EFEITOS DO TIPO DE EXPLANTE E DIFERENTES BALANÇOS DE AUXINA E CITOCININA NA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Catharanthus roseus* (L.) G. DON [1]

CELITA VIRGÍNIA DOS REIS[2]; CLEITON MATEUS SOUSA[2]; ANA CRISTINA PORTUGAL PINTO DE CARVALHO[3], RICARDO MOTTA MIRANDA[2]

2. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais. Seropédica - RJ, 23890-000, Fax (21) 3787-3755 e-mail: rmottam@ufrrj.br; 3. Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical.

RESUMO

Explantes de ápices caulinares e de segmentos nodais de *Catharanthus roseus* foram inoculados em 16 meios de cultura diferentes, os quais continham os sais MS (Murashige & Skoog, 1962), e cada um suplementado com balanço específico de AIB e BAP, combinando as concentrações de 0,0; 2,0; 5,0 e 10,0 mg L^{-1}, de cada fitorregulador. Foram obtidas diferentes respostas morfológicas em função do tipo de explante e do balanço de fitorregulador. Explantes de ápices caulinares apresentaram melhores resultados para a maioria dos parâmetros avaliados. Rizogênese somente ocorreu na ausência de BAP. As concentrações mais elevadas de auxina em combinação com as menores concentrações de BAP tenderam a apresentar os melhores resultados para a maioria dos parâmetros avaliados

Palavras-chave: Vinca, micropropagação, cultura de tecidos, AIB (ácido indolbutírico), BAP (6-benzilaminopurina).

ABSTRACT

EFFECTS OF EXPLANT TYPE AND AUXIN AND CYTOKININ BALANCES ON IN VITRO REGENERATION OF *Catharanthus roseus* (L.) G. DON

Explants of shoot apex and of node segments of *Catharanthus roseus*, were inoculated in 16 different culture media containing MS salts (Murashige & Skoog, 1962), each one with a specific balance of IBA and BAP, combining the concentrations of 0,0; 2,0; 5,0 and 10,0 mg L^{-1}. The explant type and the growth regulators balance, affected the *in vitro* morphological response. Explants of shoot apex presented better results for most of the evaluated parameters. Rooting only occurred in the absence of BAP. Growth regulators balances with the higher auxin concentrations combined with the lower BAP concentrations, in a general way, tended to show the best results for most of the parameters evaluated.

Key words: Vinca, micropropagation, tissue culture, IBA (indolbutiric acid), BAP (6-benzylaminopurine).

INTRODUÇÃO

Catharanthus roseus (L.) G. Don, é uma planta herbácea, provavelmente originária de Madagascar, pertencente a família *Apocynaceae*, vulgarmente conhecida no Brasil como vinca, maria sem vergonha, entre outras nomenclaturas populares. Espécie amplamente utilizada como ornamental, sendo que, atualmente seu maior interesse está direcionado para o uso medicinal.

Atualmente, mais de cem alcalóides têm sido isolados nas diferentes partes de plantas de *Catharanthus roseus*, a maioria apresentando a mesma via metabólica (St-Pierre *et al*., 1999), sendo que algumas destas substâncias demonstram ação farmacológica comprovada.

Entre os diversos alcalóides encontrados em *Catharanthus roseus*, alguns são intensivamente usados como substâncias anti-cancerígenas, vinblastina e vincristina, outros utilizados como anti-hipertensivo (Tikhomiroff & Joliocoeur, 2002).

O baixo rendimento desses alcalóides em plantas

1 Parte da dissertação de Mestrado da primeira autora apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

cultivadas *in vivo*, combinado com o alto preço no mercado, justificam estudos de métodos alternativos para otimizar sua produção, assim como a extração destas substâncias, que têm se destacado como importantes medicamentos contra leucemia, doenças de Hodgkin e tumores sólidos (Verpoorte *et al*., 1993; Filippini *et al.*, 2003).

A maioria dos métodos utilizados atualmente em *Catharanthus roseus* para produção comercial destas substâncias, a partir de plantas *in vivo*, apresenta baixíssimo rendimento na extração dos princípios ativos, em torno de 0,0005% da massa seca total da planta. A fim de otimizar a produção, assim como a extração de substâncias de interesse com melhor eficiência, a cultura de tecidos vegetais tem sido empregada por vários pesquisadores (Misawa, 1994). Esta técnica 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*. O cultivo *in vitro*, têm produzido e acumulado, na maioria das vezes, metabólitos secundários até 25 vezes a mais, em comparação com a extração a partir da planta *in vivo* (CAETANO, 1993).

As diferentes classes de fitorreguladores exercem diversos efeitos no desenvolvimento das plantas *in vivo* e *in vitro*. O balanço das duas classes mais utilizadas em cultura de tecidos, auxina e citocinina, regulam a diferenciação de parte aérea, raízes e a formação de calo. Quando o balanço endógeno favorece as citocininas, normalmente, induz a diferenciação de gemas axilares e a formação de gemas adventícias (Taiz & Zeiger, 1998; Grattapaglia & Machado, 1998). As auxinas, embora estejam relacionadas à indução de calos e enraizamento (Mathur *et al*., 1995), podem ser utilizadas para estimular o crescimento da parte aérea (Eapen *et al*., 1998).

Conforme Grattapaglia & Machado (1990), entre os diversos fatores que influenciam na regeneração de culturas *in vitro*, o balanço entre os reguladores de crescimento supridos ao meio de cultura e os produzidos pela planta, são responsáveis por estímulos de respostas para a diferenciação, crescimento, multiplicação e alongamento celular. A composição e a concentração dos fitorreguladores utilizadas no meio de cultura, são determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes balanços de ácido indolilbutírico (AIB) e 6-benzilaminopurina (BAP) na regeneração *in vitro* de dois tipos de explante de *Catharanthus roseus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados *seedlings* oriundos de sementes coletadas de plantas mantidas em canteiros no Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com aproximadamente oito semanas de idade, como fonte de explantes.

O experimento foi implantado no delineamento de blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 16, sendo dois tipos de explantes, (apical - ápices caulinares e axilar - segmentos nodais, contendo duas gemas axilares); 16 combinações entre AIB e BAP (0,0; 2,0; 5,0; 10,0 mg L^{-1} de cada fitorregulador), com quatro repetições, utilizando seis explantes por cada unidade experimental.

O meio de cultura utilizado continha todos os sais sugeridos por Murasgihe & Skoog (1962), vitaminas (2 mg L^{-1} de glicina; 0,5 mg. L^{-1} de ácido nicotínico; 0,5 mg. L^{-1} de piridoxina e 0,1 mg.L^{-1} de tiamina), 100 mg.L^{-1} de inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose, 8 g.L^{-1} de agar, suplementados com as 16 combinações de AIB e BAP, pH ajustado a 5,7 antes de ser autoclavado durante 20 minutos à 121 ºC.

Inoculou-se seis explantes em cada frasco de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 16 horas de luz ao dia a 45 mmol m^{-2} s^{-1} e temperatura em torno de 25±2 ºC.

A avaliação foi realizada aos 42 dias após a inoculação dos explantes no meio de cultura. As variáveis avaliadas foram: percentual de explantes sobreviventes; percentual de explantes que formaram tecido caloso, brotações e raízes; comprimento da maior brotação (cm); massa fresca e massa seca (g), além da atribuição de conceitos de qualidade da parte aérea (notas - critério de avaliação: 0,0 - Sobreviveu, porém não regenerou; 1,0 - pequeno número de brotações e plântulas com altura inferior a 1,0 cm; 2,0 - pequeno número de brotações e plântulas com altura entre 1,0 e 3,0 cm; 3,0 - número médio de brotações e plântulas com altura entre 3,0 e 5,0 cm; 4,0 - maior número de brotações e plântulas com altura entre 5,0 e 7,0 cm; 5,0- grande número de brotações e plântulas com altura superior a 7,0 cm) e do sistema radícular (notas - critério de avaliação: 0,0 - ausência de raízes; 1,0 - início de formação de raízes; 2,0 - formação de raízes inconspícuas; 3 - formação de raízes conspícuas).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os valores obtidos em percentagem para os parâmetros: sobrevivência, explantes que formaram calo, explantes que brotaram e explantes que enraizaram, foram transformados em arco seno para fins de análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1, verifica-se que na maioria dos parâmetros avaliados, explantes de ápices caulinares (apical) apresentaram resultados superiores aos obtidos em explantes de segmentos nodais (axilar). Os dois tipos

de explantes apresentaram alta taxa de sobrevivência, acima de 98%, em contraste ao baixo percentual de enraizamento, abaixo de 1%, não havendo diferenças significativas para ambos os parâmetros.

Segundo Torres *et al*., (1998), gemas apicais normalmente apresentam maior capacidade de crescimento do que gemas axilares. Entretanto, é freqüente a opção pelo uso de gemas axilares, em função de ocorrerem em maior quantidade na planta matriz.

As diferentes respostas observadas nos dois tipos de explantes, provavelmente, é devido ao balanço hormonal endógeno presente no tecido vegetal (Grattapaglia & Machado, 1990). Sabe-se que a síntese de auxina ocorre principalmente nos ápices caulinares e que durante seu transporte do ápice para a base as auxinas exercem efeitos de dominância apical (Grattapaglia & Machado, 1990).

Tabela 1 - Efeitos de dois tipo de explante em diversas variáveis avaliadas em *Catharanthus roseus in vitro,* aos 42 dias após a implantação do experimento.

Explantes	Sob	Calo	Brot	Raiz	CQP	CB	MF	MS	CQR
Apical	99,9 a[z]	72,1a	99,4 a	0,87 a	2,1 a	2,52 a	3,40 a	0,26 a	0,30 a
Axilar	98,6 a	62,8 b	78,6b	0,35 a	1,6 b	1,74 b	2,35 b	0,18 b	0,16 b

[z] Médias na mesma coluna seguida de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: Sob - % de Sobrevivência; Calo - % de explantes que formaram tecido caloso; Brot - % de Brotações; Raiz - % de Enraizamento; CQP - Conceito de Qualidade das Plântulas (notas); CB - Comprimento das Brotações (cm); MF - Massa Fresca (g); MS - Massa Seca (g); CQR - Conceito de Qualidade de Raiz (notas).

Isso pode ser um dos fatores que explicam os melhores resultados obtidos em explantes de ápices caulinares em relação aos explantes de gemas axilares.

Apesar de não ter ocorrido diferenças entre a maioria dos balanços utilizados, os piores resultados foram registrados nas maiores concentrações de BAP, na ausência de AIB e também na combinação do maior nível de ambos reguladores de crescimento, exceto para a formação de calo.

A viabilidade da manutenção de *C. roseus in vitro*, foi satisfatória em todos os balanços estudados, apresentando taxa de sobrevivência acima de 90%. No entanto, a maioria dos balanços testados apresentaram características indesejáveis ao cultivo de plantas *in vitro*, como a formação em excesso de brotações, associadas à falta de elongamento, redução no tamanho das folhas, entrenós curtos e engrossamento exagerado dos caules. Leshem *et al.*, (1988), apontam que o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas em excesso é o principal responsável para induzir características como as observadas. QI-Guang *et al.*, (1986) observaram que o excesso de BAP inibiu a proliferação de brotos, reduziu drasticamente o número de partes aéreas por explante e promoveu a formação de calo em cultura de castanheira (*Castanea mollissima*).

Deste modo, o nível endógeno de citocininas em explantes de ápices caulinares e segmentos nodais de *C. roseus*, parece ser superior à auxina, visto que concentrações mais altas de BAP tendem a causar efeitos inibitórios, enquanto que as concentrações menores e intermediárias apresentaram os melhores resultados, o que justifica os menores conceitos de qualidade para estes tratamentos, uma vez que o comprimento das brotações foi um dos critérios para a distribuição dos conceitos de qualidade das plântulas (Figuras 1 e 2).

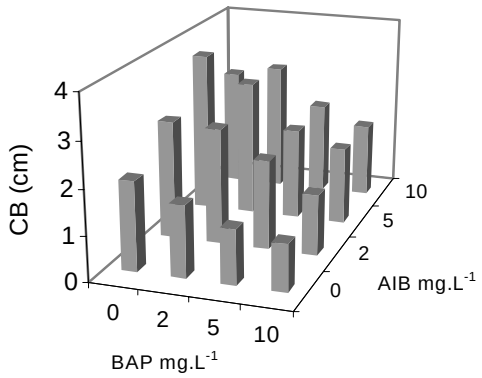

Figura 1- Efeitos de diferentes combinações de AIB e BAP no comprimento da maior brotação (CB) de *C. roseus in vitro,* independente do tipo de explante, aos 42 dias após a inoculação dos explantes nos meios.

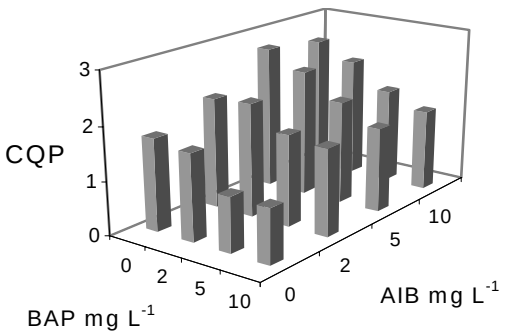

Figura 2 - Efeitos de diferentes combinações de AIB e BAP no conceito de qualidade das plântulas (CQP) de *C. roseus in vitro,* independente do tipo de explante, aos 42 dias após a inoculação dos explantes nos meios.

Os piores resultados em relação a formação de calos foram obtidos na ausência de AIB e na interação de 2,0 mg.L^{-1} AIB com 10,0 mg L^{-1} BAP, não havendo diferenças significativas entre os demais balanços, e a maior média foi encontrada no maior nível de AIB e na ausência de BAP (Figura 3), o que mais uma vez, indica que esta espécie apresenta alto teor endógeno de citocinina.

Em relação ao acúmulo de massa fresca na ausência dos fitorreguladores (0,0 mg.L^{-1} de AIB e 0,0 mg.L^{-1} de BAP) foi quando houve um menor acúmulo, e os melhores resultados tendem a ser encontrados nas combinações dos níveis mais altos de AIB com as concentrações intermediárias de BAP (Figura 4). Nestes casos, os balanços dos fitorreguladores foram os mais adequados para o incremento de massa em culturas de *Catharanthus roseus in vitro*. A massa fresca encontrada nos balanços de 5,0 e 10,0 mg.L^{-1} de AIB com 10 mg.L^{-1} de BAP, foi inferior à outros balanços provavelmente por estarem acima do nível ótimo para este parâmetro (Figura 4).

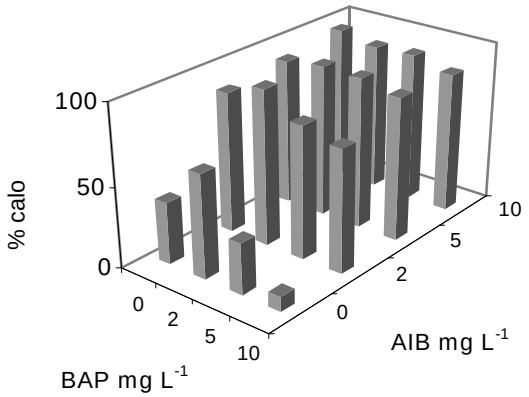

Figura 3 - Efeitos de diferentes combinações de AIB e BAP na percentagem de explantes que formaram tecido caloso, independente do tipo de explante, aos 42 dias após a inoculação dos explantes nos meios.

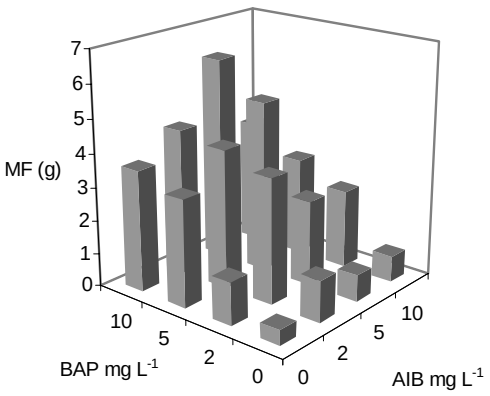

Figura 4 - Efeitos de diferentes combinações de AIB e BAP no acúmulo de massa fresca (g) em C. roseus *in vitro*, independente do tipo de explante, aos 42 dias após a inoculação dos explantes nos meios.

Os melhores resultados para o acúmulo de massa seca da parte aérea se concentraram nas combinações de 2,0 mg.L^{-1} de BAP com a presença da auxina exógena. O menor acúmulo de massa seca foi observado na ausência dos fitorreguladores (Figura 5).

O acúmulo de massa fresca e seca não apresentaram a mesma tendência dos resultados nos mesmos balanços de fitorreguladores, provavelmente, por ter ocorrido diferenças na formação de tecido caloso nestes tratamentos, podendo haver diferenças no teor de água. A inversão dos resultados nos balanços de fitorreguladores, explica a razão pela qual foi detectada diferenças significativas nas interações dos fitorreguladores (BAP e AIB) para massa fresca e não significativa para massa seca.

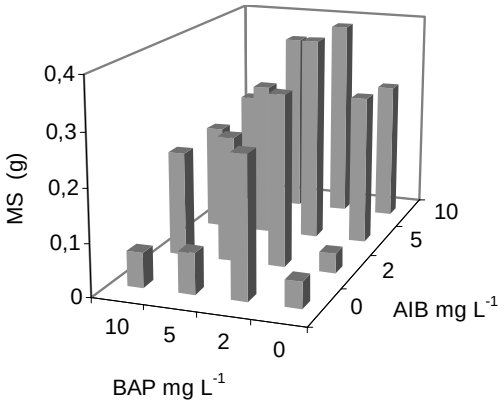

Figura 5 - Efeitos de diferentes combinações de AIB e BAP no acúmulo de massa seca (g) em *C. roseus in vitro*, independente do tipo de explante, aos 42 dias após a inoculação dos explantes nos meios.

CONCLUSÕES

A) Explantes apicais e de segmento nodais apresentaram viabilidade para a manutenção de *C. roseus in vitro*, apesar da capacidade regenerativa de explantes de ápices caulinares ser superior;

B) A regeneração de *C. roseus* ocorreu predominantemente a partir da proliferação de brotos, em alguns casos, havendo a formação de tecido caloso na base dos explantes;

C) Apesar de todos os balanços de fitorreguladores estudados serem satisfatórios para a manutenção de *C. roseus in vitro*, os balanços com 5 e 10 mg L^{-1} de AIB e 2 mg L^{-1} de BAP foram os que apresentaram melhores resultados para o incremento de massa nas culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

CAETANO , L. C. Estudo da Formação de Metabólitos Secundários em Sistemas de Cultura de Tecidos Vegetais - calos, suspensão de células, raízes normais e raízes transformadas via *Agrobacterium rhyzogenes*, folíolos normais e folíolos transformados via *A. tumefaciens*. In: I ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Brasília-DF, 1993.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* v. 53, p. 217-220. 1998.

FILIPPINI, R.; CANIATO, R.; PIOVAN, A.; CAPPELLETTI, E. M. Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus*. Fitoterapia, v. 74, n. 1-2, p. 62 - 67 , 2003.

GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A.C; CALDAS. L. S. & BUSO, J. A. (Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas*. 1. Ed. Brasília: SPI.v.1. p.183-260. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília*: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.183-260, 1990.

LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, v. 62, p.27- 276, 1988.

MATHUR, N.; RAMAWAT, K. G.; NANDWANI, D. Rapid *in vitro* multiplication of jujube through mature stem explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* v. 43, p. 75 – 77, 1995.

MISAWA, M. FAO *Agricultural Services Bulletin* nº 108. Toronto, Canada, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.

QI –GUANG, Y.; READ, P. E.; FELLMAN, C. D.; HOSIER, M.A. Effect of cytokininm IBA, and rooting regime on chinese chestnut culture *in vitro*. *Hort Science*, v. 21, p. 133 – 134, 1986.

St-PIERRE, B,; VAZQUEZ-FLOTA, F, A,; de LUCA, V,: Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *Plant Cell.* v. 11. n. 5. p. 887-900, 1999.

TAIZ , L.; ZEIGER E. *Plant Physiology*. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998.

TIKHOMIROFF, C,; JOLICOEUR, M, Screening of *Catharanthus roseus* secondary metabolites by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* A. v. 955, n. 1. p. 87-93, 2002.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C. ; CALDAS, L. S. & BUSO, J. A.(Org.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.* Brasília: SPI. p.11-19. 1998.

VERPOORTE R.; VANDERHEIJDEN, R.; SCHRIPSEMA, J.; HOGE, J. H. C.; TENHOOPEN, H. J. G. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids - present status and prospects. *Journal of Natural Products*. v.56. n. 2. p. 186-207, 1993.