

## **Produção *in vitro* de *Baccharis myriocephala* DC: Efeitos de auxinas e citocininas.**

Alice Sato<sup>1</sup>, Simone da Silva<sup>2</sup>; Claudio Barbosa Moreira<sup>2</sup>; Sharon Santos de Lima<sup>3</sup>; Maria Aparecida Esquibel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Professora da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Departamento de Botânica, CCBS, Avenida Pasteur 458, 22290-040, Rio de Janeiro - RJ, (21) 2244-5760. E-mail: [alicesato@unirio.br](mailto:alicesato@unirio.br), <sup>2</sup>Doutorando (a) do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal (UFRJ). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Bloco G, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21952-590, Rio de Janeiro - RJ, Fone (21) 2562-6643. E-mail: [mony@biof.ufrj.br](mailto:mony@biof.ufrj.br) e [cmoreira@biof.ufrj.br](mailto:cmoreira@biof.ufrj.br); <sup>3</sup>Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal (UFRJ). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, Bloco G, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21952-590, Rio de Janeiro - RJ, Fone (21) 2562-6643. E-mail: [sharonsl@biof.ufrj.br](mailto:sharonsl@biof.ufrj.br); <sup>4</sup>Professor (a) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Bloco G, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21952-590, Rio de Janeiro - RJ, (21) 2562-6643. E-mail [esquibel@biof.ufrj.br](mailto:esquibel@biof.ufrj.br).

### **INTRODUÇÃO**

*Baccharis myriocephala* DC., pertencente a seção *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) é um subarbusto ramificado com caule triado (Nurnberg, 1997). Esta característica é comum entre as outras espécies desta seção e por serem morfológica e anatomicamente semelhantes, são todas conhecidas popularmente como carqueja (Gianello *et al.*, 2000). As carquejas apresentam como característica marcante a presença de cladódios que fazem o papel de folha, uma vez que estas estão totalmente ausentes ou mostram-se reduzidas, com função fisiológica restrita para a planta (Budel *et al.*, 2005). No Brasil, as carquejas estão entre as dez plantas mais comercializadas (Budel *et al.*, 2004), sendo amplamente utilizadas na medicina popular no combate a problemas de estômago, diabetes, reumatismo e feridas de pele (Simões-Pires *et al.*, 2005) Uma das técnicas mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais é a propagação *in vitro* ou micropropagação. Trata-se de um método rápido e eficiente para a produção em massa de plantas livres de patógenos, geneticamente uniformes e com independência da sazonalidade. A micropropagação viabiliza a produção vegetal quando há dificuldades nos mecanismos naturais de reprodução, bem como a preservação de espécies ameaçadas de extinção e a manutenção de coleções ativas ou de base de germoplasma vegetal, sendo o único recurso da cultura de tecidos vegetais que tem documentado de forma efetiva a possibilidade de se produzir espécies de interesse em larga escala [George, 1996; Honda *et al.*, 2001; Giri *et al.*, 2004]. Além de melhoramento de linhagem, métodos de seleção de linhagens de alta produção e otimização do meio podem levar a um incremento na produção de princípios ativos (Dornenburg & Knorr, 1995; Silva *et al.*, 2005).

Assim sendo, o desenvolvimento de um cultivo sistemático de plantas medicinais através da cultura de tecidos vegetais é fundamental tanto para promover o uso da própria planta como medicamento, como para permitir a conservação da biodiversidade química e a obtenção controlada de material para estudos biológicos e fitoquímicos, assegurando a sobrevivência e a disponibilidade do material genético para pesquisas científicas.

Devido à importância desta planta para múltiplos propósitos, justifica-se a aplicação de metodologia que forneça grande número de plantas de *B. myriocephala* clonadas, visando selecionar linhagens de alta qualidade para plantio extensivo e extração de fitofármacos.

### **METODOLOGIA**

Segmentos nodais obtidos de sementes germinadas *in vitro* em meio de composição básica segundo Murashige & Skoog (MS0) (Murashige & Skoog, 1962) foram subcultivados em meio básico (MS0) ou enriquecido com reguladores de crescimento em diferentes concentrações (n = 60 para cada tratamento): 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/L de Cinetina (CIN);

Benziladenina (BA) e Ácido Indolacético (AIA). As culturas foram mantidas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , iluminadas com lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz do dia) com intensidade de  $23,0 \mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ , e 16 horas de fotoperíodo, durante 60 dias. O efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre o desenvolvimento da planta quanto ao número de brotos e de gemas, a altura das plantas, o comprimento e o número de raízes por explante foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância 5%. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o *Graph Pad in Stat*, versão 3,01. Na análise das porcentagens de enraizamento conforme o meio utilizado, foi usado o teste de diferença entre porcentagens ( $p_1$  e  $p_2$ ) ao nível de 5% de significância utilizando-se o Software Statistica for Windows<sup>TM</sup>, versão 5.0.

A biomassa seca foi determinada através de pesagem individual de 30 plantas provenientes de cada tratamento em balança analítica e seca em estufa a  $50^{\circ}\text{C}$ , até peso constante, a fim de se determinar a quantidade de água presente e a relação entre peso fresco e peso seco de todas as amostras. Os resultados foram analisados da seguinte maneira: Peso seco dividido pelo peso fresco e multiplicado por 100 ( $P_s/P_f \times 100$ ). Cada determinação foi realizada em duplicata para cada tratamento e os resultados são apresentados em termos de porcentagem (%) de biomassa seca.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à organogênese de brotos, os melhores resultados foram os obtidos com 1 mg/L de CIN e com 1,0 mg/L de AIA (Figura 1 A e B), que deram origem, em média, a 7,2 e 6,7 novos brotos por explante, respectivamente, em 60 dias de cultivo (Tabela 1).

Os resultados obtidos em meios de composição básica (MS0) e o suplementado com 0,01 mg/L de AIA foram considerados os melhores e estatisticamente semelhantes em relação à produção de segmentos nodais por broto, obtendo-se em média 7 e 6 novos segmentos nodais por broto, respectivamente, após 60 dias de cultivo (Tabela 1).

Levando-se em conta que o objetivo principal deste trabalho é a produção clonal selecionando plantas para serem utilizadas em indústrias de fitomedicina, é importante que o método apresente uma taxa de multiplicação alta. Neste trabalho, o melhor tratamento usado foi o MS + 1,0 mg/L de 0,5 IAA (Figura 1A) e 0,5 mg/L de CIN (Figura 1B), pois os mesmos produziram as melhores taxas de multiplicação (1:22,9; 1:18,7 e 1:15, respectivamente) em 60 dias de cultura (Tabela 1).

Foi observado que, os melhores resultados relacionados ao alongamento das plantas foram observados em plantas provenientes do meio suplementado com AIA, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L, pois foram produzidas plantas com altura média de 6 cm. (Tabela 1).

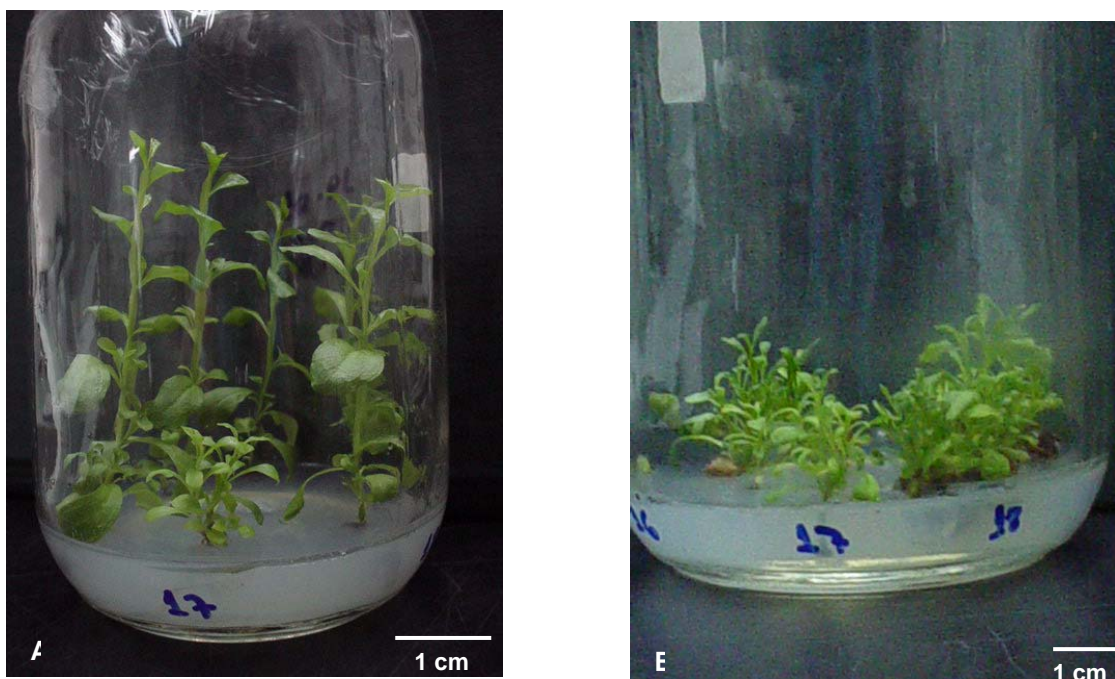
Dos meios testados, os suplementados com BAP (0,01; 0,5 e 1,0 mg/L) e com 1,0 mg/L de CIN não promoveram enraizamento. A taxa máxima de enraizamento foi obtida em meio MS acrescido de AIA, havendo uma taxa de 100% quando se utilizou 0,1 e 0,5 mg/L e 96,7% utilizando 1,0 mg/L. Já o meio enriquecido com 0,01 mg/L de AIA e o MS0 foram considerados estatisticamente semelhantes, pois promoveram a produção de 82,6 e 82,0% de enraizamento, respectivamente (Tabela 1). Um dos efeitos das auxinas em cultura de tecidos é a indução de raízes e os resultados obtidos confirmaram esse efeito.

Foi observado que de todos os meios de cultivo testados, as plantas cultivadas em meio MS acrescido de 0,01 BA e 0,1 de CIN, apresentaram as maiores taxas de massa seca, pois produziram cerca de 17,9 e 17,0% de material seco, respectivamente, em 60 dias de cultivo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeitos dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento no desenvolvimento de *Baccharis myrioccephala* cultivada *in vitro*, por 60 dias: MS0 (controle), MS + 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L de AIA; MS + 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L de BA e MS + 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L CIN.

Meios de cultura (mg/L)	Número de brotos por explante $\bar{x} \pm dp^*$	Número de segmentos nodais por explante	Taxa de multiplicação	Altura das plantas (cm) $\bar{x} \pm dp^*$	Enraizamento (%)	Biomassa seca (%)
MS0	1.4±0,6 <sup>f</sup>	7.0 <sup>a</sup>	9.9 <sup>b</sup>	2.9±2,4 <sup>d</sup>	82.0 <sup>c</sup>	14.3 <sup>d</sup>
0,01 AIA	1.6±0,9 <sup>f</sup>	6.0 <sup>b</sup>	4.5 <sup>c</sup>	4.8±2,6 <sup>b</sup>	82.6 <sup>c</sup>	16.0 <sup>b</sup>
0,1 AIA	1.6±0,6 <sup>f</sup>	5.7 <sup>b</sup>	8.4 <sup>b</sup>	3.6±1,5 <sup>c</sup>	100.0 <sup>a</sup>	13.9 <sup>d</sup>
0,5 AIA	3.9±1,9 <sup>d</sup>	5.3 <sup>c</sup>	18.7 <sup>a</sup>	6.0±1,8 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	13.4 <sup>e</sup>
1,0 AIA	6.7±3,4 <sup>b</sup>	3.7 <sup>d</sup>	22.9 <sup>a</sup>	6.0±2,4 <sup>a</sup>	96.7 <sup>b</sup>	15.5 <sup>b</sup>
0,01 BA	1.6±0,7 <sup>f</sup>	5.9 <sup>b</sup>	8.6 <sup>b</sup>	2.0±1,0 <sup>e</sup>	66.0 <sup>d</sup>	17.9 <sup>a</sup>
0,1 BA	1.2±0,4 <sup>f</sup>	1.8 <sup>e</sup>	2.1 <sup>d</sup>	1.0±0,3 <sup>f</sup>	0	7.2 <sup>g</sup>
0,5 BA	**	**	**	**	0	14.4 <sup>c</sup>
1,0 BA	**	**	**	**	0	8.5 <sup>f</sup>
0,01 CIN	1.4±0,7 <sup>f</sup>	4.8 <sup>c</sup>	6.1 <sup>c</sup>	2.3±1,6 <sup>e</sup>	34.5 <sup>e</sup>	15.5 <sup>b</sup>
0,1 CIN	2.3±1,4 <sup>e</sup>	5.0 <sup>c</sup>	9.3 <sup>b</sup>	1.7±0,7 <sup>e</sup>	18.2 <sup>f</sup>	17.0 <sup>a</sup>
0,5 CIN	4.8±2,5 <sup>c</sup>	3.6 <sup>d</sup>	15 <sup>a</sup>	1.3±0,4 <sup>f</sup>	6.0 <sup>g</sup>	15.3 <sup>c</sup>
1,0 CIN	7.2±3,0 <sup>a</sup>	1.1 <sup>e</sup>	6.8 <sup>c</sup>	1.6±0,4 <sup>e</sup>	0	14.5 <sup>c</sup>

\*Média ( $\bar{x}$ )  $\pm$  desvio padrão (dp), n = 60 por tratamento. Letras diferentes apresentam diferenças significativas ao nível de p = 0.05. \*\* brotações múltiplas sem alongamento.



**Figura 1.** Aspecto da *Baccharis myrioccephala*, cultivada *in vitro* por 60 dias em 1,0 mg/L de AIA (A) e em 1,0 mg/L de CIN (B).

## CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o efeito de auxinas e citocininas na produção *in vitro* de *Baccharis myrioccephala*. Dos tratamentos aplicados, observou-se que o meio de cultura mais eficiente para aumento da produção de mudas, alongamento e enraizamento é o suplementado com 0,5 e 1,0 mg/L de AIA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 14, n. 1, p. 41-48. 2004.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; FARAGO, P.V.; MATZENBACHER, N.I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 268-271. 2005.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 8, p. 674-684. 1995.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2: in practice. Edington, England: Exegetics Limited, v. 2. 1996.

GIANELLO, J.C.; CEÑAL, J.P.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E.; PETENATTI, M.E.; PETENATTI, E.M.; DEL VITTO, L.A. Medicamentos herbários en el centro-oeste Argentino. II. "Carquejas": control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Fam. Bonaerense**, v. 19: 99-103. 2000.

GIRI, C.C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progresses in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees and overview. **Tree**, v. 18, n. 2, p. 115-135. 2004.

HONDA, H.; LIU, C.; KOBAYASHI, T. Large-scale plant micropropagation. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 49, n. 1, p. 41-45. 2001.

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

NURNBERG, V.. Estudo fitoquímico de *Baccharis myriocephala* e uso de  $\beta$ -pineno para obtenção de orto-mentanos. Dissertação de Mestrado da Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Brasil. p. 21. 1997.

SILVA, S.; SATO, A.; LAGE, C.L.S.; SAN GIL, R.A.S.; AZEVEDO, D.A.; ESQUIBEL, M.A. Essential oil Composition of *Melissa officinalis* L. in vitro Produced under the Influence of Growth Regulators. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1387-1390. 2005.

SIMÕES-PIRES, C.A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L.A.; MATZENBACHER, N.I.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Pl. Syst. Evol.**, v. 253, p. 23-32. 2005.

## PALAVRAS-CHAVES

*Baccharis myriocephala*; Asteraceae; carqueja; cultivo *in vitro*; reguladores de crescimento.\*

---

\* Apoio financeiro: FAPERJ, CNPq e CAPES.