

COMUNICAÇÃO

ORGANOGENESE INDIRETA EM EXPLANTES DE FOLHAS COTILEDONARES DE CALÊNDULA¹

Cristiane Maria da Costa²
Marcos Pileggi³
Ricardo Antonio Ayub^{2, 3, 4}

RESUMO

O grande interesse pela fitoterapia tem levado a um crescente extrativismo de plantas medicinais, com conseqüente desequilíbrio da própria biodiversidade. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um protocolo para propagação *in vitro* de calêndula, com base no processo de organogênese, como forma de viabilizar a produção de biomassa desta espécie. A organogênese foi estabelecida com melhores resultados quando utilizados os fitorreguladores Cinetina e ANA em conjunto, sendo obtidos 45% de explantes com gema e duas gemas por explante, as quais desenvolveram plântulas normais que foram micropropagadas facilmente em meio MS/2.

Palavras-chaves: *Calendula officinalis*, plantas medicinais, cultura de tecidos.

ABSTRACT

INDIRECT ORGANOGENESIS IN COTILEDONARY LEAF EXPLANTS OF MARIGOLD

The growth of phytoterapy has led to increased extraction of medicinal plants and, consequently, to depletion of biodiversity. This study was developed to establish a *in vitro*

¹ Aceito para publicação em 29.08.2002.

² Bolsista do CNPq.

³ Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Praça Santos Andrade, s/n, 84010-790, Ponta Grossa, PR.

⁴ E-mail: rayub@uepg.br

propagation protocol for marigold based on organogenesis to make viable the production of biomass of this species. Organogenesis was established with best results when the phytohormones Kinetin and ANA were used together, with 45% of the explants with buds and two shoots per explant being obtained, which developed normal plants easily micropropagated in MS/2 medium.

Key words: *Calendula officinalis*, medicinal plants, tissue culture.

A calêndula é planta anual e de origem incerta, pertencente à família Asteraceae. É também conhecida popularmente por maravilha-dos-jardins, bem-me-quer, malmequer, entre outros (7). As flores variam do amarelo-claro ao laranja intenso, e a planta pode atingir até 60 cm de altura. É mais produtiva no inverno, sendo resistente a geadas leves, mas pode ser cultivada o ano todo (8).

A calêndula é considerada planta ornamental, com propriedades medicinais, da qual são utilizadas, principalmente, as folhas e flores na indústria farmacêutica, como anti-inflamatório, cicatrizante e antisséptico (9). Também é utilizada na indústria de cosméticos na composição de xampus, cremes e sabonetes e na indústria de alimentos, como corante natural (4).

No Ministério da Saúde estão registradas 590 plantas medicinais para comercialização e produção de fitoterápicos; entretanto, há apenas dois relatos oficiais de cultivo, em larga escala, para atender à demanda industrial: o Jaborandi, no Maranhão, e Duboísia, no norte do Paraná (6).

O aumento do interesse pela fitoterapia tem levado a um crescente extrativismo de plantas medicinais (2). Essa coleta feita de forma intensa, desordenada e não-sustentável tem reduzido as populações naturais desta espécie e, conseqüentemente, resulta em um comprometimento do abastecimento comercial e da própria biodiversidade (6).

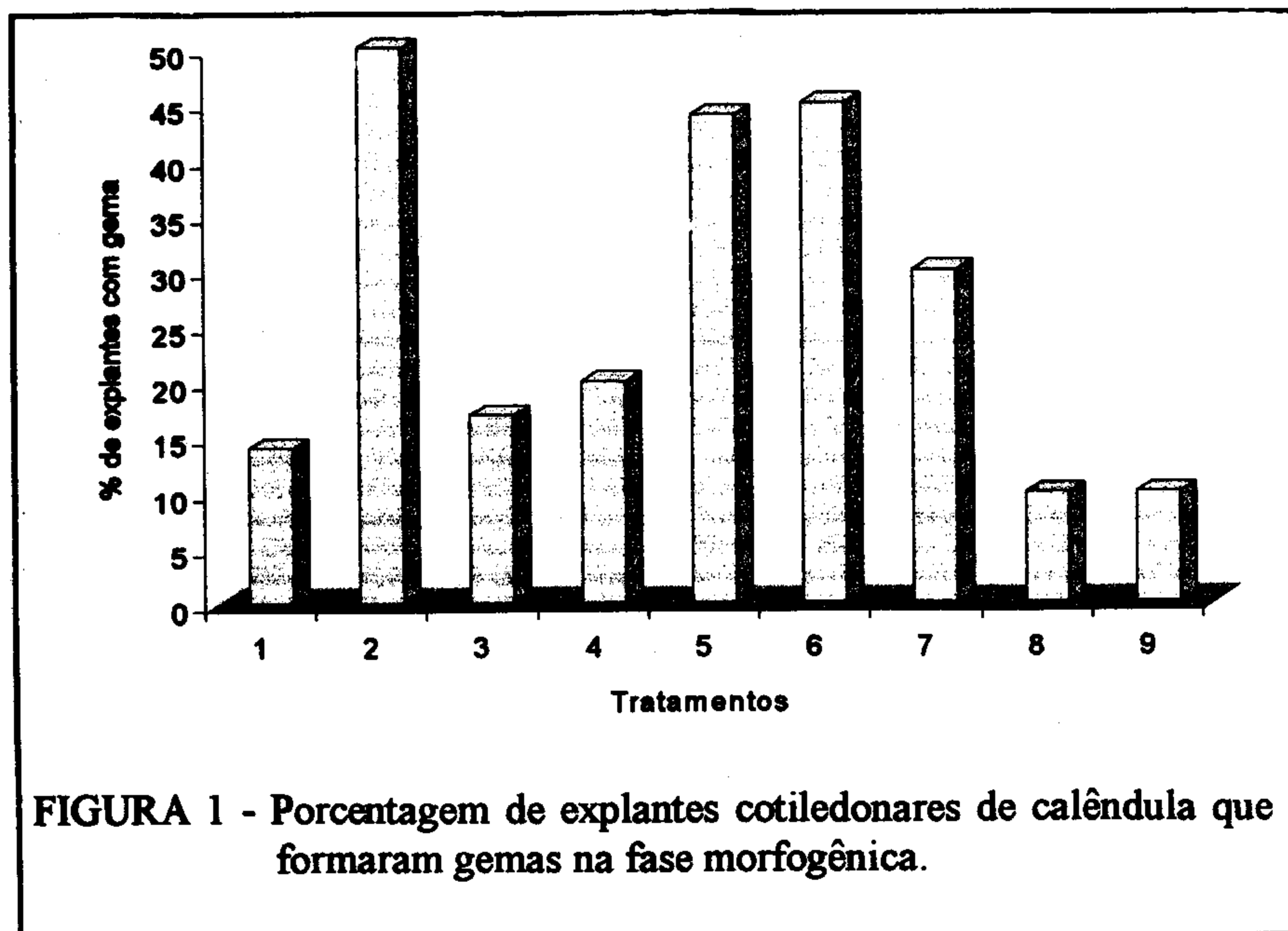
Na busca de outros meios para a produção de biomassa desta espécie, procurou-se estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* da calêndula com base no processo de organogênese.

Material e métodos. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, utilizando explantes cotiledonares com 3 mm² de tamanho, obtidos a partir de plântulas com 10 dias de idade via semínifera *in vitro* (1).

O meio de cultura utilizado foi composto pelos elementos minerais de MS (5), suplementado com a respectiva vitamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 g L⁻¹ de MES (2- (N-morpholino) ácido etanosulfônico monoidratado), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Foram adicionados a este meio 1 e 2 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina); 0,5 e 1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético); e 1, 1,5 e 2 mg L⁻¹ de Cinetina (6-furfurilanimopurina). As combinações destas concentrações constituíram os seguintes tratamentos realizados ao acaso: 1) 1 mg L⁻¹ de BAP; 2) 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ de BAP; 3) 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP; 4) 1 mg L⁻¹ de Cinetina; 5) 1 mg L⁻¹ de Cinetina e 0,5 mg L⁻¹ de

ANA; 6) 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA; 7) 2 mg L⁻¹ de Cinetina e 0,5 mg L⁻¹ de ANA; 8) 1,5 mg L⁻¹ de Cinetina e 0,5 mg L⁻¹ de ANA; e 9) 2 mg L⁻¹ de Cinetina e 1 mg L⁻¹ de ANA. Após a adição dos fitorreguladores, o pH foi corrigido para 5,8 pela adição de NaOH. O ágar foi adicionado ao meio depois do ajuste de pH. O meio foi autoclavado a 121 °C, durante 20 minutos, e em condições de câmara de fluxo laminar foram vertidos 20 mL de meio por placa de Petri e inoculados seis explantes por placa. As placas foram vedadas com filme transparente de PVC e transferidas para sala de crescimento com temperatura aproximada de 25°C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 32,5 µmol m⁻² s⁻¹ provenientes de lâmpadas branco-frias (fluorescente de 110W). Após 45 dias, as gemas que se formaram foram repicadas para o mesmo meio, porém em caixas MAGENTAS®, com 40 mL de meio cada uma. Na fase de alongamento e enraizamento dos brotos utilizou-se o meio descrito anteriormente, na metade de suas concentrações sem fitorreguladores, também em MAGENTAS®. A aclimação foi em ambiente saturado de umidade ou não, com plantas com ou sem folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos e seis repetições, e os parâmetros avaliados foram número de explantes com gemas e número de gemas por explante.

Resultados e discussão. Observa-se pela Figura 1 o efeito marcante das auxinas e citocininas no processo morfogênico *in vitro* da calêndula. A adição conjunta ao meio de cultivo MS de ANA (0,5 mg L⁻¹) + BAP (1 mg L⁻¹) (Tratamento 2) proporcionou maior porcentagem de explantes com gemas, embora sem diferir claramente dos tratamentos 5: MS + ANA (0,5 mg L⁻¹) + CIN (1 mg L⁻¹) e 6: MS + ANA (0,5 mg L⁻¹) + BAP (2 mg L⁻¹), pois não há diferença significativa entre os tratamentos (dado não-demonstrado). Destaca-se o efeito positivo de 0,5 mg L⁻¹ de ANA neste processo. O tratamento que usou o fitorregulador BAP isoladamente, Tratamento 1: MS + BAP (1 mg L⁻¹), também estimulou bom desenvolvimento de gemas (Quadro 1). Apesar desse resultado, todas as gemas formadas nos Tratamentos 1 e 2 apresentaram-se super-hidratadas e sem condições de aproveitamento. Este fato também ocorreu com Misra e Datta (3), que obtiveram aumento no número de gemas e formação de calos super-hidratados com o aumento da concentração de BAP de 0,25 mg L⁻¹ a 2 mg L⁻¹. Com o uso da metade da concentração de sais, mantendo-se apenas a concentração de sacarose a 3%, não ocorreu a hiper-hidricidade, embora houvesse calogênese, o que foi solucionado por um subcultivo na ausência de BAP após uma semana com 0,25 mg L⁻¹ de BAP. Paques e Boxus, citados por Misra e Datta (3) também tiveram melhores resultados em meio MS/2 em algumas espécies, o que foi comprovado por Ziv et al. (10) com cravo e Ziv e Gadasi (11) com pepino.

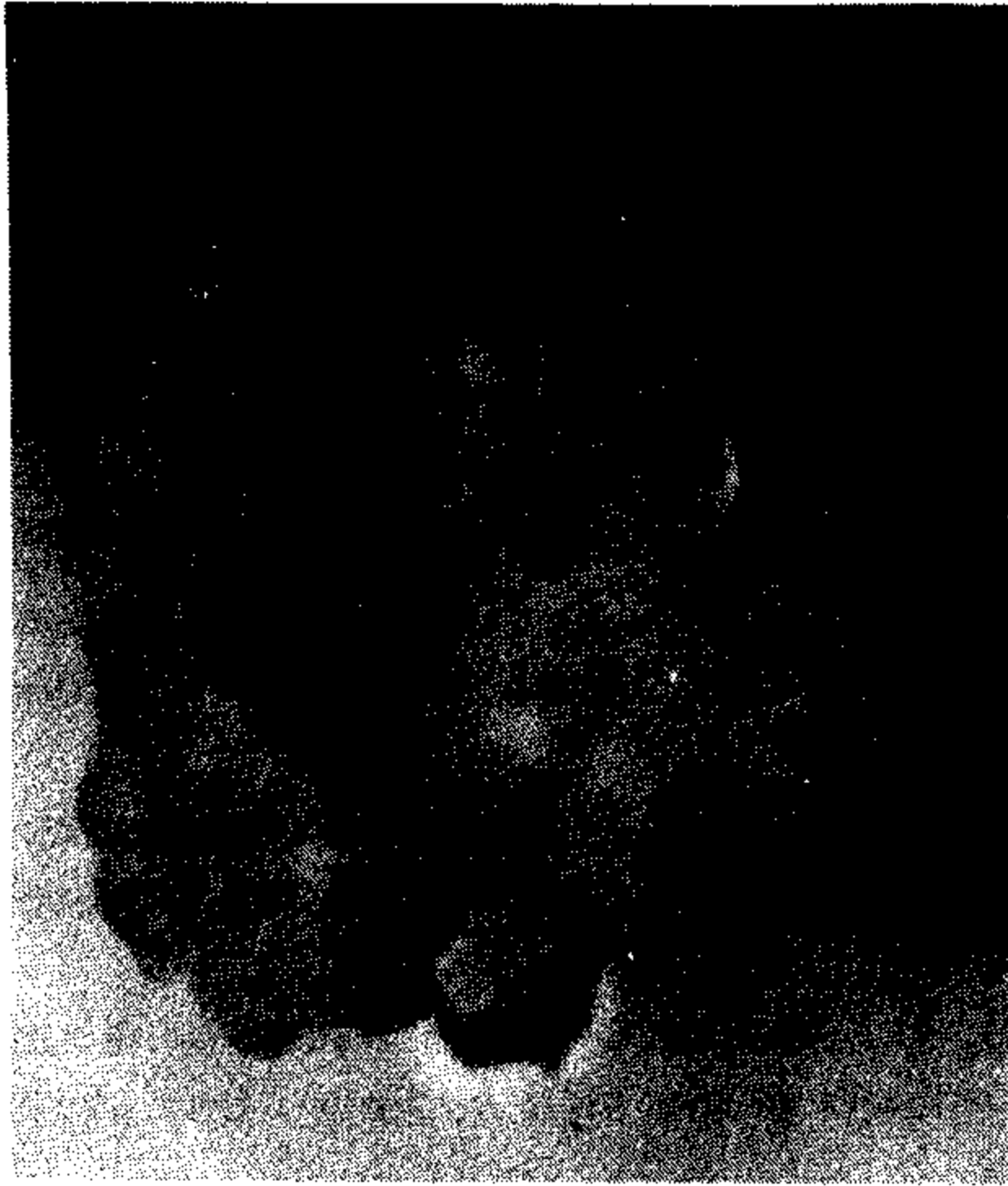


QUADRO 1 - Número de brotos formados por explante durante a fase inicial de alongamento

Tratamentos MS + fitorreguladores (mg L ⁻¹)	Média*
T2: MS + ANA(0,5) + BAP(1,0)	4,0400 a
T1: MS + BAP(1,0)	2,7478 a b
T5: MS+ CIN(1,0) + ANA(0,5)	1,9652 a b c
T6: MS + BAP(2,0) + ANA(0,5)	0,9720 b c
T7: MS + CIN(2,0) + ANA(0,5)	0,8990 b c
T4: MS+ CIN(1,0)	0,7502 b c
T9: MS + CIN(2,0)+ ANA(1,0)	0,4664 b c
T3: MS + ANA(1,0) + BAP(2,0)	0,4170 b c
T8: MS + CIN(1,5) + ANA(0,5)	0,0670 c
Coeficiente de variação = 84,6%	
(*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan a 5%.	

Os tratamentos com os fitorreguladores Cinetina e Cinetina com ANA, Tratamentos 4, 5 e 7 (Figura 1), foram eficientes na indução de gemas. Já o Tratamento 5, com uma mistura de 1 mg L⁻¹ de Cinetina e 0,5 mg L⁻¹ de ANA, foi o mais eficiente no desenvolvimento de brotos (Quadro 1)

que desenvolveram plantas normais, as quais foram propagadas *in vitro* com sucesso em meio MS/2 sem fitorreguladores (Figura 2). A elevação no teor de Cinetina em $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, Tratamento 8, teve efeito pronunciado na organogênese. As condições para aclimatação testadas até o momento não foram eficientes.



C



D

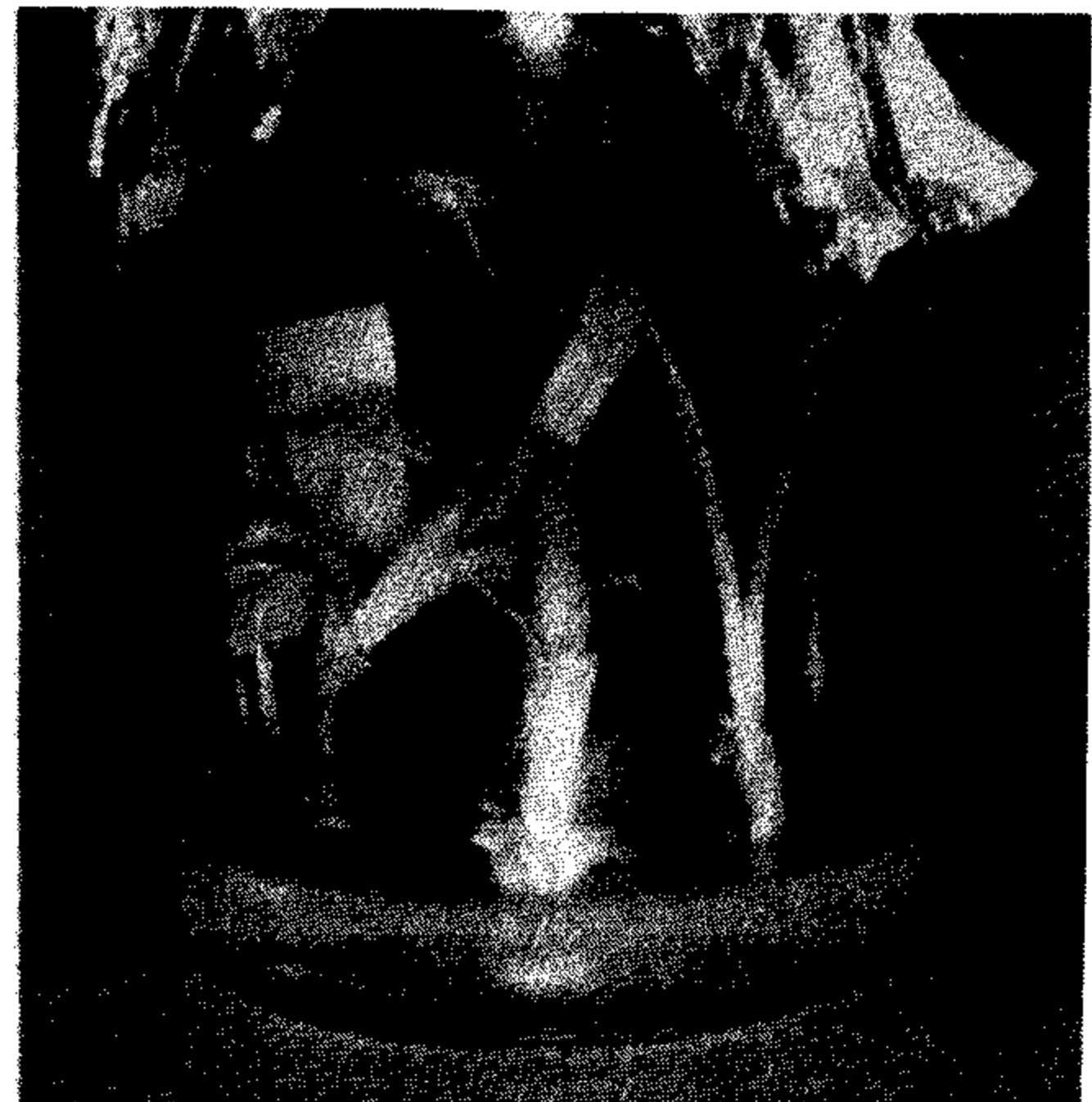
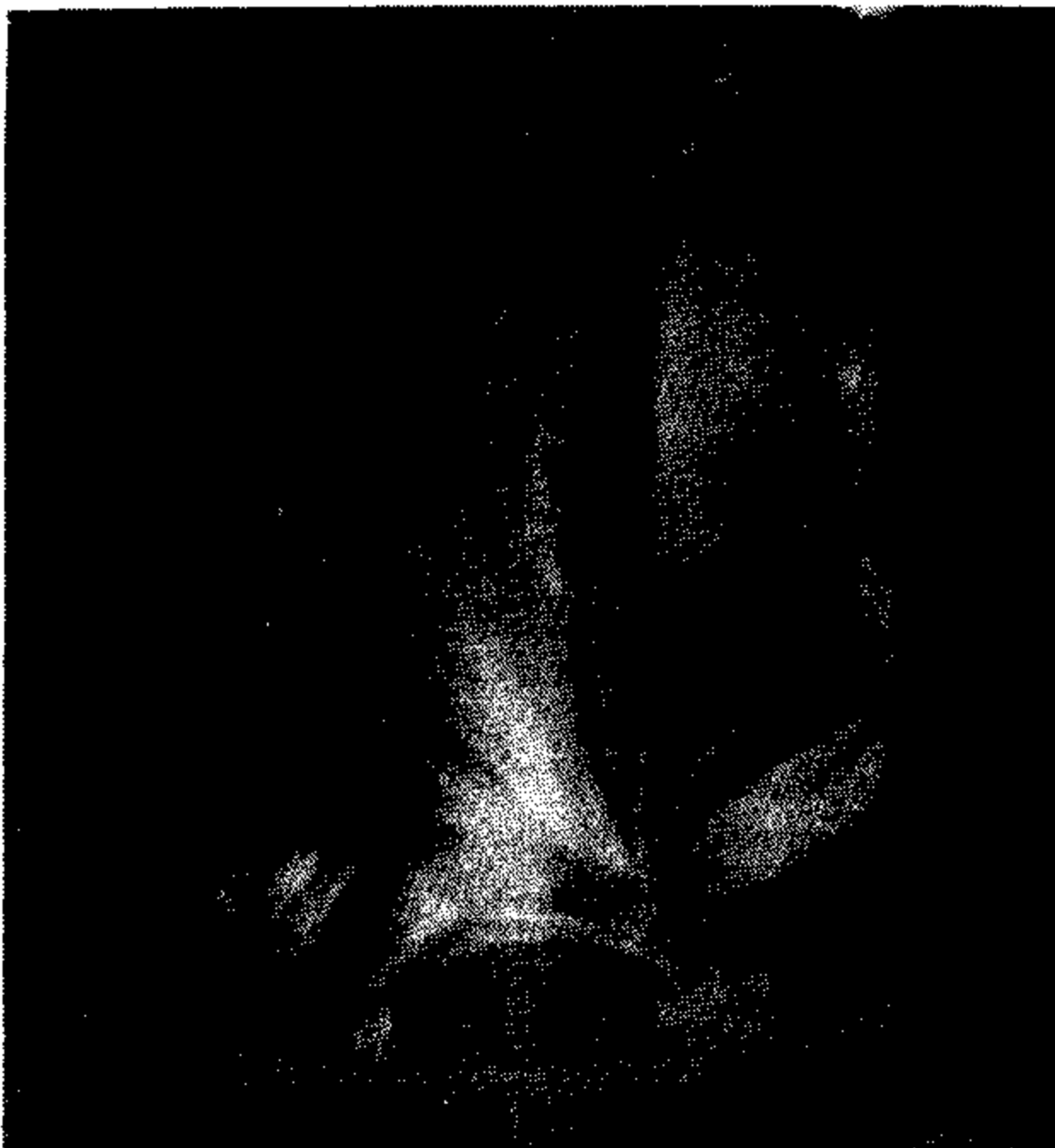


FIGURA 2 – Organogênese *in vitro* de calêndula: A) calo organogênico; B) desenvolvimento inicial de gemas; C) plântula desenvolvida *in vitro*; D) micropropagação.

REFERÊNCIAS

1. COSTA, C. M. & AYUB, R. A. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Calendula officinalis* germinadas *in vitro* com substrato de algodão ou de meio MS. Revista Ceres, 48: 609-13, 2001.
2. MING, L.C. Extrativismo compromete abastecimento de plantas medicinais. Unesp Rural, 19: 6-9, 2000.
3. MISRA, P. & DATTA, S. K. *In vitro* maintenance of F₁ hybrid. Current Science, 78: 383-4, 2000.
4. MONTANARI JR., I. Aspectos do cultivo comercial de calêndula. Agroecologia Hoje, 2: 24-5, 2000.
5. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-97, 1962.
6. PEREIRA, A.M.S. Biotecnologia de plantas medicinais. Horticultura Brasileira, 18: 55-6, 2000.
7. SCHEFFER, M.C. Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais selecionadas pelo Projeto de Fitoterapia do SUDS/Paraná. Curitiba, Fundação Caetano Munhoz da Rocha, 1989. 50p.
8. SILVA, I.; FRANCO, S.L.; MOLINARI, S.L.; CONEGERO, C.I.; MIRANDA, M.H.; CARDOSO, M.L.C.; SANT'ANA, D.M.G. & IWANKO, N.S. Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. 18 ed. Cascavel, Educativa, 1995. 203p.
9. VIEIRA, M.C.; HEREDIA Z.,N.A. & AMORIM, P.Q. Produção de biomassa de calêndula em função de tipos de diásporos e de cama de aviário. Horticultura Brasileira, 18: 980-1, 2000.
10. ZIV, M.; SCHWARTS, A. & FLEMINGER, D., Malfunctioning stomata *in vitro* leaves of carnation (*Dianthus- caryophyllus*) plants propagated *in vitro* - Implications for hardening. Plant Science, 52: 127-34, 1987.
11. ZIV, M. & GADASI, G., Enhanced embryogenesis and plant regeneration from cucumber (*Cucumis sativus* L.) callus by activated-charcoal in solid liquid double-layer cultures. Plant Science, 47: 115-22, 1986.