



Multiplicação de anador (*Justicia pectoralis*) *in vitro*

In vitro propagation of Justicia pectoralis

Rômulo Magno Oliveira de Freitas^{1*}, Narjara Walessa Nogueira², Sidney Carlos Praxedes³

Resumo: O trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação de segmentos nodais de anador (*Justicia pectoralis*). Para isso foram realizados dois experimentos. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições. Os segmentos de *J. pectoralis*, após desinfestados, foram cultivados em meio MS durante 30 dias. No primeiro experimento, esse material foi repicado em três meios de cultura (MS, WPM e B5) e após 77 dias foram avaliados comprimento de plântula, número de raízes, número de folhas e o número de segmentos nodais. Para o segundo experimento foram testadas duas citocininas (BAP e Cinetina) nas seguintes dosagens 0,0; 0,5; 5,0 e 20,0 μM . Aos 60 dias após a repicagem foram avaliadas as seguintes características: números de folhas, número de raízes e número de explantes por planta. O meio MS foi o que apresentou maior comprimento de plântula. As demais variáveis não diferiram entre os meios utilizados. Por isso o meio MS foi utilizado para o segundo experimento onde se verificou que a utilização de BAP proporcionou maior número de folhas e de explantes quando submetido à concentração de 20 μM . Dessa forma, para multiplicação de seg *Justicia pectoralis*, recomenda-se a utilização de meio MS com adição de 20 μM de BAP.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Meios de cultura. Plantas medicinais. Citocininas.

Abstract: The study aimed to establish a micropropagation protocol for *Justicia pectoralis* nodal segments. Two experiments were conducted. The statistical design was the completely randomized with 15 repetitions. After disinfection, the segments of *J. pectoralis* were inoculated in the MS culture medium for 30 days. In the first experiment, the plant material was transferred to three culture media (MS, WPM and B5). The length of seedlings, number of roots, number of leaves, and number of nodal segments were evaluated at 77 days after transferring. In the second experiment two cytokinins (BAP and Kinetin) were tested in the following concentrations: 0.0; 0.5; 5.0 and 20.0 μM . At 60 days after transplanting the number of leaves, number of roots and number of explants per plant were evaluated. The MS medium induced the highest length of seedlings, but there was no effect for the other variables. Therefore, this medium was used for the second experiment, when it was found that BAP induced a larger number of leaves and explants when applied at 20 μM . Therefore, for multiplying *J. pectoralis* nodal segments we recommend the use of MS medium with 20 μM BAP.

Key words: Cytokinins. Culture media. Medicinal plants. Tissue culture.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 29/01/2016; aprovado em 20/06/2016

¹Doutor em Fitotecnia, Instituto Federal Baiano, Valença-BA, E-mail: romulomagno_23@hotmail.com

²Doutora em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, E-mail: narjarawalessa@yahoo.com

³Doutor em Fitotecnia, Escola Agrícola de Jundiá/ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba-RN, E-mail: sidneypraxedes@gmail.com



INTRODUÇÃO

Cada vez mais se têm voltado os olhos em busca das plantas medicinais e seus derivados como agentes terapêuticos naturais por possuírem um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO et al., 2003). A demanda por medicamentos à base de plantas vem crescendo mundialmente. Nos países desenvolvidos, como alternativa mais saudável, ou menos danosa, de tratamento. Em países em desenvolvimento, como resultado do baixo acesso aos medicamentos farmoquímicos (FREITAS, 2007).

A *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leon, também conhecida como anador, vem sendo amplamente utilizada na medicina popular, no tratamento de doenças respiratórias, infecções pulmonares e reumatismo (LEAL et al., 2000; CHARIANDY et al., 1999). O princípio ativo da espécie é a cumarina, heterosídeo que possui diversas formas básicas como a metoxicumarina. Ele tem função anticoagulante e bactericida, havendo registro de seu uso no tratamento do vitiligo e de sintomas da menopausa (MARTINS et al., 2000; LOCKLEAR et al., 2010).

Ainda são muito escassas as informações disponíveis sobre o comportamento das plantas medicinais, aromáticas e condimentares quando estas são submetidas às técnicas de produção agrícola (PRAVUSCHI et al., 2010). Com o aumento na demanda, têm crescido o extrativismo e a pressão sobre determinadas espécies, o que pode levar à eliminação de indivíduos e populações, uma vez que cascas, sementes e raízes são extraídas, muitas vezes sem a preocupação com a manutenção ou reposição dos estoques naturais (MING et al., 2003). Desta forma, faz-se de grande importância estudos sobre a propagação e conservação desses materiais.

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de multiplicação rápida de mudas sadias, em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido, com alta fidelidade genética, propiciando maior produtividade, uniformidade e desempenho no campo, contribuindo, desta forma, para reduzir a pressão extrativista em áreas nativas (GEORGE, 2008). Na propagação *in vitro* a composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes para o crescimento e padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultivo (COSTA, 2006).

Atualmente são utilizados diversos meios nutritivos, porém os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) são os mais comuns, podendo na composição destes meios serem adicionados fitorreguladores, tais como as citocininas, que estimulam a quebra da dominância apical, aumentando a taxa de multiplicação por meio de brotações laterais relacionadas à atividade promovida nos meristemas (MOK et al., 2000).

A micropropagação tem sido ferramenta útil para multiplicação clonal e produção de mudas de muitas espécies medicinais de importância econômica, a exemplo de *Pfaffia glomerata* (FLORES et al., 2009), *Schinus terebinthifolius* (PAIVA; ALOUFA, 2009), *Mentha arvensis* (ARRIGONI-BLANK et al., 2011) e *Mentha x gracilis* (GARLET et al., 2011), no entanto ainda não existem relatos na literatura sobre a micropropagação do anador.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação de segmentos nodais de anador.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos (Biofábrica) do Departamento de Ciências Vegetais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN. O material vegetal foi coletado no Viveiro de Plantas Medicinais da mesma instituição.

Após a coleta, os segmentos nodais de anador foram levados para o laboratório sendo submetidos a uma lavagem em solução comercial de hipoclorito de sódio a 1% com 3 gotas de Tween 20, em 100 mL de solução, por 30 minutos. Após este período, em câmara de fluxo laminar, foram lavados por três vezes em água destilada autoclavada, para a remoção do desinfetante (FREITAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008). Em seguida os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS básico. Após 30 dias foram eliminados os materiais contaminados, e os sadios foram utilizados nos ensaios posteriores.

Teste de meios de cultura: explantes de anador foram repicados e, em seguida, inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 15 ml dos seguintes meios de cultura: MS, WPM ou B5, adicionados de 3% de sacarose. A seguir, os tubos foram levados para sala de crescimento a aproximadamente 26°C e fotoperíodo de 16 h. Após 77 dias da repicagem foram avaliados: comprimento das plântulas (mm); número de raízes; número de folhas; e número de segmentos nodais das plantas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, onde cada tratamento (tipo de meio de cultura) foi formado por 15 repetições, sendo cada explante considerado uma repetição.

Teste de citocininas: o meio de cultura que apresentou melhor resultado foi utilizado para testar dois tipos de citocininas: BAP (6-Benzilaminopurina) e Cinetina, em diferentes dosagens (0,0; 0,5; 5,0 e 20,0 µM). Após 60 dias da repicagem foram avaliados: número de explantes por planta; números de folhas; e número de raízes. O delineamento experimental e as quantidades de repetições foram as mesmas utilizadas no experimento anterior.

Pelo teste de Bartlett observamos que os dados do teste de meios de cultura não foram homocedásticos, então as diferenças entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram realizadas análises de regressão polinomial quadrática para explicar o efeito das diferentes concentrações de fitorreguladores. Todas as análises foram realizadas no software R (R Core Development Team, 2016), versão 3.3.0.

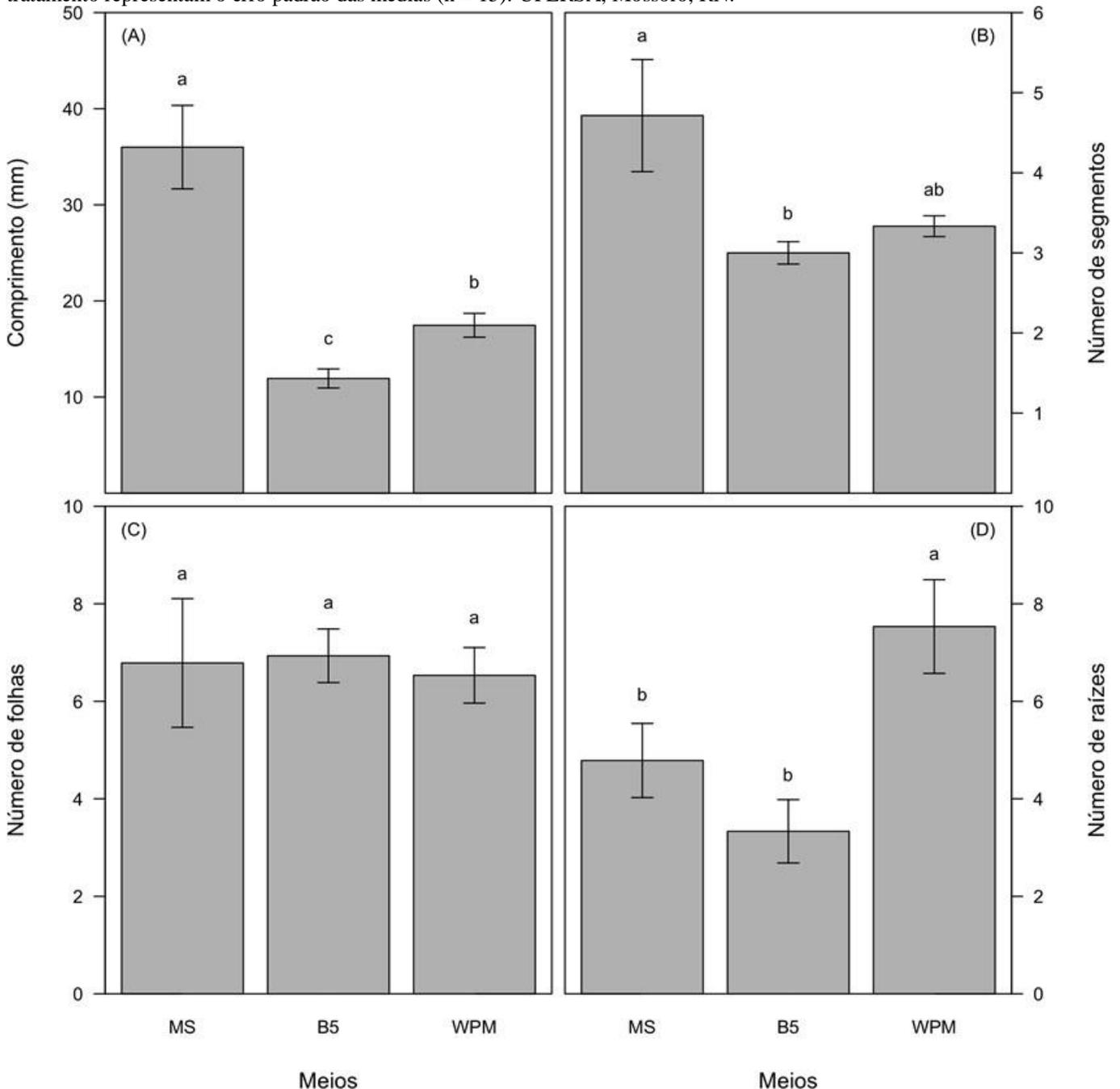
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura MS proporcionou maior comprimento da parte aérea em comparação com os meios B5 e WPM. O menor comprimento de parte aérea (12 mm) foi observado com o meio B5, sendo 66,7% menor que o encontrado no MS (36 mm) (Figura 1.A). Os meios WPM e B5 apresentam baixa concentração de nitrogênio total (14,7 e 27 µM, respectivamente) quando comparados ao meio MS (60 µM) (MORADKHANI, 2012), o que pode explicar o crescimento mais lento dos explantes.

Apesar de ausência de diferença estatística, a maior quantidade de segmentos por planta também foi obtida no meio de cultura MS (Figura 1B). Ademais, este meio proporcionou segmentos mais distanciados entre si em relação aos meios B5 e WPM. A produção de segmentos nodais é um parâmetro importante na propagação *in vitro*, pois reflete a produção de novas plantas a cada subcultivo (FLORES et al., 2009). Estudos realizados por Rocha et al. (2007) com *Cabralea canjerana* evidenciaram que o número de brotos/explante obtidos no meio WPM foi inferior ao número obtido no meio MS, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho.

Não houve diferença para o número de folhas entre os meios de cultura estudados (Figura 1C), no entanto, as folhas de plantas cultivadas no meio B5 apresentaram-se deformadas e com tamanho reduzido em relação às plantas cultivadas nos meios MS e WPM. Este efeito também foi verificado por Rocha et al. (2007), onde folhas de *Cabralea canjerana* apresentam-se pequenas e cloróticas, indicando que a composição mineral do meio WPM não foi adequada para a multiplicação da espécie. No entanto, o meio de cultura WPM tem sido muito utilizado para a propagação *in vitro* de um grande número de espécies lenhosas (VENGADESAN et al., 2002).

Figura 1. Efeito dos meios MS, B5 e WPM no comprimento das partes aéreas (A), número de segmentos nodais (B), número de folhas (C) e número de raízes durante a micropropagação de brotações de *Justicia pectoralis*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. As barras de erro sobre cada tratamento representam o erro padrão das médias (n = 15). UFERSA, Mossoró, RN.



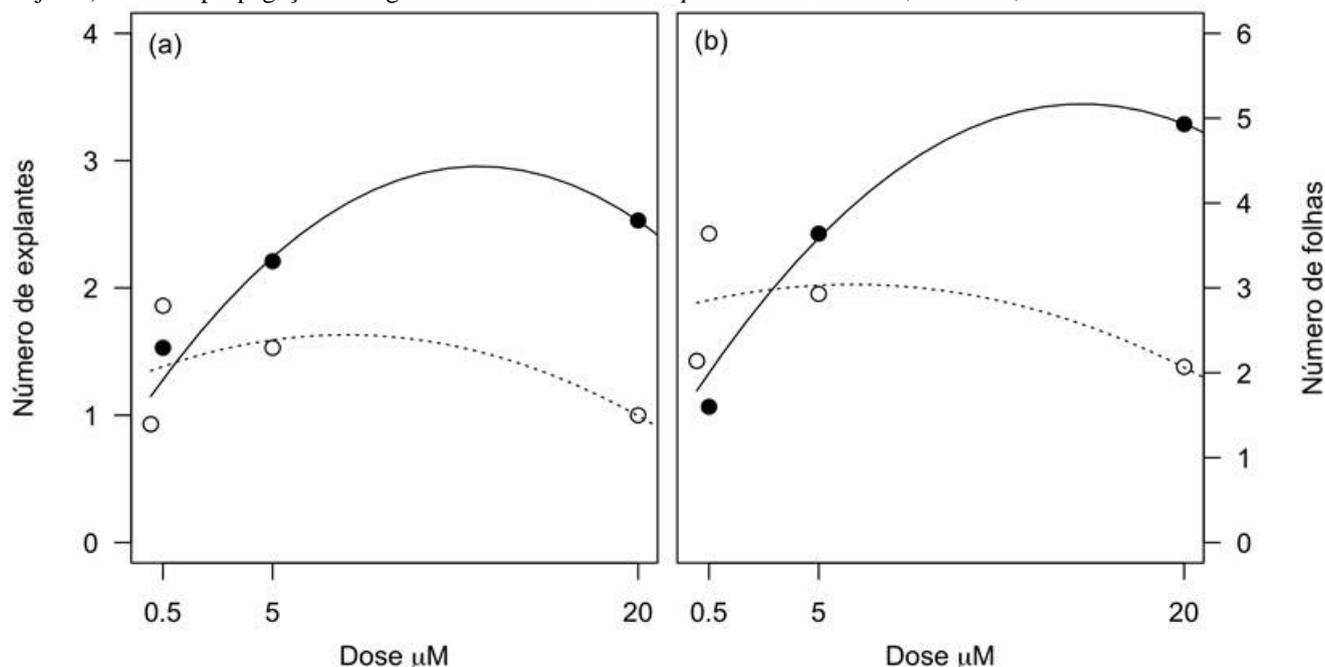
O meio de cultura WPM promoveu o surgimento de maior número de raízes em relação aos demais meios (Figura 1D). Nas plantas cultivadas no meio B5 observou-se oxidação das raízes, efeito não verificado para os meios MS e WPM. Estes resultados corroboram com os obtidos por Costa et al. (2007), em estudos realizados com *Lippia sidoides*, onde verificou-se que o meio de cultura WPM proporcionou um maior enraizamento dos explantes em relação ao meio B5. Os meios de cultura MS e WPM proporcionaram resultados estatisticamente semelhantes.

O aumento nas doses de citocininas no meio de cultura promoveu aumento na quantidade de explantes, principalmente quando se utilizou BAP, no entanto, foi possível observar efeito inibitório da Cinetina na dose mais elevada (Figura 2A). Comportamento semelhante foi observado para o número de folhas (Figura 2B). Este efeito foi verificado por Vicente; Almeida e Carvalho (2009), onde

o número de brotações por explantes de *Vernonia condensata* aumentou a medida que se aumentaram as doses de BAP, a partir daí aumentos das concentrações de BAP promoveram redução no percentual de explantes com brotações. Segundo Cantagallo et al. (2005), brotações provenientes de meio de cultura com concentrações menores de reguladores apresentam desenvolvimento vegetativo superior.

Não observamos efeito significativo das citocininas testadas no enraizamento dos explantes (dados não apresentados). Normalmente se verifica efeito inibitório de citocininas no enraizamento (FLORES et al., 2009). Este efeito, no entanto, pode variar de acordo com a espécie e idade fisiológica do material vegetal. Em nosso experimento provavelmente os explantes ainda eram muito jovens, ou seja, ainda não tinham recebido o estímulo natural para produzir raízes.

Figura 2. Efeito do 6-Benzilaminopurina (círculos pretos e linhas contínuas) e da cinetina (círculos brancos e linhas tracejadas) na micropropagação de segmentos nodais de *Justicia pectoralis*. UFRSA, Mossoró, RN.



CONCLUSÕES

Baseado em nosso experimento, recomendamos para a multiplicação de segmentos nodais de *Justicia pectoralis* a utilização de meio MS com adição de BAP em alta concentração, até 20 µM.

REFERÊNCIAS

ARRIGONI-BLANK, M. F.; COSTA, A. S.; FONSECA, V. O.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Micropropagação, aclimatização, teor e composição química do óleo essencial de genótipos de hortelã japonesa. *Revista Ciência Agrônômica*, v. 42, n. 1, p.175-184, 2011.

CANTAGALLO, F. S.; AZEVEDO, F. A.; SCHINOR, E. H.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.

Micropropagação de citrumelo 'Swingle' pelo cultivo in vitro de gemas axilares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, n. 1, p.136-8, 2005.

CHARIANDY, C. M.; SEAFORTH, C. E.; PHELPS, R. H.; POLLARD, G. V.; KHAMBAY, B. P. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal Ethnopharmacology*, v. 64, n. 3, p.265-270, 1999.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. *Horticultura Brasileira*, v. 25, n. 1, p.068-072, 2007.

COSTA, A. S. Sustentabilidade da produção de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação in vitro. 2006. Dissertação (Mestrado em

- Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.11, n. 3, p.292-299, 2009.
- FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde - Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, 2007, 15p.
- FREITAS, R. M. O.; OLIVEIRA, M. K. T.; DOMBROSKI, J. L. D.; CÂMARA, F. A. A.; NETO, R. V. S. Efeito dos tratamentos de oxidação em *Aloysia virgata*. *Revista Caatinga*, v. 22, n.1, p.151-154, 2009.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, n. 1, p.151-158, 1968.
- GARLET, T. M. B.; FLORES, R.; MESSCHMIDT, A. A. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n. 1, p.30-34, 2011.
- GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; KLERK, G. J. D. (Eds). *Plant propagation by tissue culture*. 3ed. Dordrecht: Springer, 2008. v.1, p.1-28.
- LEAL, L. K.; FERREIRA, A. A.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J.; VIANA, G. S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal Ethnopharmacol*, v.70, n. 2, p.151-159, 2000.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings of International Plant Propagation Society*, v.30, n. 1, p.421-427, 1981.
- LOCKLEAR, T. D.; HUANG, Y.; FRASOR, J.; DOYLE, B. J.; PEREZ, A.; GOMEZ-LAURITO, J.; MAHADY, G. B. Estrogenic and progestagenic effects of extracts of *Justicia pectoralis* Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. *Maturitas*, v.66, n. 1, p. 315-322, 2010.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas Mediciniais*. Viçosa: UFV, 2000. 220 p.
- MING, L. C.; SILVA, S. M. P.; SILVA, M. A. S.; HIDALGO, A. F.; MARCHESE, J. A.; CHAVES, F. C. M. Manejo e cultivo de plantas medicinais: algumas reflexões sobre as perspectivas e necessidades no Brasil. In: Coelho, M. F. B.; Júnior, P. C.; Dombroski, J. L. D. (Org.). *Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais*. Cuiabá, UNICEN, 2003, p. 149-156.
- MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis metabolism and percepcion. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v.36, n. 2 , p.102-107, 2000.
- MORADKHANI, H. Investigation of adventitious shoot regeneration from in vitro stem explants of *Melissa officinalis* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.6, n. 16, p.3217-3221, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, M. K. T.; NETO, F. B.; CÂMARA, F. A. A.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. Multiplicação in vitro de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). *Revista Caatinga*,v.21, n. 4, p.129-134, 2008.
- PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento in vitro de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*,v.11, n. 3, p.300-304, 2009.
- PRAVUSCHI, P. R.; MARQUES, P. A. A.; RIGOLIN, B. H. M.; SANTOS, A. C. P. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na produção de óleo essencial do manjeriçao (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, v.32, n. 4, p.687-693, 2010.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena. URL <http://www.R-project.org/> [Acesso em 23 de junho de 2016]. 2016.
- ROCHA, S. C.; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. P.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*, v.31, n. 1, p.43-50, 2007.
- TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.
- VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. In vitro propagation of *Acacia* species - a review. *Plant Science*, v.163, n. 5, p.663-671, 2002.
- VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação in vitro e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v.11, n. 2, p.176-183, 2009.