

Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal

Souza, A.V.¹; Pinto, J.E.B.P.¹; Bertolucci, S.K.V.¹; Teixeira, R.N.¹

¹Dept^a de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil

RESUMO: *Lychnophora pinaster* Mart., conhecida popularmente como arnica é pertencente a família Asteraceae. Suas folhas e flores aromáticas são muito utilizadas externamente pela medicina popular na forma de extrato alcoólico, como antiinflamatório e cicatrizante em machucados, contusões e hematomas. Plântulas de *Lychnophora pinaster* foram enraizadas "in vitro" e aclimatizadas em casa de vegetação. Melhor enraizamento ocorreu quando as plântulas permaneceram durante 15 dias na presença de 2,00 mg.L⁻¹ de ANA. As plântulas foram aclimatizadas com 100% de sobrevivência em o solo do local de ocorrência da espécie.

Palavras-Chave: Plantas medicinais, cultura de tecidos, enraizamento, arnica

ABSTRACT: *In vitro* rooting of arnica seedlings (*Lychnophora pinaster* Mart.), a medicinal plant. *Lychnophora pinaster* Mart., known as arnica this specie belongs to the Asteraceae family. Its aromatics leaves and flowers are utilized externally by the population in the alcoholic extract form as an anti-inflammatory and bruise healing and contusions. Plantlets o *Lychnophora pinaster* Mart., were root "in vitro" and acclimatized in greenhouse. The best rooting occurred when the plantlets stand for 15 days in 2.00 mg.L⁻¹ of NAA. The plantlets were acclimatized with 100% of survival when the soil from the occurrence place of the species was used with substrate.

Key words: medicinal plants, tissue culture, rooting, arnica

INTRODUÇÃO

O cerrado é o segundo maior bioma do país em área e se caracteriza de modo significativo pela sua vegetação (Correia, 1999). Apresenta uma flora altamente rica com predominância de espécies lenhosas de várias famílias (Ávila, 2001), além de grande número de plantas medicinais empregadas na cura de várias doenças.

Algumas plantas do cerrado encontram-se em risco de extinção acarretado pelo intenso extrativismo predatório e devido características peculiares de reprodução que dificultam sua propagação pelos métodos convencionais. Grattapaglia & Machado (1998) e França (2001), justificam que a produção de arbóreas, cujas cascas ou raízes contêm substâncias bioativas, freqüentemente se constitui em um desafio devido à germinação irregular, desenvolvimento lento de propágulos e não enraizamento.

Estudos aplicando a técnica da cultura de tecidos vem sendo realizados há décadas para um vasto número de espécies por permitir a solução de questões relacionadas a propagação e/ou manutenção da biodiversidade, além de outras importantes vantagens como a produção de substâncias bioativas.

A espécie *Lychnophora pinaster* Mart. é uma

planta medicinal de ocorrência dos cerrados brasileiros, conhecida popularmente como arnica pertencente a família Asteraceae (Semir, 1991). Ocorre de forma endêmica nos campos rupestres, campos sujos e campos limpos de altitude elevada (altos de serra) na região de cerrado do Alto Rio Grande em Minas Gerais (Rodrigues, 1998).

Suas folhas e flores aromáticas são muito utilizadas externamente pela medicina popular na forma de extrato alcoólico, como antiinflamatório e cicatrizante em machucados, contusões, hematomas e picadas de insetos. Atualmente se encontra na categoria das plantas vulneráveis a extinção. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições para o enraizamento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Lychnophora pinaster* Mart, visando desenvolver um método de propagação que auxilie a minimizar os riscos de extinção.

MATERIAL E MÉTODO

Exsicatas estão depositadas no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras sob o registro nº 198.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O meio de cultura padrão utilizado nos experimentos foi o MS/4 (Murashige & Skoog, 1962) com 7,5 g.L⁻¹ de sacarose,

solidificado com 0,6% de ágar e pH ajustado em 5,7 $\pm$ 0,1 antes da autoclavagem. Os explantes secundários utilizados para indução de enraizamento foram obtidos de segmentos nodais cultivados no meio padrão acrescido de 3 mg.L⁻¹ de GA₃ por um período de 30 dias.

Após este período, foram instalados dois experimentos de enraizamento. No primeiro experimento, o meio foi suplementado com doses crescentes de ANA (ácido naftaleno acético) nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ e alternou-se o tempo de permanência das plântulas em 1, 5; 10; 15 e 30 dias no meio suplementado com o regulador de crescimento. No segundo experimento, o meio foi suplementado com AIB (ácido indol butírico) também nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹, onde as plântulas permaneceram durante os mesmos períodos de tempo de 1, 5; 10; 15 e 30 dias, totalizando 10 tratamentos/experimento. As plântulas foram inoculadas verticalmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) vedados com tampa plástica e parafilme. Estas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura 26 $\pm$ 1^o C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 25 mmol. m⁻². s⁻¹ fornecida por lâmpadas do tipo fluorescente branca fria. O período de 30 dias foi tomado como controle. Nos demais tratamentos, após o tempo de permanência, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio de cultura na ausência do regulador. As avaliações quanto as características comprimento da parte aérea e número total de raízes, foram realizadas aos 30 dias após a transferência. O delineamento experimental utilizado para os dois experimentos, foi o inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 5, constituído de 5 repetições e 4 tubos/repetição.

Para aclimatização, as plântulas enraizadas *in vitro* foram levadas à casa de vegetação e transplantadas para copos plásticos de 50 ml contendo solo do local de ocorrência da espécie. Os copos plásticos foram cobertos com saco plástico para manutenção da umidade durante 7 dias. Após a retirada dos sacos plásticos, as plântulas foram deixadas em casa de vegetação sob sombrite 50% de sombreamento, onde permaneceram por 45 dias, totalizando 52 dias. Durante todo o período de condução do experimento, as plântulas foram irrigadas 2 vezes por semana. Ao final dos 45 dias, foi feita a avaliação quanto à porcentagem de sobrevivência das plântulas.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A vitalidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, como também a concentração de sais do meio de cultura e a presença ou não de auxinas é que vão determinar o sucesso

do enraizamento *in vitro*. Sabe-se que meios de cultura mais diluídos possibilitam melhores resultados e diluições de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS são freqüentes na fase de enraizamento, sendo os meios sólidos utilizados na grande maioria das vezes (Grattapaglia & Machado, 1998).

A presença de reguladores vegetais no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a cultura de tecido, tornando-se portanto, indispensáveis ao desenvolvimento normal das plantas, uma vez que translocam de um órgão para outro e estão envolvidos no comportamento de suas partes quando isoladas (França, 2001).

Por ser o tipo e concentração de auxina as variáveis que em geral, atuam no processo de enraizamento, quando este é estudado *in vitro*, um fator a ser considerado é a dependência entre concentração da auxina utilizada e o tempo de exposição dos explantes em sua presença, visto que estão diretamente relacionados influenciando além do enraizamento, o crescimento da parte aérea das plântulas.

Esta influência pode ser notada quando ocorre sintomas de toxidez causados pela excessiva concentração de auxina, acarretando a formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Entretanto, outros sintomas de toxidez podem manifestar-se somente na fase de alongamento das raízes.

O enraizamento em plântulas de arnica *in vitro* foi influenciado pelas auxinas utilizadas. Diferentes respostas quanto ao comprimento da parte aérea e o número de raízes/plântula foram obtidas entre as diferentes concentrações utilizadas, como também em relação ao tempo em que as plântulas permaneceram em sua presença. Todavia, algumas espécies podem permanecer na presença constante de auxina, sem que se observe toxidez (Bonilla, 2002); o que não ocorreu com a espécie *L. pinaster*.

De modo geral, quando avaliou-se o comprimento da parte aérea das plântulas cultivadas em ANA ou IBA durante diferentes períodos de tempo, através da análise de variância notou-se que entre as distintas concentrações utilizadas não ocorreu diferença estatística, como também quando esta se interage com tempo de permanência. Porém, quando o tempo em que as plântulas permaneceram na presença de ambas auxinas foram avaliados isoladamente, houve influência significativa no comprimento da suas partes aéreas (Figura 1). Quando avaliou-se o número de raízes/plântulas, resultados diferentes foram obtidos, pois todos os tratamentos influenciaram significativamente essa característica.

Maior comprimento das partes aéreas das plântulas de arnica ocorreu entre o décimo e vigésimo

dias, aproximadamente, na presença das duas auxinas. Aos 10 dias de cultivo, as plântulas apresentaram um comprimento das partes aéreas de 2,31 cm em ANA e 2,20 cm em AIB. No entanto, maior comprimento das plântulas foi observado quando elas permaneceram na presença de ANA durante 17 dias, atingindo 2,46 cm. Na presença de AIB o maior comprimento foi observado no décimo oitavo dia, quando apresentaram um comprimento de 2,30 cm (Figura 1).

Mesmo sendo baixas as concentrações das auxinas utilizadas, notou-se que quando as plântulas permaneceram durante maior período de tempo na presença delas, houve uma inibição no crescimento. Quando as plântulas foram cultivadas até o período máximo de aproximadamente 15 ou 20 dias na presença dos reguladores de crescimento, e depois transferidas para um meio isento de regulador, cresceram normalmente. Após 20 dias, pode-se verificar também na Figura 1, que o crescimento foi inibido. O reduzido crescimento ocorrido nesse caso, pode não se dever à concentração utilizada, mas talvez ao tempo de permanência das plântulas na auxina, visto que ocorre um processo de indução e iniciação de raízes e se estas permanecerem no mesmo meio; inibição do crescimento da parte aérea.

Pela concentração empregada ter sido consideravelmente baixa, quando as plântulas permaneceram na presença de ANA e AIB, durante 24 horas, não ocorreu crescimento satisfatório de partes aéreas, quando comparada àquelas que

permaneceram durante 17 ou 18 dias, pois nas duas auxinas utilizadas as plântulas, apresentaram um comprimento de 1,68 cm. Aos 5 dias de cultivo as partes aéreas inoculadas em ANA e AIB apresentaram um comprimento de 2,0 cm e 1,90 cm respectivamente. Nesse caso, quando o objetivo for menor tempo de permanência em presença de auxina, concentrações maiores devem ser empregadas, tanto para um crescimento mais rápido das partes aéreas, como também para a indução do enraizamento, como naqueles trabalhos de enraizamento *Eucalyptus* desenvolvidos por Gupta *et al.*, (1983) citados por Grattapaglia & Machado, (1998) que utilizaram diversas auxinas isoladamente ou combinadas em concentrações de 0,1 a 10 mg.L⁻¹, em intervalos de 24 a 96 horas.

Quando as plântulas de arnica permaneceram por um período constante de 30 dias nas duas auxinas, notou-se realmente uma inibição no comprimento de suas partes aéreas. Após 20 dias, aproximadamente, ocorreu um decréscimo em valores dos mesmos, sendo 1,89 em ANA e 1,94 cm em AIB.

De acordo com o exposto acima, pode-se notar que a espécie *L. pinaster*, não deve permanecer constantemente nas auxinas citadas, mesmo em concentrações consideravelmente baixas; haja vista a ocorrência de uma inibição do crescimento no tocante ao comprimento de suas partes aéreas.

Aos 15 dias aproximadamente, as plântulas de arnica já apresentavam um comprimento

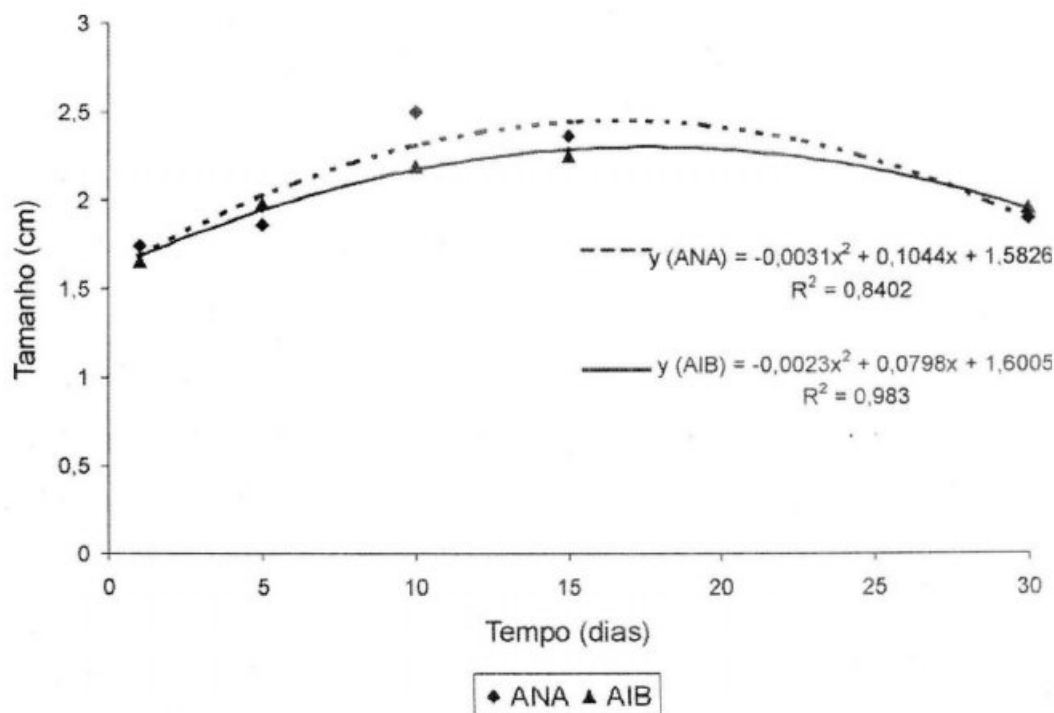


FIGURA 1 - Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *L. pinaster* em função do tempo de permanência em dias em ANA e AIB.

satisfatório de 2,00 cm das partes aéreas necessário ao enraizamento, pois é sabido que esse é um fator essencial também ao desenvolvimento de um bom sistema radicular.

Quando a característica avaliada foi o número de raízes por plântula de arnica inoculada, pôde-se inferir que este foi diretamente influenciado pelo tipo e concentrações das auxinas utilizadas, bem como pelo tempo em que as mesmas permaneceram em sua presença.

Pelos resultados obtidos, notou-se que existe uma interação entre tempo de permanência das plântulas x concentração da auxina utilizada, pois as respostas foram dependentes desses dois fatores. Sabe-se que a rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes. Nas duas primeiras fases, elas podem responder e serem dependentes de auxina, o contrário aconteceu com o crescimento das raízes que pode ser inibido pela sua presença. No caso da espécie *L. pinaster*, pode-se verificar na Figura 2 que ocorreu esse processo inicial de indução do enraizamento no referido tempo, ou seja, na primeira semana. Pode-se observar também certa inibição após a segunda semana, para as concentrações de 1 e 2 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de AIB. Maior número de raízes (9,79) foi obtido em meio suplementado com 2 mg.L⁻¹ de ANA, aos 15 dias de cultivo. Esse número se mostrou superior em relação

a todos os outros tratamentos, pois quando a concentração utilizada foi de 1 mg.L⁻¹ de ANA obteve-se 3,68 raízes aos 17 dias e 4,61 aos 20 dias, quando se utilizou 1 mg.L⁻¹ de AIB. Na concentração de 2 mg.L⁻¹ de AIB, o número de raízes foi menor dentro do prazo avaliado (Figura 2).

Pode-se notar na Figura 2 que as duas auxinas em todas as concentrações, excetuando-se a de 2 mg.L⁻¹ de AIB causaram certa inibição em relação ao número de raízes/plântulas de arnica. Observou-se que ocorreu um processo de iniciação e indução das raízes, mas como as plântulas permaneceram por mais tempo na auxina, as raízes não cresceram, prejudicando uma visualização mais perfeita, pois algumas plântulas apresentaram um aglomerado na base, como um calo.

Períodos menores de permanência como 24 horas ou 5 dias também não foram suficientes para induzir um bom número de raízes nas plântulas de arnica, talvez pela baixa concentração utilizada quando relacionada também ao baixo período de exposição. Quando as plântulas foram deixadas por 24 horas em 1 mg.L⁻¹ de ANA e AIB, os valores médios de número de raízes foram menores que 1; 0,54 e 0,62, respectivamente. Na concentração de 2 mg.L⁻¹, as plântulas apresentaram em média 0,2 quando inoculadas em ANA e 0,44 quando inoculadas em AIB. Aos 5 dias de cultivo verificou-se um aumento significativo em relação ao primeiro tempo, pois os

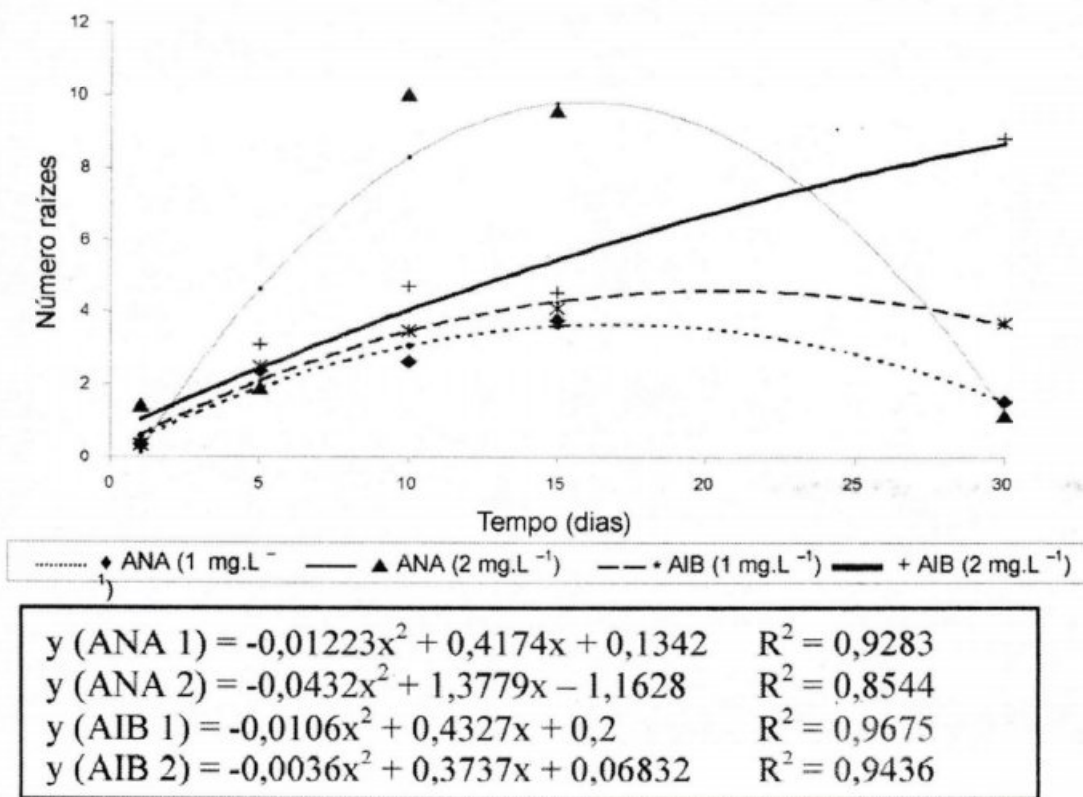


FIGURA 2 - Número de raízes de plântulas de *Lychnophora pinaster* em função do tempo de permanência em diferentes concentrações de ANA(1 e 2 mg.L⁻¹) e AIB(1 e 2 mg.L⁻¹).

valores obtidos foram de 2,0; 2,1; 5,6 e 2 quando as plantas foram inoculadas em 1 mg.L⁻¹ de ANA e AIB e 2 mg.L⁻¹ de ANA e AIB, respectivamente. Neste caso, como também no comprimento das partes aéreas, quando o objetivo for menor tempo de permanência das plântulas na presença de auxina, deve-se aumentar a concentração desta. Para a espécie *L. pinaster*, a concentração de auxina deve ser maior que 1 ou 2 mg.L⁻¹ (Figura 2).

O uso de dois meios de cultura na fase de enraizamento de plântulas de espécies lenhosas tem sido utilizado frequentemente em *Eucalyptus*, *Tectonas grandise* e em diversas espécies de coníferas e frutíferas (Grattapaglia & Machado 1998). No caso, do *Eucalyptus*, no qual as partes aéreas permanecem desde algumas horas até alguns dias, é rico em auxina, deve-se alternar concentração x tempo, favorecendo a indução e iniciação; e o segundo meio, sem qualquer regulador de crescimento, estimularia a exteriorização e o crescimento das raízes. Este fato foi observado com a espécie *L. pinaster*, como pôde-se verificar de acordo com o que foi exposto anteriormente.

Estes resultados podem ser interessantes para a espécie *L. pinaster*, pois não foi preciso utilizar altas doses de auxinas para se obter um número satisfatório de raízes, visto que aos 15 dias aproximadamente, as plântulas inoculadas em 2mg.L⁻¹ de ANA apresentavam um número considerável de raízes, perfeitamente aptas ao transplântio em casa de vegetação.

Menor comprimento das raízes às vezes pode ser preferível, por estas se apresentarem em fase de crescimento ativo. Todos os tratamentos apresentaram plântulas com raízes pequenas, excetuando-se aquelas obtidas em meio contendo 2 mg.L⁻¹ de ANA que aos 10 e 15 dias apresentaram raízes com um comprimento considerável, quando comparadas às raízes das plântulas dos outros tratamentos. No entanto, este fato não é considerado como um inconveniente, visto que as raízes maiores podem ser podadas durante a toalete, antes do transplântio.

A resposta da ação das auxinas sobre o enraizamento *in vitro* pode ser variável dependendo da espécie a ser trabalhada podem ou não mostrar

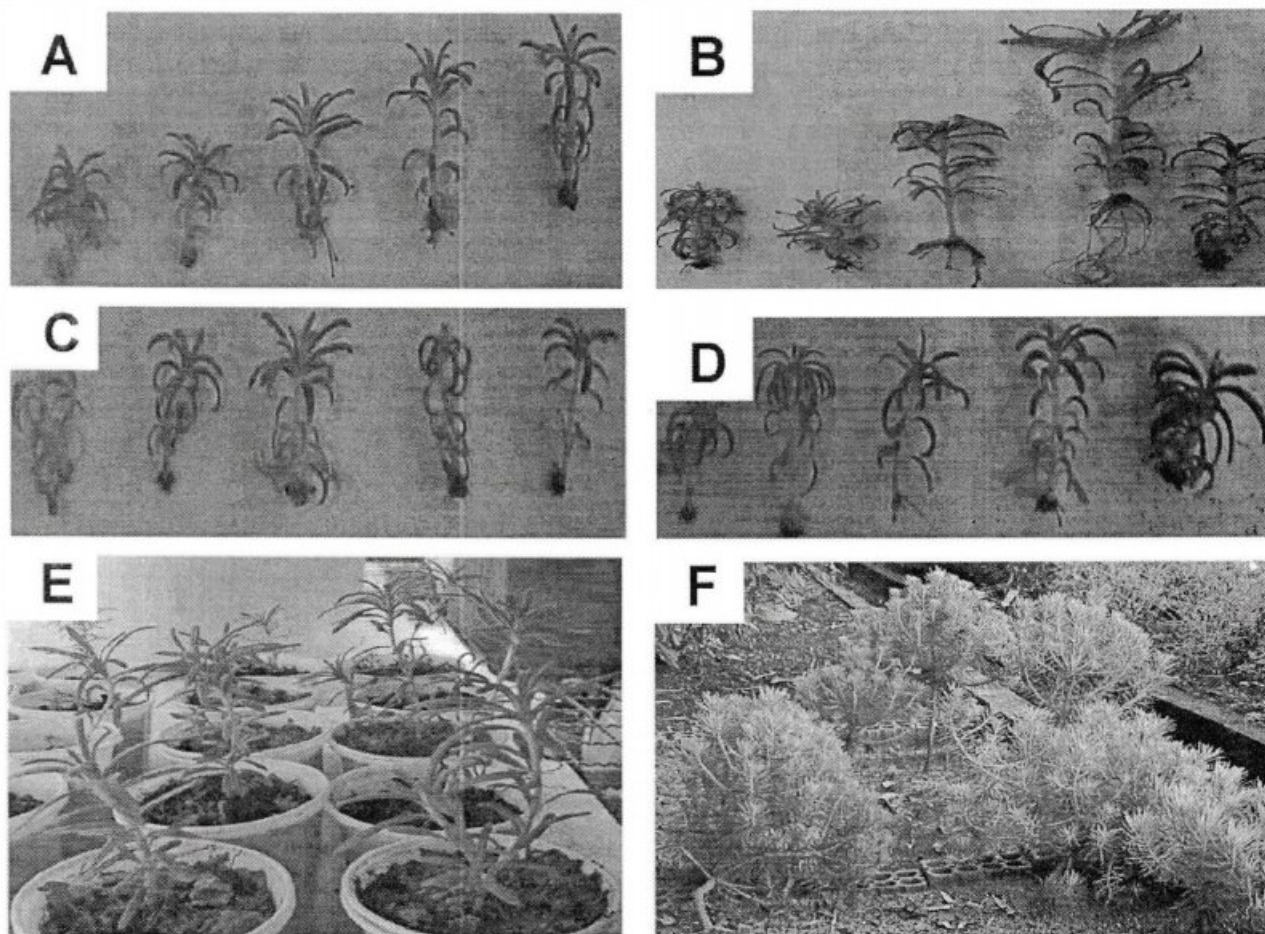


FIGURA 3 - A, B, C e D) Enraizamento de plântulas de arnica cultivadas em diferentes períodos de permanência (1, 5, 10, 15 e 30 dias) em 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de ANA e 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB respectivamente; E) Plântulas de arnica aclimatizadas no solo do local de ocorrência da espécie; F) Plantas de arnica com 12 meses – HORTO DE PLANTAS MEDICINAIS.

sinais de toxidez. No caso da espécie *Rudgea viburnoides* (Bonilla, 2002), as plântulas permaneceram durante 60 dias na presença de 0,5 mg.L⁻¹ de AIB e, devido a concentração baixa e menor em relação aquelas utilizadas no experimento com *L. pinaster* pode não ter ocorrido um efeito tóxico sobre o crescimento das raízes desta espécie. Entretanto, o tempo em que as plântulas permaneceram na presença dessa auxina foi de 45 dias a mais quando comparado à espécie *L. pinaster* que já aos 15 dias apresentava um número médio de raízes satisfatório para serem aclimatizadas.

Pereira (1993) também testou as auxinas ANA e AIB no enraizamento *in vitro* das espécies *M. aquifolium* e *M. ilicifolia*, nas mesmas concentrações testadas para a espécie *L. pinaster*. Entretanto as duas concentrações de AIB utilizadas não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao número de raiz, porcentagem e tempo de indução, diferindo dos resultados obtidos com a arnica.

Bello *et al.*, (2002) também obtiveram bons resultados com o ANA e AIA quando comparado aos da auxina AIB no enraizamento de *Valeriana glechmifolia*, pois observaram que os meios contendo AIB induziram a formação de calos; e os meios suplementados com ANA e AIA nas concentrações de 1 e 2,5 mg.L⁻¹, além de promoverem bom enraizamento, induziram também raízes morfológicamente similares às encontradas nas plantas a campo.

Sabe-se que etapa de transplântio e aclimatização de plântulas obtidas *in vitro* é considerada uma passagem crítica e, em alguns casos, representa um fator limitante do processo de micropropagação. O sucesso desta etapa depende da qualidade das plantas provenientes da fase anterior, em que o tipo do sistema radicular é fator fundamental neste contexto.

Os fatores umidade e substrato, além de outros, também são pontos fundamentais a serem considerados na obtenção de sucessos durante a fase de aclimatização das plântulas. A umidade deve ser elevada porque estas passam de uma condição heterotrófica *in vitro* para uma condição autotrófica *in vivo* (Pinto & Pasqual, 1990).

Por ser uma espécie endêmica, restrita ao bioma cerrado a aclimatização foi feita utilizando solo do local de ocorrência da espécie e a sobrevivência das plântulas foi de 100% (Figura 3).

AGRADECIMENTO

As agências de fomento a pesquisa CAPES, CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ÁVILA, F. **Guia ilustrado de plantas do Cerrado de Minas Gerais**. São Paulo: Livraria Nobel, Empresa das artes 2001. 96p.
- BELLO, C.M., MAURMANN, N., LUZ, D.I., *et al.* Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glechmifolia* MEYER. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD-rom.
- BONILLA, M.G.O. **Propagação in vitro, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH.** 2002. 162p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CORREIA, J. R. Solos, paisagem e conservação da biodiversidade do Cerrado. In: IORIS, E. **Plantas Medicinais do Cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável**. Mineiros, 1999. p.127-48.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, Florianópolis: Ed. UFSC, 2001. p.105-24.
- 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-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.1, p.437-96, 1962.
- PEREIRA, A. M. S. **Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa)**. 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, SP.
- PINTO, J.E.B.P., PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990. 73p. (Apostila).
- RODRIGUES, V.E.G. **Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais**. 1998. 235p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. p.515. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.