso (µmol.m ⁻² .s ⁻¹)	Número médio de folhas		Comprimento médio das folhas	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
	8	9,71 b A	11,06 b A	2,14 a A
22	9,51 b B	19,70 a A	1,86 a A	2,89 ab A
35	4,2 a A	24,18 a A	2,67 a A	4,87 a A

-Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan (p<0,01).

-Letras maiúsculas distintas nas linhas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan (p<0,01) para cada variável.