

## Produção de mudas de *Etilingera elatior* através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*.

Cristine Luciana de Souza Rescarolli<sup>1</sup>; Gilmar Roberto Zaffari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI). Itajaí, Santa Catarina . (47)3341-7949, e-mail: [cristine.bio@gmail.com](mailto:cristine.bio@gmail.com); <sup>2</sup> Pesquisador Responsável pelo Laboratório de Cultivo Celular, CTTMar, bloco 20, UNIVALI, Itajaí, Santa Catarina.(47)3341-7949, e-mail: [zaffari@univali.br](mailto:zaffari@univali.br)

### INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais pelo ser humano remonta à idade antiga. Sabe-se que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Cerca de 75% dos compostos puros naturais, empregados na indústria farmacêutica, foram isoladas, seguindo recomendações da medicina popular.(YUNES; CALIXTO, 2001). A espécie *Etilingera elatior*, popularmente conhecida como Bastão do Imperador, planta ornamental e medicinal, tem sido indicada segundo a medicina popular para o tratamento de dores musculares e reumatismo. Pertencente à família Zingiberaceae, possui ampla dispersão nos trópicos e subtropicais de todo mundo, principalmente no sudeste da Ásia (JOLY, 1998).

Um dos aspectos mais críticos na produção de plantas medicinais para a utilização terapêutica é, sem dúvida, a quantidade e a qualidade da matéria-prima vegetal. Vários fatores climáticos afetam diretamente a qualidade, a eficácia e a segurança do produto final. Para evitar tais problemas, e sobretudo, evitar o extrativismo descontrolado, as indústrias vêm atuando no sentido de aumentar a quantidade e melhorar a qualidade dessa matéria-prima através do cultivo de plantas medicinais em larga escala. Além de poder eliminar variações oriundas de fatores como o clima, nutrientes e luminosidade, a produção massal de plantas permite selecionar espécies com maior teor de princípios ativos, controlar pragas, ou ainda o que é fundamental, evitar a contaminação por metais pesados, inseticidas e outros fatores que podem influenciar na eficácia, qualidade e segurança clínica dos medicamentos fitoterápicos (SIANI, 2003).

A produção massal de plantas medicinais pode ser obtida através da micropropagação *in vitro*, método bastante eficiente quando se trata de produção de mudas em larga escala, fornecendo matéria-prima de alta qualidade genética e fitossanitária, em curto espaço de tempo. O presente trabalho objetivou avaliar a viabilidade do cultivo *in vitro* de *Etilingera elatior* visando à produção massal de mudas, como fonte de matéria-prima para utilização terapêutica.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no laboratório de cultivo celular vegetal, no Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, da Universidade do vale do Itajaí. Os materiais utilizados como explantes foram gemas laterais de *Etilingera elatior* provenientes de plantas matrizes em boas condições fitossanitárias, mantidas a campo, no banco de germoplasma da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) - Estação Experimental de Itajaí.

Os materiais utilizados como fonte de explante foram gemas laterais retiradas em forma de cubos com tamanho aproximado de 1 cm<sup>3</sup>. Após seccionados, os explantes foram imediatamente imersos em água destilada e submetidos à pré-desinfestação em bancada. As gemas laterais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e água destilada sob agitação, imersos em solução desinfestante contendo Benlate (1 g.L<sup>-1</sup>) + Manzate (1,5 g.L<sup>-1</sup>) + Sulfato de Estreptomicina (200 mg.L<sup>-1</sup>), por 20 minutos, e posteriormente em CaClO 4% por 2 minutos. Após a pré-desinfestação foram realizados cinco tratamentos de desinfestação em câmara de fluxo laminar com Etanol 70% e CaClO 5%: TA01 - um minuto em Etanol 70% e 30 minutos em CaClO 5%; TA02 - 2 minutos em Etanol 70% e 25 minutos CaClO 5%; TA03 - 3 minutos em Etanol 70% e 20 minutos em CaClO 5%; TA04 - 4 minutos

em Etanol 70% e 15 minutos em CaClO 5% e TA05 - 5 minutos em Etanol 70% e 10 minutos em CaClO 5%. Os explantes que apresentaram contaminação após duas semanas de cultivo, foram submetidos à nova desinfestação, com imersão por 15 segundos em etanol 70%, 5 minutos em NaClO1% e 10 minutos em CaClO 2% e posteriormente foram inoculados em meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS) com 9 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, adicionado de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Após 100 dias de incubação, os explantes estabelecidos assepticamente foram utilizados nos experimentos das fases seguintes. Na fase de proliferação os explantes foram inoculados em meio sólido de MURASHIGE & SKOOG (1962), na presença da citocinina BAP (6-benzilaminopurina), TP01: MS + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP, TP02: MS + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP, TP03: MS + 2,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP, TP04: MS + 4,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP, com três repetições por tratamento e um explante por parcela, durante 40 dias. Para o enraizamento, os propágulos foram submetidas a três tratamentos em meio MS com 50% da concentração salina, na presença e na ausência da auxina AIB (Ácido Indol Butírico), TE01: MS 50%; TE02: MS 50% + 0,5 AIB; TE03: MS 50% + 1,0 AIB, sendo 4 repetições por tratamento e 1 explante por parcela, durante 20 dias. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura de 28 ± 2°C, e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 40 a 50 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Os dados obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso na obtenção de explantes assépticos para o estabelecimento da cultura *in vitro* depende da eficiência da combinação dos agentes químicos, das concentrações e dos tempos de exposição em relação ao nível de contaminação dos tecidos. A exposição das gemas laterais de *Etilingera elatior* aos tratamentos de desinfestação resultou em níveis de contaminação que variaram de 25,00 a 66,67% e de 10,00 a 75,00% para bactérias e fungos, respectivamente (Tabela1). O aumento gradual do tempo de exposição dos explantes ao Etanol 70% (1, 2, 3 e 4 minutos) combinado com a diminuição gradual do tempo de exposição ao CaClO 5% (30, 25, 20 e 15 minutos), apresentou uma tendência de redução do nível de contaminação por bactérias, e um aumento da contaminação por fungos. Entretanto, a imersão dos explantes em Etanol 70% por 5 minutos, e CaClO 5% por 10 minutos (TA05) apresentou menor eficiência na eliminação de bactérias (60,00%) e um aumento na eficiência do controle de fungos (20,00%).

Tabela 1. Porcentagem de contaminação e sobrevivência das gemas laterais de *Etilingera elatior* submetidas à desinfestação, e inoculadas em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), adicionado de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> Benzilaminopurina (BAP), após 100 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Número de observações	Contaminação (%)		Sobrevivência/ Morte (%)
		Bactéria	Fungo	
TA01 - etanol 70% 1min + CaClO 5% 30 min	15	66,67	13,33	20,00/0,00
TA02 - etanol 70% 2min + CaClO 5% 25 min	10	30,00	40,00	30,00/0,00
TA03 - etanol 70% 3min + CaClO 5% 20 min	13	38,46	30,77	30,77/0,00
TA04 - etanol 70% 4min + CaClO 5% 15 min	08	25,00	75,00	0,00/0,00

O tratamento de desinfestação de gemas contaminadas por bactérias, após duas semanas de cultivo *in vitro*, utilizando Etanol 70% por 15 segundos; NaClO 1% por 5 minutos e CaClO 2% por 10 minutos, também apresentou uma elevada taxa de contaminação por bactérias (50,00%). Entretanto, apesar do maior tempo de exposição dos tecidos aos agentes químicos, este tratamento apresentou a maior taxa de sobrevivência de culturas assépticas. A exposição das gemas ao etanol 70% e aos compostos a base de cloro, hipoclorito de sódio e de cálcio, promoveu elevada contaminação dos explantes por bactéria. Segundo GRATTAPAGLIA E MACHADO (1998) essas contaminações bacterianas são endógenas, e a destruição destes microrganismos se torna difícil e sério problema nas fases de multiplicação das culturas. Os percentuais de sobrevivência de explantes

assépticos obtidos nos tratamentos TA01, TA02 e TA03 apresentaram uma correlação positiva com o aumento do tempo de exposição ao etanol 70%. Entretanto, o aumento do tempo de exposição das gemas laterais de 3 para 4 e 5 minutos ao etanol 70% resultou em diminuição da sobrevivência de explantes assépticos.

A indução de brotos na fase de proliferação é estimulada pela diminuição da dominância apical, que pode ser induzida por dano mecânico na gema apical ou pelo controle químico com adição de citocininas ao meio de cultura. Entretanto, o cultivo de gemas laterais de *E. elatior* em meio MS adicionado de 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP não promoveu satisfatoriamente a indução de brotos (Tabela 2). Na maioria das plantas superiores, o crescimento da gema apical inibe o crescimento das gemas laterais, enquanto que a aplicação direta de citocininas estimula a divisão celular e o crescimento dessas gemas, suprimindo o efeito inibitório do ápice caulinar (TAIZ E ZEIGER, 2004). Provavelmente, a não indução do desenvolvimento das gemas laterais na espécie *E. elatior* se deve à alta dominância apical dos propágulos, e/ou a ineficiência dos níveis de citocinina presente no meio de cultura em alterar a relação auxinas/citocininas nos tecidos. A adição de fitorreguladores em culturas vegetais *in vitro* 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 (GEORGE, 1993). Entretanto, o tempo de permanência de apenas 20 dias na presença de citocinina pode não ter sido suficiente para a indução dos brotos. Segundo PERES (2002), a falta de ação do regulador de crescimento na morfogênese *in vitro* depende da sensibilidade e do metabolismo na célula, além do nível endógeno de outros reguladores.

Tabela 2. Valores médios do crescimento e do número de raízes e brotos na fase de proliferação de gemas laterais de *Etilingera elatior*, cultivadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS) adicionado das diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP), após 20 dias de cultivo *in vitro* (N=3).

Tratamento	Crescimento dos Propágulos (cm)	Número de Raízes	Número de brotos
TP01 - MS + 0,5 BAP mg.L <sup>-1</sup>	0,53 a	0,00 a	0,00 a
TP02 -MS + 1,0 BAP mg.L <sup>-1</sup>	0,67 a	0,67 a	0,33 a
TP03 - MS + 2,0 BAP mg.L <sup>-1</sup>	0,40 a	0,33 a	0,33 a
TP04 - MS + 3,0 BAP mg.L <sup>-1</sup>	0,60 a	0,00 a	0,33 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A ação da citocinina BAP sobre o crescimento dos propágulos, não promoveu um efeito significativo mesmo com o aumento da concentração no meio de cultura. Apesar da citocinina estimular o crescimento da parte aérea, a obtenção de baixa resposta morfogênética no número de brotos e no crescimento dos propágulos pode ser devido à falta de ação do regulador de crescimento, uma vez que os propágulos apresentaram alta dominância apical.

O efeito inibitório da citocinina na indução de raízes pode ser observado nos tratamentos com maior concentração, o que corrobora com os resultados de que as citocininas são responsáveis pela inibição do crescimento e divisão celular das raízes *in vitro* (TAIZ E ZEIGER, 2004). Entretanto, apenas os explantes cultivados em meio MS adicionado de 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e que apresentaram brotação induziram a formação de raízes. Este fato pode estar relacionado à produção de auxina pela parte aérea da planta e dos brotos, pois o transporte basípeto do Ácido Indol Acético (AIA) é rápido e promove alteração no balanço endógeno auxina/citocinina.

A indução de raízes na fase *in vitro* ocorreu em todos os tratamentos. Entretanto, a rizogênese não promoveu diferenças significativas no crescimento das propágulos, no número de brotos e no comprimento das raízes (Tabela 3). A presença de brotações nesta

fase pode ser devido ao efeito residual da citocinina da fase de multiplicação, sabendo-se que o efeito da citocinina não se restringe a uma subcultura ou então devido à redução da dominância apical, realizada mecanicamente, na fase anterior.

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações de auxina (AIB) sobre o enraizamento de propágulos de *Etilingera elatior* em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) com 50% da concentração salina, após 22 dias de cultivo *in vitro*. (N=4)

Tratamento	Crescimento dos Propágulos (cm)	Número de Brotos	Número de Raízes	Comprimento das Raízes (cm)	Morfologia das Raízes
TE01 - MS 50%	2,25 a	0,00 a	2,75 ab	4,21 a	Finas com ramificações
TE02 - MS 50% + 0,5 AIB mg.L <sup>-1</sup>	2,15 a	0,50 a	4,00 a	2,52 a	Finas com ramificações
TE03 - MS 50% + 1,0 AIB mg.L <sup>-1</sup>	3,05 a	1,25 a	1,50 b	3,00 a	Grossas sem ramificações

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

O cultivo dos propágulos de *Etilingera elatior* em meio MS com 50% dos sais, adicionado de 0,5 mg.L de AIB induziu o maior número de raízes, diferindo significativamente do tratamento com o dobro da concentração de auxina. Várias espécies enraizam na presença de níveis muito baixos, ou mesmo, na ausência de auxina no meio de cultura (ANDERSON, 1984). No presente trabalho, os propágulos apresentaram resposta morfogênica positiva na indução de raízes quando da utilização de diluição na formulação do meio e da adição de baixas concentrações de auxina. De acordo com GRATTAPAGLIA E MACHADO (1998), mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais tendem a inibir as fases do enraizamento, particularmente a de crescimento das raízes, aonde as diluições das formulações básicas dos meios de cultura têm possibilitado melhor enraizamento.

As diferentes morfologias das raízes obtidas parecem estar relacionadas à concentração de auxina (AIB) presente no meio de cultura. Os tratamentos que apresentam baixa concentração (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) ou ausência de AIB induziram raízes finas com ramificações. Entretanto, a adição de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultura promoveu a indução de raízes grossas sem ramificações. ZIMMERMAN (1984) afirma que a melhor concentração de auxina é a mínima necessária para proporcionar uma iniciação radicular satisfatória desde que esta possibilite o maior crescimento e desenvolvimento das raízes sem a formação de calo. No entanto, mesmo em menores concentrações a presença de auxina durante todo o período de enraizamento pode tornar-se prejudicial ao desenvolvimento das mesmas. Possivelmente, isto pode explicar a alteração morfológica das raízes, de finas com ramificações para grossas sem ramificações no presente trabalho.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que é possível o cultivo *in vitro* de *Etilingera elatior* visando à produção massal de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, como fonte de matéria-prima para utilização terapêutica. Considerando-se que o processo de produção de mudas *in vitro* deve ser economicamente viável, há necessidade de mais estudos visando aumentar a taxa de multiplicação dos explantes, pois a espécie apresenta elevada dominância apical.

**Palavras chave:** Micropropagação; Planta medicinal; Bastão do Imperador

**Agradecimentos:** Os autores agradecem a UNIVALI pelo financiamento da pesquisa e ao Governo de Estado de Santa Catarina pela concessão da Bolsa de Pesquisa do Artigo 170.

### Referências Bibliográficas

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of Rhododendron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p.343-347, 1984.

BUTTERFLY PAVILION: **Horticulture**. Westminster. Disponível em: <<http://www.butterflies.org/hortcltr3.cfm?plantID=69>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2006.

DEBERGH, P.C.; MAENE, I.J., A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, n.14, p.335 – 345, 1981.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by tissue culture. Part 1. The technology**. 2 ed., Edington: Exegetics, 1993. 732 p.

GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M.A., **Micropropagação**. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa. Serviço de Produção de Informação, 1998.

JOLY, A.B., **Botânica: uma introdução à taxonomia vegetal**, 12.ed. São Paulo: Nacional, 1998.

KHOSH-KHUI, M.; SINK, K.C., Micropropagation of new and old world rose species. **Journal Horticultural Science**, n. 57, p. 35 -319. 1982a.

LESHEN,B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P., The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v.62, p.271-276, 1988. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa. Serviço de Produção de Informação, 1998.

MARTINEZ, E.A.; TIZIO, R.,Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from in vitro one mode cuttings. **HortScience**, n.24, p. 513. 1989.

PERES, L.E.P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.

SIANI, A.C.; et al., **Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos: Plataforma Metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio Comunicação, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: Métodos de estudo**. Chapecó.:Argos, Editora Universitária UNOESC, 2001.

ZIMMERMAN, R. H. Apple. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A. AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. eds. **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York. Macmillan, 1984. p. 369-395.