

Micropropagação da espécie nativa *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae)¹

KAJIKI, F.O.; SHEPHERD, S.L.K.

Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas-SP, 13083-970. e-mail: odahara_fk@yahoo.com.br.

RESUMO: *Baccharis tridentata* Vahl. é uma planta nativa, aromática, medicinal, cujo óleo essencial é constituído principalmente de nerolidol e espatulenol. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o protocolo para micropropagação desta espécie. Os explantes foram constituídos de ápices caulinares de uma única planta cultivada em casa de vegetação. Os explantes foram submetidos à lavagem em água corrente durante 3 horas, esterilizados com NaOCl (1%) e inoculados em meio Murashige & Skoog (MS), contendo carvão ativado (1% p/v). Reguladores de crescimento não foram adicionados ao meio. Durante os 5 dias iniciais após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, após o qual foram cultivados sob fotoperíodo de 16 horas/ 25-27°C. Os meios 1/2MS e 1/2B5 também foram testados. O meio MS na concentração original favoreceu o crescimento de plantas com altura e peso seco de raízes e partes aéreas significativamente maiores quando comparado com os demais meios testados. O enraizamento foi induzido no meio MS, sem adição de fitorreguladores. Após o transplante para casa de vegetação, houve sobrevivência de 80% das plantas. Este protocolo constitui um método eficiente de propagação, sendo que cerca de 1500 plantas homogêneas poderiam ser produzidas a partir de uma única planta em um período de 6 meses.

Palavras-chave: *Baccharis*, propagação clonal, ápices caulinares, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT: *Micropropagation of a brazilian species Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae). *Baccharis tridentata* Vahl is an aromatic, medicinal plant, which essential oil is constituted mainly of nerolidol and spathulenol. The aim of this study was to establish a protocol for micropropagation of this species. Shoot tips of a single greenhouse grown plant were used as explants. They were washed in running water for 3 hours, sterilized with NaOCl (1%) and inoculated in Murashige & Skoog (MS) basal medium, containing activated charcoal (1% p/v). No growth regulators were added to the medium. During the five initial days after inoculation, explants were maintained in darkness to overcome oxidation, and were cultivated at 25-27°C under 16 hour photoperiod. Half strength MS (1/2MS) and half strength B5 media were also tested. Full strength MS medium resulted in taller plants with greater values of shoot and root dry matter. Rooting was induced in the same medium, without addition of growth regulators. Acclimatization gave 80% plant survival. This protocol constitutes an efficient method that could potentially produce one thousand and five hundred (1500) homogeneous plants from a single matrix plant in a period of six months.

Key words: *Baccharis*, clonal propagation, shoot tips, *in vitro* culture.

INTRODUÇÃO

Baccharis tridentata Vahl. (Asteraceae) são subarbustos de 0,5-1,0m de altura, dióicas (Barroso, 1986), de uso medicinal como febrífuga e diurética em algumas regiões do Brasil (Uphof, 1968). São plantas aromáticas, sendo que o óleo essencial é constituído majoritariamente pelos sesquiterpenos espatulenol (8,6%) e nerolidol (4,6%) (Ferracini et

al., 1996). Recentemente, pesquisas com nerolidol tem comprovado o efeito inibitório deste composto no crescimento do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária (Lopes, et al., 1999; Macedo et al., 2002).

A micropropagação de plantas potencialmente úteis é importante, já que permite a obtenção de um grande número de plantas a partir

Recebido para publicação em 03/12/2004

Aceito para publicação em 16/06/2005

de um único indivíduo, em curto período de tempo e espaço físico reduzido, contribuindo para a preservação de patrimônio genético valioso (Hu & Wang, 1983; França, 1999). Dentre os explantes que podem ser utilizados, ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados são os mais indicados na propagação clonal *in vitro*, pois eles possuem determinação para o crescimento vegetativo, desenvolvendo plantas sem a passagem pela fase de calo, quando em meio de cultivo adequado (Grattapaglia & Machado, 1998). A cultura de ápices caulinares permite a manutenção da identidade do genótipo propagado (Hu & Wang, 1983), sendo extremamente importante no caso de espécies dióicas, quando plantas femininas ou masculinas são mais valorizadas comercialmente (Bhojwani & Razdan, 1983).

Vários fatores relacionados à planta fornecedora do explante, às características e manipulação do explante e às condições gerais de cultivo, influenciam a micropropagação e devem ser otimizados. Um problema que dificulta o estabelecimento do cultivo *in vitro* de várias espécies é a oxidação de compostos fenólicos. Os produtos da oxidação são tóxicos podendo comprometer ou inviabilizar o desenvolvimento do explante. Dentre os procedimentos utilizados para reduzir a oxidação, a lixiviação do explante antes da inoculação e o uso de substâncias oxidantes têm se mostrado efetivos. O sucesso da micropropagação depende do estabelecimento de protocolos que atendam as necessidades específicas de cada espécie (Grattapaglia & Machado, 1998).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer o cultivo *in vitro* de *B. tridentata*, através de ápices caulinares e otimizar a micropropagação, investigando os efeitos de diferentes meios de cultivo.

MATERIAL E MÉTODO

Material botânico

Mudas de *B. tridentata* nativas no Planalto do Itatiaia, foram coletadas no km 14 que dá acesso ao Pico das Agulhas Negras, a cerca de 2400 m de altitude e cultivadas em casa de vegetação durante 6 meses. Exsicata do material foi depositada no herbário da UNICAMP sob número UEC 124.784.

Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Os explantes foram constituídos de ápices caulinares de planta cultivada em casa de vegetação. Foram coletados ápices caulinares de uma única planta e após lixiviação em água corrente durante 3 horas, os explantes foram tratados com solução fungicida Benlate (Benomyl) 1% (p/v) e NaOCl a 1% (v/v), ambos durante 10, 20 e 30 minutos. A excisão

final para isolamento dos explantes (cerca de 1,2 cm) foi feita em placa de Petri contendo solução antioxidante (ácido cítrico, 150 mg L⁻¹; ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹, e cisteína, 2 mg L⁻¹). Os ápices caulinares foram inoculados individualmente, em condições assépticas, em tubos de fundo chato (8 cm de altura e 2 cm de diâmetro), contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), solidificado com 0,7% de agar e carvão ativado a 1% (p/v). Estes frascos foram vedados com película de polivinilcloreto (PVC). Durante os cinco dias iniciais após a inoculação foram mantidos no escuro, à 25-27°C. Após este período foram transferidos para meios recém preparados e cultivados em fotoperíodo de 16 horas/dia, durante 3 meses, com renovação do meio a cada 30 dias.

Otimização da composição salina dos meios de cultivo

Ápices caulinares de *B. tridentata* cultivadas *in vitro* foram inoculados em meios líquidos sobre ponte de papel. Os meios testados foram: composição original do meio MS (Murashige & Skoog, 1962); meio MS com as concentrações reduzidas à metade (1/2 MS); meio B5 (Gamborg et al., 1968). O cultivo foi realizado em câmara de crescimento, com temperatura de 25-27°C e fotoperíodo de 16 horas/dia. Foram realizadas cinco repetições por tratamento. Os parâmetros de crescimento: comprimento do eixo principal da parte aérea (cm) e massa de matéria seca (mg) de partes aéreas e raízes foram avaliados após 31 dias de cultivo *in vitro*.

Multiplicação via ápices caulinares

O clone estabelecido *in vitro* foi multiplicado via ápices caulinares. Plantas de 31 dias constituíram as fontes de explantes (ápices caulinares de cerca de 1,2 cm de altura) que foram inoculados em meio MS básico sólido e cultivados em fotoperíodo de 16 horas/dia e temperatura de 25-27°C. As plantas que tiveram seus ápices caulinares excisados foram mantidas nas mesmas condições por mais 31 dias. Após este período forneceram explantes mais uma vez e foram então descartadas (Figura 1).

Aclimação

Ápices caulinares de *B. tridentata* cultivada *in vitro*, foram inoculados em meio MS líquido, com 3% de sacarose, pH 5,8; utilizando como substrato vermiculita autoclavada, e cultivados sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25-27°C, durante 4 semanas. A partir da terceira semana, foram feitas perfurações na película de PVC diminuindo gradativamente a umidade no interior do frasco e iniciando o processo de aclimação. Plantas de 29 dias apresentavam raízes vigorosas sendo

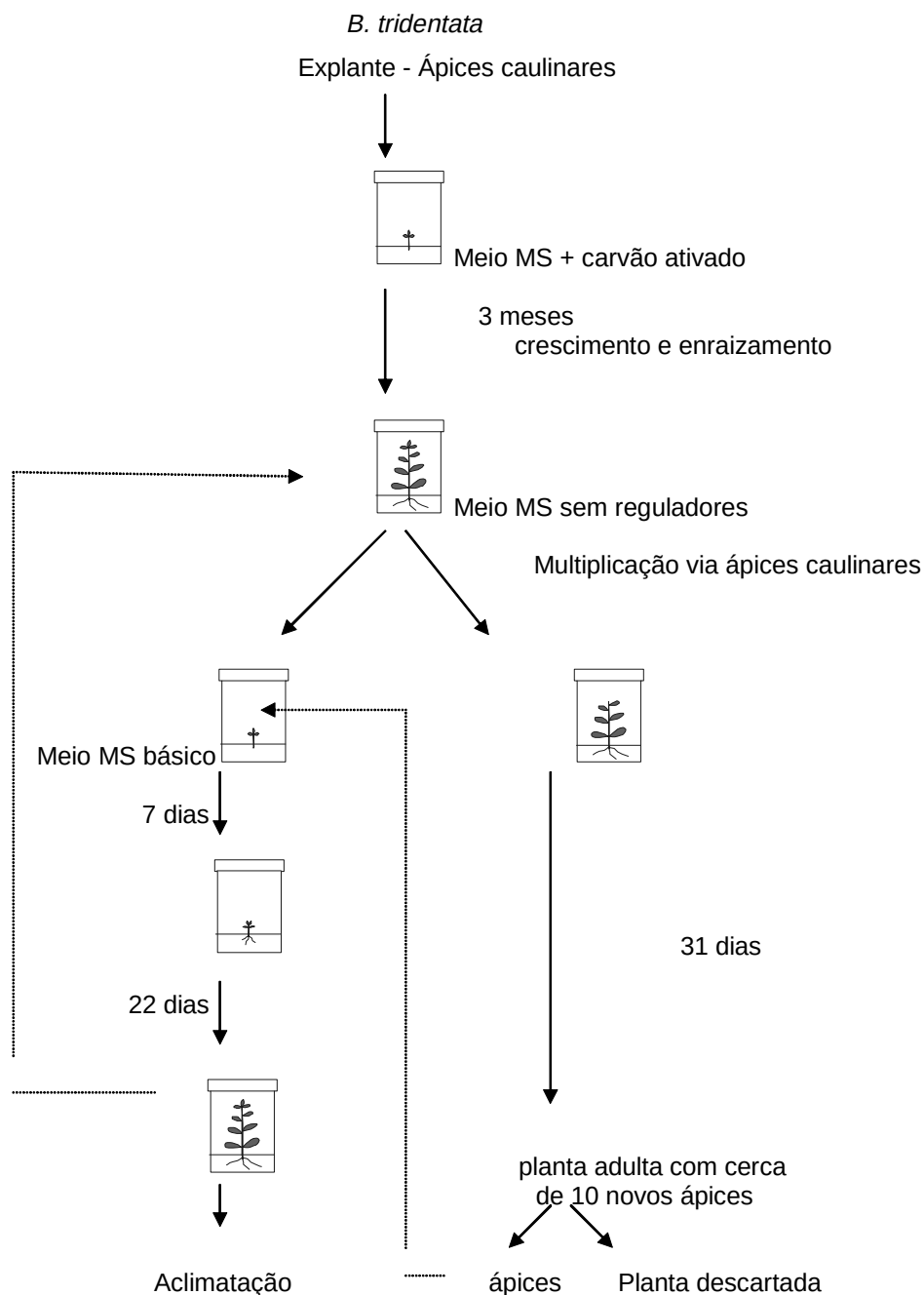


FIGURA 1. Esquema da multiplicação de *B. tridentata* cultivada *in vitro* sob fotoperíodo de 16 horas/ 25-27°C.

transplantadas para bandejas contendo vermiculita autoclavada e mantidas em umidificador durante 7 dias. Após duas semanas de cultivo *ex vitro*, as plantas foram transferidas para vasos individualizados contendo mistura de terra vegetal, areia e vermiculita (7:2:1) e mantidas em casa de vegetação.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Estabelecimento do cultivo *in vitro*

A assepsia e esterilização do material antes

da inoculação é fundamental já que a contaminação durante esta fase impede o desenvolvimento da cultura. No experimento os procedimentos em geral utilizados (imersão em solução fungicida de Benomyl e em solução de NaOCl) foram efetivos somente quando o tempo de imersão foi aumentado para 30 minutos (fungicida) e 20 minutos (NaOCl). O material apresentava-se totalmente escurecido após o primeiro dia da inoculação evidenciando alto grau de oxidação, que foi superada com a realização em conjunto dos procedimentos adotados (lixiviação dos explantes, excisão em solução com substâncias

anti-oxidantes, adição de carvão ativado ao meio de cultivo e ausência de luz nos primeiros dias após a inoculação). Durante esta fase de seleção de explantes viáveis, foi utilizado o tratamento de assepsia que consistiu em imersão dos explantes em solução de fungicida durante 30 minutos e em NaOCl durante 20 minutos.

Para algumas espécies é comum durante a fase de isolamento dos explantes, a ocorrência de oxidação dos compostos fenólicos liberados pelas células danificadas pelo corte, que se difundem rapidamente pelo meio de cultura e são tóxicos ao explante (Grattapaglia & Machado, 1998). Alguns autores (Hildebrandt & Harney, 1988; Marks & Simpson, 1990) relataram aumento do número de explantes viáveis com a diminuição da intensidade luminosa durante pré-tratamento da planta doadora dos explantes. A ausência de luz ou a baixa intensidade luminosa limita a ativação de enzimas envolvidas na oxidação dos compostos fenólicos, enquanto o carvão ativado adicionado ao meio de cultura adsorve compostos tóxicos, contribuindo para a sobrevivência dos explantes (Grattapaglia & Machado, 1998).

Superada esta fase inicial do estabelecimento do cultivo *in vitro* (cinco dias), os explantes foram transferidos para meio MS recém preparado, sem adição de fitorreguladores. Neste meio, após um período de crescimento lento (3 meses), enraizaram e quando atingiram altura de cerca de 4 cm, foram multiplicados via ápice caulinar, produzindo número adequado de plantas homogêneas.

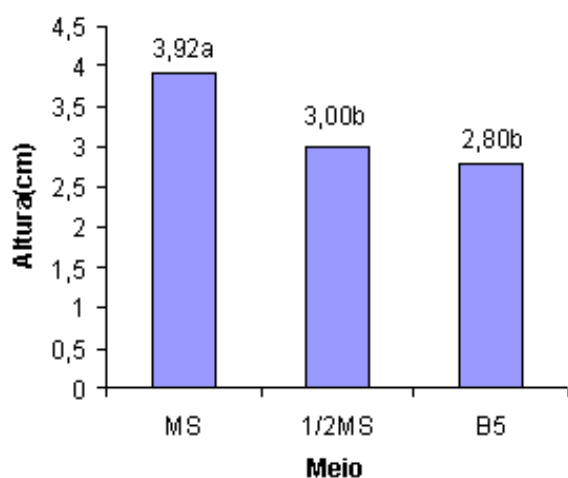


FIGURA 2. Efeito de diferentes meios de cultivo na altura do eixo caulinar (cm) de *B. tridentata* após 31 dias de cultivo *in vitro* sob fotoperíodo de 16 h/ 25-27°C. Os dados constituem médias de 5 repetições. Valores seguidos por letras distintas diferem significativamente (Tukey 5%; $p < 0,05$).

Otimização do cultivo *in vitro*

Em geral, a composição salina do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é satisfatória para o crescimento adequado de muitas espécies de plantas. No entanto, para algumas espécies, a concentração dos sais é tóxica ou desnecessariamente alta (Bhojwani & Razdan, 1983). Conforme verifica-se na figura 2, o crescimento do eixo caulinar de *B. tridentata* diminuiu significativamente no meio ½ MS e B5. Igualmente a matéria seca de partes aéreas e raízes foi afetada (Tabela 1). Estes resultados sugerem o meio MS como o mais adequado ao cultivo *in vitro* desta espécie, principalmente considerando que na propagação clonal, plantas mais desenvolvidas poderão fornecer maior número de explantes.

O enraizamento de partes aéreas *in vitro* constitui uma etapa importante na micropropagação. Plantas herbáceas enraízam com certa facilidade, porém o mesmo não ocorre com espécies lenhosas. Ápices caulinares de *B. tridentata* cultivados *in vitro* sem adição de fitorreguladores, iniciaram a formação de raízes após 1 semana da inoculação, nos três meios testados. Esta resposta é dependente da condição fisiológica do explante e das condições ambientais utilizadas.

Para algumas espécies nativas tem sido relatado que meios com concentração reduzida dos sais favorecem a indução (Pereira et al., 2000) ou o desenvolvimento das raízes *in vitro* (Almeida & Shepherd, 1999). Os resultados obtidos com *B. tridentata*, apresentando valores de massa seca maiores quando cultivada em meios ricos, comparados com os obtidos no cultivo em meios mais diluídos, evidenciam um comportamento diferencial que pode estar relacionado com o fato do cultivo desta espécie ter ocorrido em meio sem fitorreguladores.

Segundo alguns autores, as folhas jovens dos ápices caulinares constituem rica fonte de auxinas, dispensando, assim, a adição de auxinas exógenas no cultivo de muitas espécies (Grattapaglia

TABELA 1. Efeito de diferentes meios de cultivo na massa seca de partes aéreas e raízes (mg) de *B. tridentata* após 31 dias de cultivo, sob fotoperíodo de 16 h/ 25-27°C. Dados representam médias de 5 repetições. Em uma mesma linha, médias seguidas por letras distintas indicam diferenças significativas (Tukey 5%; $p < 0,05$).

	MS	½ MS	B5
Parte aérea	12,290 a	8,980 b	9,604 b
Raízes	3,540 a	2,504 b	2,420 b

& Machado, 1998). Além disso, a citocinina endógena pode estar em concentração suficientemente baixa, para garantir a razão auxina/citocinina adequada para ocorrer o enraizamento.

Multiplicação via ápices caulinares

Os ápices caulinares enraizaram em 7 dias e apresentaram cerca de 4,5 cm de altura em 31 dias, após a inoculação. As plantas que tiveram os ápices caulinares excisados produziram cerca de 10 novos ramos laterais, fornecendo mais 10 ápices após 31 dias de cultivo. Portanto, neste esquema de multiplicação, a partir de uma única planta, poderiam ser produzidas cerca de 1500 plantas após um período de 6 meses.

Aclimação

O transplântio de *B. tridentata* cultivada in vitro para a condição ex vitro, em casa de vegetação, resultou na sobrevivência de 80% das plantas. Esta passagem é crítica e em alguns casos pode comprometer a micropropagação.

A qualidade das raízes obtidas *in vitro* é um fator determinante e como em alguns casos elas não sobrevivem após o transplântio, o enraizamento *ex vitro* pode ser uma alternativa para algumas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998). Pedrotti & Voltolini (2001), obtiveram altas porcentagens de enraizamento ex vitro do porta enxerto de macieira, sendo que a qualidade das raízes obtidas foi atribuída, entre outros fatores, à maior porosidade e aeração do substrato utilizado (vermiculita). A vermiculita adicionada ao meio de cultivo *in vitro*, também tem favorecido o enraizamento, como foi observado por Dolcet-Sanjuan et al. (2004) na micropropagação de *Juglans nigra* x *Juglans regia*. No cultivo *in vitro* de *B. tridentata* utilizando vermiculita, as plantas micropropagadas apresentaram raízes curtas e vigorosas, sugerindo que a utilização deste substrato favoreceu o enraizamento. Além disso, resíduos de ágar nas raízes podem facilitar o crescimento de patógenos durante fase (Werbrouck & Debergh, 1994), o que não ocorreu ao se utilizar a vermiculita.

Outro fator agravante na aclimação é a perda de água que ocorre nas primeiras horas após o transplântio. Pré-tratamentos visando diminuir a umidade relativa no interior dos frascos de cultivo podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência (Johansson et al., 1992), já que estes procedimentos contribuem para a formação de uma cutícula mais espessa, diminuindo a evaporação cuticular quando no ambiente *ex vitro* (Wardle et al., 1983).

CONCLUSÃO

O cultivo *in vitro* e a micropropagação de *Baccharis tridentata* foram possíveis a partir de

ápices caulinares, em meio MS, sem adição de fitorreguladores, permitindo o estabelecimento de um banco de plantas homogêneas. Os resultados obtidos possibilitam estabelecer um protocolo para obtenção de um banco de plantas homogêneas com cerca de 1500 plantas em um período de 6 meses.

AGRADECIMENTO

As autoras agradecem à CAPES pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALMEIDA, V.P.; SHEPHERD, S.K.L. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): in vitro cultivation of a native plant of the Brazilian cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.3, p.381-4, 1999.
- BARROSO, G.B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Ed. Universidade Federal de Viçosa, 1986. v.3, p.272-4.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. Clonal Propagation. In: _____. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. cap.15, p.313-37.
- DOLCET-SANJUAN, R. et al. Practical factors controlling in vitro adventitious root formation from walnut shoot microcuttings. **Journal of American Society Horticultural Science**, v.129, n.2, p.198-203, 2004.
- FERRACINI, V. et al. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis*: a prospective approach on their ecological role. **Proceedings of the International Compositae Conference**, v.2, p.467-74, 1996.
- FRANÇA, S.C. Abordagens biotecnológicas para obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (eds.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, Porto Alegre: Ed. UFRS, 1999. p.101-21.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-8, 1968.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p.183-260.
- HILDEBRANDT, V.; HARNEY, P.M. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium X hortorum*, Bailey "Sprinter Scarlet". **Journal of Horticultural Science**, v.63, n.4, p.651-7, 1988.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. In: EVANS, D.A. et al. (Eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan Publishing, 1983, v.1; p.177-227.
- JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E.C.; ROBARDS, A.W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v.166, p.165-76, 1992.
- LOPES, N.P. et al. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p.313-9, 1999.
- MACEDO, C.S. et al. Characterization of the isoprenoid

chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.207, p.13-20, 2002.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v.65, n.2, p.103-11, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento ex vitro e aclimatização do porta enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.234-9, 2001.

PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.2, n.2, p.17-21, 2000.

UPHOF, J.C.Th. **Dictionary of economic plants**. 2. ed., Germany: Verlag Von Cramer, 1968, p.62.

WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal American Society Horticultural Science**, v.108, p.386-9, 1983.

WERBROUCK, S.P.O.; DEBERGH, P.C. Applied aspects of plant regeneration. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Eds). **Plant cell culture : a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1994. p.127-34.