

Micropropagação de *Calendula officinalis* L.

BERTONI, B.W.²; DAMIÃO FILHO, C.F.¹; MORO, J.R.¹; FRANÇA, S.C.²; PEREIRA, A.M.S.²

¹Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal. São Paulo. CEP 14870-000. ²Unidade de Biotecnologia Vegetal. Universidade de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. São Paulo. CEP 14096-380. (bbertoni@unaerp.br)

RESUMO: *Calendula officinalis* é geralmente propagada por sementes e apresenta grande diversidade no tamanho e cor da flor o que acarreta variabilidade química quantitativa e qualitativa. O protocolo de micropropagação foi desenvolvido com objetivo de propagar essa espécie de forma clonal o que permite a obtenção de biomassa homogênea mais adequada a produção de fitoterápico. Os explantes selecionados a partir de capítulos foram os mais adequados ao processo de micropropagação e o meio mais indicado para multiplicação foi MS suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de BAP com adição de 6,0 gL⁻¹ de Phytigel e para desenvolvimento em altura foi MS suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de cinetina com adição de 6,0 gL⁻¹ de Phytigel. Oitenta por cento das plântulas enraizaram em MS/2 suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de AIB

Palavras-chave: Micropropagação, vitrificação, calêndula, plantas medicinais.

ABSTRACT: Micropropagation of *Calendula officinalis* L. Micropropagation of *Calendula officinalis* L. is usually propagated through seeds and therefore shows high diversity in flower size and colour, what causes quantitative and qualitative chemical variability. A micropropagation protocol was established for clonal propagation of this species to achieve homogeneous biomass, more appropriate for the production of phytotherapics. Explants harvested from capitula were the most appropriate for the micropropagation process. MS culture medium supplemented with 1.0 mgL⁻¹ BAP and 6.0 gL⁻¹ PhytageI™ enhanced shoot proliferation, while MS medium supplemented with 0.5 mgL⁻¹ Kinetin and 6.0 gL⁻¹ PhytageI™, increased shoot elongation. Plantlets (80%) cultured in MS/2 medium supplemented with 1.0 mgL⁻¹ de IBA rooted.

Key words: Micropropagation, medicinal plant, calêndula

INTRODUÇÃO

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) é uma planta de origem européia, pertencente à família Asteraceae. Encontra-se difundida no mundo e está bem aclimatada no Brasil, sendo comercializada em farmácias onde é empregada em diversos preparados fitoterápicos e cosméticos.

Segundo a Escop-elropean (1992), o extrato das flores de calêndula é indicado no tratamento de inflamações da pele, de mucosas, na cicatrização de feridas e queimaduras leves. Vários trabalhos com calêndula têm correlacionado sua atividade biológica com sua estrutura química: saponinas triterpenoídicas tem atividade anti-tumoral (Boucaud-Maitre et al., 1988), triterpenóides tem atividade antiinflamatória tópica (Della Loggia et al., 1994; Herold et al., 2003), flavonóides, apresentam atividade antiinflamatória

(Bezàkova et al., 1996) e éster triterpenodiol, atividade anti-edema (Zitterl – Eglseer et al., 1997).

As plantas de *C. officinalis* encontradas no Brasil produzem flores de tamanho variado (3 a 9 cm) e cores heterogêneas. Esse tipo de variabilidade se estende ao perfil fitoquímico e dificulta o controle de qualidade de matéria prima de fitoterápicos a base de calêndula. Trabalho realizado por Neukirch et al., (2004) com dez variedades de calêndula mostrou grande diversidade química nas plantas analisadas.

A micropropagação via organogênese direta é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos e é usada rotineiramente para multiplicar grandes quantidades de plantas uniformes com genótipos selecionados mantendo a fidelidade genética (Kitto, 1997). Além disso, também tem sido utilizada em programas de conservação com

introdução de acessos em bancos de germoplasma. O estoque de plantas *in vitro* permite um fluxo contínuo de produção em todas as épocas do ano, e possibilita a produção de plântulas a partir de órgãos já desenvolvidos o que, em geral, não é conseguido em condições naturais de campo.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *Calendula officinalis* visando à produção de clones elites.

MATERIAL E MÉTODO

Experimentos realizados *in vitro*

Plantas de calêndula com três meses de idade mantidas em canteiros na coleção de plantas medicinais do Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), foram doadoras de diferentes tipos de explantes: capítulo floral, segmento nodal (retirados de plântulas sob condição *ex-vitro* e de plântulas axênicas) e sementes.

Os explantes tipo capítulos e segmentos nodais foram coletados no campo de cultivo de plantas medicinais da UNAERP e permaneceram por doze horas sob água corrente; em seguida foram desinfestados superficialmente com solução de benomil à 0,5% (p/v) por trinta minutos, depois lavados com solução etanol/água a 70% (v/v), por dois minutos. Posteriormente, foram transferidos para solução de hipoclorito de cálcio a 1,5% (p/v), por vinte minutos, sob agitação. Os capítulos após assepsia foram divididos em quatro partes iguais, e inoculados no meio de cultura.

Sementes foram desinfestadas com solução de benomil 1% (p/v), superficialmente, por uma hora sob agitação e posteriormente transferidas para solução de hipoclorito de cálcio 0,5% (p/v), por 15 minutos, sob agitação e em seguida foram lavadas com água autoclavada.

Segmentos nodais retirados de plântulas axênicas com três pares de folhas foram inoculados nos seguintes meios: a) MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com benziladenina (BA), zeatina (ZEA) e cinetina (KIN) nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 mgL⁻¹; b) MS, B₅ (Gamborg, 1984) e W (White, 1951), suplementado com KIN na concentração de 0,1 mgL⁻¹, gelificado com 3,0 mgL⁻¹ de Phytigelâ; c) MS suplementado com KIN, ZEA e BA nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mgL⁻¹, acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose e 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ.

Capítulos de 0,5 cm de diâmetro, após assepsia, foram divididos em quatro partes iguais e inoculados nos seguintes meios: a) MS suplementado com BA, ZEA e KIN nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 3,0 mgL⁻¹ acrescidos de 30 gL⁻¹ de sacarose e 3,0 mgL⁻¹ de Phytigelâ; b) MS, suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de BA acrescido de 3,0 gL⁻¹ de Phytigelâ e

15, 30, 60 e 90 gL⁻¹ de sacarose; c) MS suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de BA acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose e 3,0 mgL⁻¹ de Phytigelâ. Os explantes foram expostos a diferentes condições de fotoperíodo (luz contínua, dez dias no escuro e vinte dias em fotoperíodo de 16 horas dia e fotoperíodo de 16 horas dia); d) MS suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de BA acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose e 3,0; 6,0 e 9,0 mgL⁻¹ de Phytigelâ. O último experimento foi realizado com capítulos imaturos desde o seu surgimento na planta com 0,5 cm de diâmetro até a véspera da abertura da flor com 1,2 cm de diâmetro (0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 cm de diâmetro) e foi feita a inoculação em MS suplemento com BA na concentração de 1,0 mgL⁻¹ com 30 gL⁻¹ de sacarose e gelificado com 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ.

Enraizamento

Em condições *in vitro*: plântulas com três pares de folhas e 3,0 cm de altura advindas do meio MS suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de KIN acrescido de 30 gL⁻¹ de sacarose e 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ foram transferidas para os meios listados a seguir, e gelificados com 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ: a) MS + 30 gL⁻¹ de sacarose; b) MS + 30 gL⁻¹ de sacarose + 0,1 mgL⁻¹ de AIB; c) MS + 30 gL⁻¹ de sacarose + 1,0 mgL⁻¹ de AIB; d) MS + 30 gL⁻¹ de sacarose + 0,1 mgL⁻¹ de ANA; e) MS + 30 gL⁻¹ de sacarose + 1,0 mgL⁻¹ de ANA; f) MS/2 + 15 gL⁻¹ de sacarose + 1,0 mgL⁻¹ de AIB; g) MS/2 + 15 gL⁻¹ de sacarose + 0,10 mgL⁻¹ de AIB; h) MS/2 + 15 gL⁻¹ de sacarose + 0,01 mgL⁻¹ de AIB; i) MS/2 + 15 gL⁻¹ de sacarose.

As plântulas enraizadas foram transferidas para bandejas de isopor contendo plantmaxâ e mantidas em casa de vegetação a temperatura de 28°C e 80% de umidade durante sessenta dias.

Plantas micropropagadas e advindas de sementes foram avaliadas no campo quanto a altura da planta, produção de diásporos em peso por planta e homogeneidade de tamanho e cor da flor.

Em condições *ex vitro*: Plântulas com três pares de folhas e 3,0 cm de altura, oriundas de meio MS suplementado com KIN 0,5 mgL⁻¹ com 30 gL⁻¹ de sacarose foram colocadas sob algodão umedecido com solução de 1,0 mgL⁻¹ de AIB por 24 horas. Posteriormente foram transferidas para casa de vegetação em bandejas de isopor contendo plantmaxâ; terra x areia (1:1) e terra x plantmaxâ (1:1).

Os meios de cultura utilizados em todos os experimentos foram solidificados com phytigel, pH ajustado a 6,0 e autoclavados a 121°C a 1 atm, por 15 min. Os frascos utilizados nesses experimentos foram tubos de vidro com 2,2 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura, tampados com tampa plástica transparente autoclavável. Os explantes e plântulas foram mantidos por 16 horas dia de fotoperíodo, sob

1600 Lux ($1,6 \times 10^2$ cal. $\text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$) de intensidade luminosa, proveniente de 2 lâmpadas tipo fluorescente (GE, 85W), à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$

O delineamento experimental adotado nos ensaios foi o inteiramente casualizado. Cada tratamento teve três repetições, sendo dez explantes por repetição e, para a comparação das médias dos tratamentos, utilizou-se o teste de Tukey em nível de 5%.

Dosagem de clorofila

Folhas de calêndula (50mg/peso fresco) vitrificadas ou não, foram coletadas separadamente e colocadas em um frasco de vidro com capacidade para 5 mL contendo 3 mL de metanol. Os frascos foram hermeticamente fechados com tampa plástica e incubados por 2 horas à temperatura de 23°C no escuro. A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro (Spectronic 21 da Bausch & Lomb) a 650 e 665 nm (Curtis & Shetty, 1996).

Dosagem de fenóis totais

Folhas de calêndula (50mg/pesofresco) vitrificadas ou não, coletadas separadamente, foram imersas em 2,5 mL de etanol a 0°C por 48 horas e em seguida trituradas e centrifugadas a $15,000 \times g$ por 15 min. Alíquotas do sobrenadante (1mL) foi adicionado a uma solução contendo 1 mL de etanol, 5 mL de água destilada e deionizada e 5 mL de reagente Folin-Cicateau 50%. Após quinze minutos adicionou-se 1 mL de uma solução de Na_2CO_3 a 5%. As amostras foram agitadas em vortex (MARCONI MA 162) e em seguida permaneceram 60 minutos em repouso. Após este período foram novamente agitadas e a leitura em espectrofotômetro foi realizada a 725 nm. A curva padrão foi obtida com ácido gálico (Curtis & Shetty, 1996) e ambas as extrações foram realizadas em triplicata.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A desinfestação, segundo Debergh & Read (1993), é o primeiro estágio da micropropagação. A porcentagem de explantes contaminados nesta etapa reflete a dificuldade na obtenção de material axênico, quando estes são retirados diretamente do campo de cultivo. O procedimento utilizado nos capítulos de calêndula proporcionou desinfestação de 99% dos explantes, enquanto que este índice em relação às sementes foi de 64%. Por outro lado, segmentos nodais advindos de plantas do campo apresentaram 100% de contaminação. Em decorrência desse fato, os experimentos foram conduzidos apenas com explantes advindos de capítulo e segmento nodal proveniente de plântulas obtidas *in vitro*. De acordo com Queralt et al. (1993), o uso de capítulos como fonte de explante é uma opção interessante porque a contaminação é menos freqüente, podendo-se retirar

muitos explantes sem danificar a matriz e a produção de plântulas "true-to-type" é alta.

As citocininas utilizadas, não influenciaram significativamente o número de brotos obtidos a partir das gemas dos segmentos nodais. Entretanto, os tratamentos com $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN e $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ZEA foram os que promoveram maior elongação dos brotos 1,96 e 2,40 cm respectivamente (Tabela 1). Todos os fitorreguladores utilizados promoveram vitrificação nas plântulas advindas de segmento nodal, o BA induziu 99% de vitrificação e o menor índice (44%) foi obtido com $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN (Tabela 2). O desenvolvimento completo do protocolo não foi possível nos respectivos meios em decorrência da vitrificação.

Os efeitos dos meios basais MS, B5 e W foram avaliados quanto à capacidade de reduzir a vitrificação de plântulas advindas de segmento nodal. A porcentagem de brotos proliferados nos meios B5 e W foram inferiores à porcentagem de brotos em meio MS e a utilização desses diferentes tipos de meios basais não diminuiu a ocorrência de vitrificação.

De acordo com Ziv (1993), a vitrificação afeta a anatomia, a morfologia e a fisiologia das plantas impossibilitando sua aclimação. A vitrificação em plântulas *in vitro* é relativamente freqüente e representa um sério problema para o desenvolvimento do protocolo. Numerosas hipóteses têm sido lançadas para explicar esta disfunção: a) excesso de nutrientes minerais, b) elevadas concentrações de citocininas, c) tipo e concentração do agente gelificante, d) alta umidade relativa, e) tipo de frasco e f) pressão osmótica (Quoirin & Lepoivre, 1997; Vieitez et al., 1985; Ziv, 1993). Em geral, plantas vitrificadas apresentam-se com reduzido teor de proteína, baixo nível de clorofila, elevado teor de água e de íons potássio (Bottcher & Goring, 1988).

O meio mais indicado para proliferação de brotos nos explantes advindos de capítulo foi o MS suplementado com $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA (Tabela 4). Quarenta por cento das plântulas advindas desses explantes vitrificaram.

A concentração de sacarose tem marcante efeito sobre a multiplicação e crescimento de explantes cultivados *in vitro* por ser a principal fonte de carboidrato e vários trabalhos tem mostrado que níveis elevados de sacarose podem conter a vitrificação. Ziv (1993) ao trabalhar com cravo obteve redução do índice de vitrificação quando elevou acima de 3% a concentração de sacarose no meio de cultura. Experimento semelhante foi realizado com *C. officinalis* no intuito de reduzir a vitrificação, entretanto o aumento na concentração de sacarose provocou um aumento da porcentagem de plantas vitrificadas (Tabela 5).

Experimento com fotoperíodo foi realizado no sentido de reduzir a vitrificação, uma vez que este

TABELA 1. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número e altura de brotações de segmento nodal de *C. officinalis*

Trat mg g ⁻¹	BA		KIN		ZEA	
	Numero de brotações	Altura das brotações	Numero de brotações	Altura das brotações	Numero de brotações	Altura das brotações
0,1	2,33A	1,36A	1,76A	1,96A	1,83A	2,03AB
0,5	1,83A	1,46A	1,70A	1,40AB	1,86A	1,70B
1,0	1,80A	1,40A	1,80A	1,30AB	2,03A	2,40A
3,0	2,03A	1,23A	1,70A	0,733B	2,03A	1,80AB

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 2. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na porcentagem de vitrificação em plântulas de *C. officinalis*.

mgL ⁻¹	BA	KIN	ZEA
0,1	99,32 A	67,23 A	73,75 A
0,5	99,21 A	73,22 A	86,90 A
1,0	99,78 A	44,78 A	70,76 A
3,0	76,90 B	66,68 A	92,11 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

tem um papel importante na morfogênese, regulando o tamanho das folhas, caules, formação de pigmentos e também especificamente na vitrificação (Gratapaglia & Machado, 1990). A exposição de plântulas à luz contínua, fotoperíodo e permanência no escuro não alteraram o perfil de vitrificação de *Calendula officinalis* (Tabela 6).

Um outro fator que pode auxiliar na contenção do processo de vitrificação é a concentração do agente gelificante no meio de cultura porque influencia no potencial osmótico, alterando a disponibilidade de água, nutriente e fitorreguladores (Ziv, 1993). Diferenças significativas foram observadas em nossos experimentos entre os tratamentos com diferentes concentrações de Phytigelâ. O aumento da concentração do agente gelificante no meio reduziu o índice de vitrificação das plântulas de *C. officinalis*. A concentração de 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ demonstrou ser a mais eficiente para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação, apesar de 23% das plântulas ainda se apresentarem vitrificadas (Tabela 7). A concentração de 9,0 gL⁻¹ também reduziu a vitrificação, mas reduziu também o índice de multiplicação. Segundo Ziv (1993), a diminuição do índice de multiplicação é provocada pelo aumento da concentração do agente gelificante, afetando a viabilidade de vários componentes do meio, em particular as citocininas.

Depois de minimizar a vitrificação das plântulas, os experimentos foram repetidos usando diferentes tipos e concentrações de citocininas, no intuito de verificar a melhor concentração de citocinina para a micropropagação de *C. officinalis* em meio de cultura contendo 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ

TABELA 3. Efeito do meio basal em segmento nodal de *C. officinalis*

Meio basal	Altura das brotações (cm)	Número de folhas	Numero de brotações	Porcentagem de brotações
MS	2,70 A	3,94 A	2,00A	100 A
WHITE	0,93 B	3,16 A	1,53 A	36 B
B5	2,23 A	3,46 A	1,93 A	0

Os meios basais foram suplementados com 0,1 mgL⁻¹ de cinetina. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

Os resultados mostrados na Tabela 8 revelam que com o aumento da concentração do agente gelificante, houve diminuição na porcentagem de vitrificação das plântulas advindas de seguimento nodal, independente do tipo e concentração de citocinina avaliadas.

Os diferentes tipos de citocininas usadas em meio suplementados com 6 gL⁻¹ de phytigelâ continuaram não influenciando significativamente o número de brotos (Tabela 9), entretanto comparando os dados da Tabela 1 e 9 verificamos que no primeiro experimento as concentrações de 0,1 mgL⁻¹ de KIN e 1,0 mgL⁻¹ de ZEA foram os que promoveram maior alongação dos brotos e quando o dobro da concentração do agente gelificante foi utilizada, os tratamentos com 0,5 e 1,0 mgL⁻¹ de KIN foram os que promoveram a maior alongação dos brotos.

A análise de plântulas de calêndula mostrou que o teor de clorofila total em plântulas vitrificadas foi de 170,34 pg g⁻¹ no tecido fresco enquanto que em plântulas normais o teor foi de 676,6 pg g⁻¹ (Tabela 10). Em plântulas normais o teor de fenóis totais foi três vezes superior ao teor em plantas vitrificadas (Tabela 11). Plântulas vitrificadas apresentaram 0,03% de fenóis totais enquanto plântulas não vitrificadas apresentaram 0,09%. As características morfológicas entre tecido de *C. officinalis* vitrificado e não vitrificado mostrou-se exatamente como descritas por Curtis & Shetty (1996).

Segundo Ziv (1991), a vitrificação é um evento comum na cultura de tecidos, afetando os dois principais processos: fotossíntese e trocas gasosas (CO₂, H₂O e vapor). O fato das plântulas de calêndula apresentarem reduzido teor de clorofila mostra que

TABELA 4. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na porcentagem de brotações de capítulo de *C. officinalis*.

mgL ⁻¹	BA	KIN	ZEA
0,1	66,71 B	20,12 AB	13,12 B
0,5	73,67 B	13,34 B	16,67 B
1,0	100 A	16,45 AB	30,98 A
3,0	80,77 AB	36,67 A	23,03 AB

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 6. Efeito da luminosidade na % de plântulas vitrificadas de *C. officinalis*

Luminosidade	% de vitrificação
24 h/dia	60,67 A
X	66,45 A
16 h/dia	53,14 A

X= 10 dias no escuro e 20 dias em fotoperíodo de 16 horas

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 8. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas na porcentagem de vitrificação das brotações de segmento nodal de *C. officinalis* em MS com 6% de phytigel.

mgL ⁻¹	BA	KIN	ZEA
0,1	23,67 A	0 D	0 C
0,5	30,89 A	26,62 AB	3,37 B
1,0	30,12 A	30,01 A	26,61 A
3,0	26, 62 A	10,04 C	16,64 AB

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

estas não oferecem condição para serem aclimatadas. Segundo Díaz-Pérez et al. (1995), durante o processo de aclimatização ocorre a conversão da condição heterotrófica para autotrófica e um gradual retorno às características naturais da planta. Plantas vitrificadas não apresentam condições morfológicas adequadas nem redução na condutância estomatal, e muito menos incremento no conteúdo de clorofila o que reduz a níveis mínimos a eficiência na carboxilação.

As fases ontogenéticas dos capítulos foram investigadas com objetivo de conhecer a fase mais adequada para a retirada do explante. A Tabela 12 permite-nos verificar que o diâmetro do capítulo influenciou na porcentagem de brotações por capítulo, quanto mais desenvolvido o botão menor o número de brotações. Não houve diferença significativa entre

TABELA 5. Efeito de diferentes concentrações de sacarose na porcentagem de vitrificação em plântulas de *C. officinalis*.

Concentração de sacarose (g L ⁻¹)	% de vitrificação
15	66,51 A
30	66,56 A
60	76,21 A
90	73,11 A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 7. Efeito do teor de phytigelâ na porcentagem de plântulas vitrificadas e número de brotos de *C. officinalis*.

Phytigel® (g L ⁻¹)	% de vitrificação	Número de brotos
3	73,76 A	2,68 A
6	23,54 B	2,06 A
9	0 C	1,16 B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

os capítulos com 0,5, 0,7 e 0,9 cm de diâmetro, com relação à número de brotos maiores do que 1 cm. Meristemas florais segundo Gratapaglia & Machado (1990) são muito utilizados em protocolos de micropropagação pois, conforme a espécie, são facilmente revertidos para o estado vegetativo sem passar pela fase de calo.

Comparando os dois tipos de explantes usados, capítulo e segmento nodal, o primeiro é mais indicado para micropropagação de calêndula. Cada segmento de capítulo produz em média dois brotos, o que resulta em oito brotos por capítulo. O meio mais indicado é o MS suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de BA e solidificado com 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ.

Após a obtenção de plântulas, a fase de multiplicação pode ser realizada com segmento nodal advindos de capítulo floral em meio MS suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de cinetina com 6,0 gL⁻¹ de Phytigelâ, isto porque as brotações a partir de segmento nodal são mais alongadas e facilitam o processo de repicagem e enraizamento.

Quanto ao enraizamento, a presença de auxinas no meio de cultura foi necessária para o desenvolvimento do sistema radicular de calêndula *in vitro*, sendo que os meios de cultura MS e MS/2 suplementados com ANA ou AIB nas concentrações de 0,1 e 1,0 mgL⁻¹ promoveram o enraizamento (Tabela 13). A maior porcentagem de enraizamento (80%) e maior número de raízes (3,2 raízes/planta) ocorreram em meio MS/2 suplementado com 1,0 mgL⁻¹ de AIB. Apesar da formação de calos na base da plântula,

TABELA 9. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número e altura de brotações de segmento nodal de *C. officinalis* em MS com 6% de phytigel.

Trat mg g ⁻¹	BA		KIN		ZEA	
	Numero de brotações	Altura das brotações	Numero de brotações	Altura das brotações	Numero de brotações	Altura das brotações
0,1	2,00 A	0,83 A	2,06 A	0,62 B	1,96 A	1,43 A
0,5	2,00 A	0,52 B	1,96 A	1,73 A	2,00 A	0,62 C
1,0	2,00 A	0,53 B	1,93 A	1,73 A	2,00 A	1,2 7AB
3,0	2,00 A	0,51 B	1,93 A	0,52 B	1,96 A	0,71 BC

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 10. Quantidade de clorofila em pg clorofila/g tecido fresco de folhas que cresceram *in vitro* de *C. officinalis*.

Tipo de clorofila	Plântula vitrificada	Plântula normal
Clorofila a	105,96 B	498,97 A
Clorofila b	62,76 B	183,31A
Clorofila total	170,34 B	676,63 A

Valores referentes a média de três análises Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 12. Efeito do diâmetro da gema floral na porcentagem e número de brotos de *C. officinalis*.

Diâmetro (cm)	Porcentagem de brotação	Número de brotos > 1 cm
0,5	96,33 A	2,06 A
0,7	66,71 AB	2,13 A
0,9	60,12 B	2,09 A
1,2	0 C	0 B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 14. Efeito de diferentes substratos no enraizamento *ex vitro* de plântulas de *C. officinalis*.

Substrato	Porcentagem de enraizamento
Plantmax®	56,66A
Terra/Plantmax®	53,33A
Terra/Areia	23,33B

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

após 60 dias de aclimação em casa de vegetação 66 % das plântulas sobreviveram.

O enraizamento de *Calendula officinalis* pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. Após 60 dias em casa de vegetação as plântulas de calêndula mantidas sob condições *ex vitro* apresentaram os maiores índices de enraizamento em Plantmax® ou terra / Plantmax® 1:1 com 56 % e 53 % respectivamente (Tabela 14). Embora as plântulas de calêndula

TABELA 11. Quantidade e porcentagem de Fenóis totais em folhas que cresceram sob condição *in vitro* de *C. officinalis*

Folhas	mg g ⁻¹ pf	%
NORMAL	0,60 A	0,09 A
VITRIFICADA	0,28 B	0,03 B

Valores referentes a média de três análises Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

TABELA 13. Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina no enraizamento *in vitro* de *C. officinalis*.

Meio básico	Fitoregulador	Concentração (mgL ⁻¹)	Nº de raízes	% de plantas enraizadas
MS	ANA	0,1	1,83A	23,33A
		1,0	1,88A	20,00A
MS	AIB	0,1	2,42A	33,33A
		1,0	1,53A	23,33A
MS/2	AIB	0,1	2,16A	13,33B
		1,0	3,24A	80,00A

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey em nível de 5%.

possam ser enraizadas nos dois sistemas, o enraizamento *ex vitro* é mais indicado por apresentar menor custo e em geral promove um sistema radicular mais completo e funcional, sem a formação intermediária de calo o que pode dificultar a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (Gratapaglia & Machado, 1990).

Plantas propagadas por sementes e micropropagadas foram analisadas quanto a produção de diásporos e altura da planta. Constatou-se que não houve diferença significativa entre a altura da planta advinda de semente (47,5 cm) e a planta advinda da micropropagação (45,5 cm). Também não foi verificada diferença significativa na produção de diásporos por planta, a média da produção em plantas advindas de sementes foi de 42,8 g (\pm 7,8) e plantas advindas da micropropagação de 42,5 g (\pm 9,6). As plântulas micropropagadas apresentaram homogeneidade de cor e tamanho da flor com características idênticas a

planta matriz. Esse resultado nos permite afirmar que o protocolo desenvolvido nesse trabalho é eficiente para micropropagar *Calendula officinalis*.

CONCLUSÃO

Fitoterápicos de calêndula são produzidos a partir das flores. Plântulas de calêndula advindas de sementes não guardam semelhança com a planta matriz quanto ao tamanho e cor das flores e nem tão pouco em relação aos princípios ativos.

O protocolo apresentado nesse trabalho permitirá a produção em larga escala de clones obtidos a partir de capítulos de plantas, cujo perfil químico poderá ser previamente conhecido. Plântulas produzidas *in vitro* a partir de capítulos têm uma grande vantagem sobre aquelas produzidas a partir de sementes, porque contaminam menos e são "true-to-type". O desenvolvimento do protocolo proposto nesse trabalho permite a propagação, em escala, de material clonal de *C. officinalis* num prazo máximo de seis meses, representando uma alternativa viável de produção de matéria prima de qualidade para a indústria de fitoterápico e cosméticos

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BEZÁKOVA, L. et al. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie**, v.51, n.2, p.126-7, 1996.
- BÖTTCHER, K.Z.; GÖRING, H. Induction and resorption of vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.72, p.560-4, 1988.
- BOUCAUD-MAITRE, Y.; ALGERNON, O.; RAYNAUD, J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. **Pharmazie**, v.43, n.3, p.220-1, 1988.
- CURTIS, O.F.; SHETTY, K. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. **Acta Horticultural**, v.426, p.489-503, 1996.
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation technology and application**. 2. ed. Netherlands: Klumer Academic, 1993. p.1-13.
- DELLA LOGGIA, R. et al. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v.60, p.516-20, 1994.
- DÍAZ-PÉREZ, J.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E.G. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microculture apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v.9, p.225-32, 1995.
- EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE FOR PHYTOTHERAPY - ESCOP. *Calendula flos* na *Calendulae flos cum Herba*. Netherlands: Escop, 1992. p.311-6.
- GAMBORG, O.L. Plant cell cultures: nutrition and media. In: VASIL, I.K. (Ed). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.18-26.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicação da cultura de tecidos e de plantas**. Brasília: Associação Brasileira de Cultura de Tecido de Plantas, 1990. p.100.
- HEROLD, A. et al. Antioxidant properties of some hydroalcoholic plant extracts with antiinflammatory activity. **Roumanian Archives of Microbiology Immunology**, v.62, n.3-4, p.217-27, 2003
- KITTO, S.L. Commercial Micropropagation. **Hortscience**, v.32, n.6, p.1012-6, 1997
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiological Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NEUKIRCH, H. et al. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula officinalis* L. and characterization of a new triterpenoid monoester. **Phytochemical Analysis**. v.15, p.30-5, 2004.
- QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGUE, A. Ornamentals. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation technology and application**. 2.ed. Netherlands: Klumer Academic, 1993. p.215-29.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticultural**, v.78, p.437-42, 1997.
- VIEITEZ, A.M. et al. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of *Chestnut* regenerated *in vitro*. **Physiology Plantarum**, v.65, p.177-84, 1985.
- WHITE, P.R. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. **Annual Review Plant Physiology**, v.2, p.231-44, 1951.
- ZITTERL-EGLESEE, K. et al. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula Officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.139-44, 1997.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45-69.
- ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation: technology and application**. 2. ed. Netherlands: Klumer Academic, 1993. p.45-69.