

# REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE *Catharanthus roseus* SOB DIFERENTES COMBINAÇÕES DE AUXINA E CITOCININA

RENATA LIMA DA SILVA<sup>1</sup>; CLEITON MATEUS SOUSA<sup>2</sup>; RONISCLEY PEREIRA DOS SANTOS<sup>3</sup> & RICARDO MOTTA MIRANDA<sup>4</sup>.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia. 1. Licencianda em Ciências Agrícolas, Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/UFRuralRJ; 2. Licenciado em Ciências Agrícolas, Mestrando em Fitotecnia ; 3. Licenciado em Ciências Agrícolas; 4. Professor do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRuralRJ.

## RESUMO

Verificou-se a capacidade regenerativa de explantes de segmentos nodais de *Catharanthus roseus* em meio de cultura MS suplementado com combinações de cinetina com 2,4-D, ambos nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, avaliando-se a taxa de sobrevivência, formação de tecido caloso, brotações, raízes e massas fresca e seca dos calos formados e das brotações. As melhores taxas para sobrevivência e formação de calo foram encontradas nas combinações dos maiores níveis de ambos os fitoreguladores e melhores proliferações de brotos nos menores nível de cinetina e na ausência de 2,4-D. Não houve diferença significativa nas interações de cinetina e 2,4-D para massa seca e fresca das brotações. As massas fresca e seca dos calos apresentaram maiores valores nos balanços com cinetina, independentemente dos níveis de 2,4-D.

**Palavras-chave:** Fitorregulador ; vinca; cultura de tecidos.

## ABSTRACT

### *IN VITRO* REGENERATION OF *Catharanthus roseus* NODAL SEGMENTS EXPLANTS, UNDER DIFFERENT AUXIN AND CYTOKININ COMBINATIONS

The regenerative capacity of *Catharanthus roseus* stem segments explants, inoculated in MS culture media, supplemented with combinations of kinetin and 2,4-D, both in the concentrations of 0.0; 0.1 and 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, were evaluated through the survival rates, callus formation, adventitious budding, adventitious rooting and fresh and dry matter of the formed calluses and buds. The best survival rates and callus were held at the highest levels of both growth regulators, and the best sprouts proliferation at the growth regulators absence and at the lower concentrations of kinetin. The interactions of kinetin and 2,4-D for adventitious budding, were not significant. Callus fresh and dry matter were higher under balances with kinetin, regardless the level of 2,4-D.

**Key-words:** growth regulator; periwinkle; tissue culture.

## INTRODUÇÃO

*Catharanthus roseus* (L.) Don. é uma planta herbácea, provavelmente originária de Madagascar, amplamente utilizada como ornamental, tendo porém, nas propriedades medicinais seu maior interesse.

Mais de cem alcalóides têm sido isolados de diferentes partes da planta, sendo vinblastina e vincristina os mais importantes, devido às suas propriedades anticancerígenas (Reis, 2001).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica que permite otimizar a produção e a extração destas substâncias em pequeno espaço físico e em curto período de tempo, além de promover incremento no rendimento dos produtos finais, quando comparada com

o sistema de cultivo *in vivo*. Culturas *in vitro*, têm produzido e acumulado, na maioria das vezes, metabólitos secundários em até 25 vezes a mais, em comparação com a extração a partir da planta *in vivo* (Caetano, 1993).

É crescente o interesse por medicamentos de origem natural, principalmente de origem vegetal. Em sistemas *in vivo* inúmeros fatores influenciam a produção de substâncias que apresentam princípio ativo farmacológico, comprometendo seu rendimento. Há registros de que nos Países Ocidentais cerca de 40 % dos medicamentos usam, total ou parcialmente, princípios ativos oriundos de fontes naturais (Rout *et al.*, 2000).

Atualmente vários estudos têm sido conduzidos em

relação a produção e extração dos metabólitos secundários produzidos em *Catharanthus roseus*, sendo que grande parte dos resultados são patenteados (Anonymous Chemical, 1995).

O tipo e a concentração de fitorreguladores no meio de cultura, são fatores determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1998). A formação de calos em *Tabebuia caraiba* foi favorecida quando explantes foliares foram encubados em meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (Lima & Caetano, 2002).

A melhor combinação de fitorreguladores para a multiplicação de brotos de *Catharanthus roseus in vitro*, foi 4 mM BAP e 5 mM ANA, a partir de explantes de gemas, ao longo de três sucessivos sub-cultivos (Alén & Jain, 1997).

O presente trabalho teve o objetivo de comparar a capacidade regenerativa de explantes de segmentos nodais de *Catharanthus roseus in vitro* em diferentes combinações da auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e da citocinina Sintética (6-furfurilamino-purina).

## MATERIAL E MÉTODOS

No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia do IA/UFRRJ, foi implantado um experimento no delineamento de blocos ao acaso, do tipo fatorial, com dois fitorreguladores, com três níveis de cada (tabela 1) e com 3 repetições, constituindo 27 unidades experimentais, cada uma composta por seis explantes de segmento nodal com uma gema.

**Tabela 1-** Combinações dos diferentes níveis de cinetina e 2,4-D.

		Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	1	2	3
	0,1	4	5	6
	1,0	7	8	9

Os explantes utilizados foram obtidos de *seedlings*, com aproximadamente oito semanas, oriundos de sementes germinadas *in vitro*, desinfestadas por imersão durante 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,3%.

O meio de cultura utilizado continha os sais MS (Murashige & Skoog, 1962), vitaminas (2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina), 100 mg.L<sup>-1</sup> de Inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com as diferentes combinações de cinetina e 2,4-D, na consistência semi-

sólida com 7 g.L<sup>-1</sup> de Ágar, e o pH ajustado a 5,7 antes do processo de autoclavagem. Os explantes foram inoculados em frascos com capacidade de 600 mL, contendo 50 mL de meio proposto para cada tratamento e vedados com filme de polietileno, sendo transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz ao dia a 45 µmol.m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, com temperatura de 25±3°C, permanecendo até o final do experimento.

A partir de 20 dias após a inoculação dos explantes, quando foram observados os primeiros sinais de regeneração, foram realizadas sete avaliações com intervalo semanal, observando-se a taxa de sobrevivência, formação de brotações, calo e de raízes, sendo que na última avaliação foram computadas as massas fresca e seca dos calos formados, assim como das brotações. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa durante 48 horas a 60°C, em balança analítica digital com três casas decimais.

Os dados foram submetidos a ANOVA e a separação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

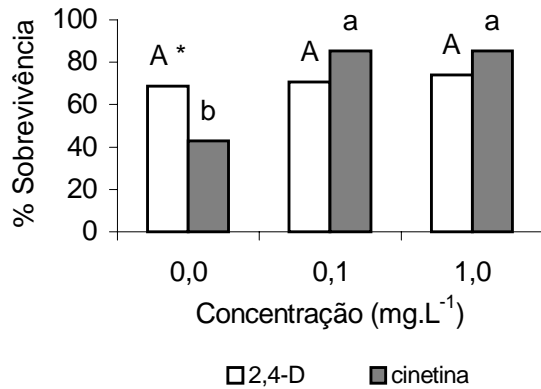
Independente do processo organogênico analisado, as maiores taxas de sobrevivência foram observadas nas três primeiras avaliações. Houve diferenças significativas quanto a taxa de sobrevivência entre os níveis de cinetina, assim como na interação com o 2,4-D. Considerando os valores médios sobre todas as avaliações efetuadas, observou-se uma tendência de apresentar melhores resultados nas combinações dos maiores níveis, em ambos fitorreguladores (Tabela 2 e Figura 1), apesar de não haver diferença significativa entre os níveis do 2,4-D. Houve redução na taxa de sobrevivência no decorrer das avaliações, ao longo do tempo.

Silva *et al.*, (2003) observaram que na ausência de fitorreguladores, ou com apenas cinetina, o número de explantes viáveis foi nulo ou desprezível, ficando clara a importância da auxina ANA, individualizada ou em conjunto com as citocininas cinetina ou TDZ, para que seja alcançada uma maior porcentagem de sobrevivência em explantes de *Baccharis trimera*.

**Tabela 2** - Taxa de sobrevivência (%) em função de diferentes combinações de cinetina e 2,4-D (média sobre sete avaliações).

		Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	60,00 CD*	84,29 AB	62,38 C
	0,1	42,86 DE	75,71 BC	93,33 AB
	1,0	26,19 E	96,19A	100,00 A

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 1-** Taxa de sobrevivência (%) em explantes de *Catharanthus roseus* em função dos diferentes níveis de cinetina e 2,4-D.

Os melhores resultados para a proliferação de brotos foram observados na ausência de fitorreguladores e no menor nível de cinetina, sendo que as combinações dos níveis de cinetina na presença de 2,4-D apresentaram tendência aos piores resultados (tabela 3).

Sousa & Miranda (2002), verificaram que explantes de *Catharanthus roseus* mostraram melhores resultados, para calogênese e regeneração adventícia em geral, quando o balanço entre AIB e BAP era altamente favorecido para a auxina. Alén & Jain (1997) obtiveram os melhores resultados para proliferação de brotos, em explantes de gemas axilares, na combinação de BAP e ANA entorno de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de cada.

Estas aparentes contradições, sugerem que, provavelmente, em explantes de *Catharanthus roseus* existem diferenças quanto ao balanço endógeno auxina/citocinina, bem como quanto a sensibilidade celular às diversas substâncias reguladoras de crescimento usados exogenamente, o que implica na necessidade de se definir experimentalmente, o balanço auxina/citocinina, para cada uma destas substâncias, visando a obtenção das respostas organogênicas que se pretende.

A concentração de citocinina utilizada na multiplicação de partes aéreas *in vitro*, além de estar

**Tabela 3 -** Percentagem de explantes que brotaram em função das diferentes combinações de cinetina e 2,4-D (médias sobre sete avaliações).

		KIN (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	60,48AB	66,67A	7,62D
	0,1	32,86C	49,05B	13,33D
	1,0	19,52CD	12,86D	10,95D*

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

diretamente ligada ao número de brotos obtidos, pode afetar diretamente o sucesso dos trabalhos, visto que concentrações supra-ótimas, dependendo da espécie, podem apresentar efeitos tóxicos, provocando entufamento nas culturas, além de vitrificação (Souza, 2003).

Segundo Silva *et al.*, (2003) a presença de auxina no meio de cultura exerce grande inibição da formação de parte aérea em *Baccharis trimera*; em ausência desse regulador, 100% dos explantes viáveis apresentaram no mínimo, início de formação de brotos. Utilizando somente cinetina houve não só formação de brotos como também início de desenvolvimento das brotações.

Para a formação de calo, houve diferença significativa entre os balanços dos fitorreguladores (kinetina e 2,4-D), havendo tendência de apresentarem melhores frequências de formação de tecido caloso nas combinações dos maiores níveis de ambos fitorreguladores (tabela 4), enquanto que na ausência de fitorreguladores não houve formação de tecido caloso. A indução de calos friáveis, segundo CID (1998), é provável que seja favorecida por uma alta relação de auxina/citocinina e de acordo com França (1999), pelo fato de os calos terem sido cultivados em presença de luz, conferindo, geralmente, maior friabilidade que os cultivados em ausência de luz.

**Tabela 4 -** Percentagem de explantes que formaram tecido caloso em função de diferentes combinações de cinetina e 2,4-D (médias sobre sete avaliações).

		Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	0,00 D*	27,62 C	62,38 B
	0,1	4,29 D	27,62 C	96,19 A
	1,0	2,86 D	90,00 A	98,57 A

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A não formação de tecido caloso na ausência de fitorreguladores, confirma observações anteriores de Sousa & Miranda (2002), que reportaram, ainda, melhores resultados na formação de tecido caloso em explantes de segmento nodal de *Catharanthus roseus* em função de diferentes combinações de AIB e BAP, quando o balanço exógeno favorecia a auxina.

Em todas as combinações de cinetina e 2,4-D estudadas, não houve diferenciação de raízes. Sousa & Miranda (2002), observaram que, quando o balanço entre AIB e BAP era altamente favorável ao AIB, havia diferenciação de raízes, mostrando mais uma vez que, provavelmente, existem diferenças quanto ao balanço

endógeno auxina/citocinina, assim como diferenças de sensibilidade celular às diversas substâncias reguladoras de crescimento.

Os resultados observados com relação à massa fresca e seca das brotações não apresentaram diferenças significativas. Quanto as massas fresca e seca dos calos formados houveram diversas tendências de resposta (tabela 5 e 6), sendo que na ausência de cinetina houve tendência de apresentar os piores resultados. O maior nível de cinetina, mesmo na ausência do 2,4-D, não diferenciou estatisticamente dos melhores resultados, encontrados nas combinações dos maiores níveis de cinetina com o maior nível de 2,4-D. Isso mostra que a presença de cinetina tem grande influência no crescimento de tecido caloso em explantes de *Catharanthus roseus*.

**Tabela 5** - Massa fresca de calo (mg) em explantes de *Catharanthus roseus* em função de diferentes combinações de cinetina e 2,4-D.

		Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	0,00 C*	43,4 ABC	71,5 ABC
	0,1	19,2 BC	15,6 BC	41,3 ABC
	1,0	0,0 C	100,00 AB	134,1 A

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 6** - Massa seca (mg) de calo em função de diferentes combinações de cinetina e 2,4-D.

		Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )		
		0,0	0,1	1,0
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0	0,00 C*	6,5 ABC	9,7 ABC
	0,1	0,9 BC	2,8 BC	14,8 ABC
	1,0	0,0 C	22,3 A	18,1 AB

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÃO

As combinações dos maiores níveis de ambos fitorreguladores tendem a apresentar melhores resultados quanto a formação de tecido caloso, acúmulo de massa fresca e seca e sobrevivência, enquanto que para a proliferação de brotos, os melhores resultados

foram encontrados nos menores níveis de cinetina na ausência de 2,4-D;

A comparação dos dados da literatura com os resultados observados neste trabalho, sugere que a regulação da morfogênese *in vitro* é diretamente condicionada à sensibilidade celular e aos níveis endógenos de auxina e citocinina, indicando a necessidade do estabelecimento de um protocolo de análise expedita destes hormônios, permitindo rápido ajuste do balanço exógeno a fim de tornar viável uma metodologia para a regulação fisiológica *in vitro* com maior precisão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALÉN, K. H.; JAIN, S. M. *In vitro* multiplication of *Catharanthus roseus*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON *IN VITRO* CULTURE AND HORTICULTURAL BREEDING, 3., 1997, Jerusalém - Israel. *Acta Horticulturae* (ISHS), n. 447, 1997. p. 167-170.
- ANONYMOUS CHEMICAL ABSTRACTS. Columbus: *American Chemical Society*, 1988-1993, v. 44, p. 119, 1995.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1998. v. 1, p. 331-353.
- FRANÇA, S. de C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Florianópolis-SC, 1999. p. 101-121.
- LIMA, A. S. B.; CAETANO, L. C. Produção de Naftoquinonas em culturas de calos de *Tabebuia caratiba* (MART) – Bignoniaceae. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53., REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 25., 2002, Recife – PE, *Resumos...* n. 61, p. 25.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, [s.l.], v. 15, p. 473-497, 1962.
- REIS, C. V. Estudos sobre Regeneração *in vitro* de

- Catharanthus roseus*, sob diferentes balanços de reguladores de crescimento. Seropédica - RJ. UFRRJ, 2001. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) .
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*. Orlando - USA, v. 188, n. 2, p. 91-120, 2000.
- SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; SALES, J. F.; DIVINO, S. P. ; BERTOLUCCI, S. K. V. Efeito da concentração de sais e fitoreguladores na indução de calos em carqueja. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. v.27, n.3, p. 541-547, 2003.
- SOUZA, C. M.; MIRANDA, R. M. Efeito do tipo de explante e da relação AIB/BAP na micropropagação de *Catharathus roseus*. *Rev. Univ. Rural - Sér. Ciên. da Vida*, Suplemento. Seropédica - RJ. v. 22, n. 2, p. 217-222, 2002.
- SOUZA, A. V. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de (*Lychnophora pinaster*). Lavras - MG. UFLA. 2003, p. 56-111. *Cap. 2*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia).