

INDUÇÃO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE MASSA CELULAR INDIFERENCIADA DE MENTRASTO (*Ageratum conyzoides* L. SIEBER)

INDUCTION AND *in vitro* MULTIPLICATION OF UNDIFFERENTIATED CELLULAR MASS OF THE MENTRASTO (*Ageratum conyzoides* L. SIEBER)

JULIO CEZAR DE SOUZA¹, GILMAR ROBERTO ZAFFARI²

¹Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade do Vale do Itajaí/ UNIVALI - Rua Uruguai, 458 - Cx. P. 360 - 88302-202 - Itajaí, SC - julio.bio@terra.com.br

²Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do curso de ciências Biológicas - Universidade do Vale do Itajaí/ UNIVALI - Rua Uruguai, 458 - Cx. P. 360 - 88302-202 - Itajaí, SC - gzaffari@epagri.sc.gov.br

RESUMO

A espécie *Ageratum conyzoides* L. Sieber, popularmente conhecida como mentrasto, apresenta uso medicinal difundido pela população brasileira e de outros países. *A. conyzoides* tem atualmente o consumo aumentado a partir de sua inclusão na lista da Central de Medicamentos e subsequente verificação de sua eficácia como analgésico e anti-inflamatório. Neste estudo, objetivou-se estabelecer uma metodologia para a indução e multiplicação de biomassa celular indiferenciada (calo) em *Ageratum conyzoides*, visando a atender a demanda de material vegetal para a extração desses metabólitos. O estabelecimento das culturas assépticas foi obtido a partir da germinação de sementes *in vitro*. A indução de massa celular indiferenciada ocorreu indiferentemente ao acréscimo ou não de reguladores de crescimento no meio de cultivo e do tipo de explante, enquanto que a multiplicação foi maior em meio MS acrescido de fitormônios 2,4-D e CIN. A espécie *Ageratum conyzoides* apresenta boa resposta morfo genética *in vitro* para produção de biomassa celular indiferenciada.

Termos para indexação: mentrasto, *Ageratum conyzoides*, micropropagação, calogênese, BAP.

ABSTRACT

The *Ageratum conyzoides* L. Sieber species, popularly known as mentrasto, presents medicinal use spread out by the Brazilian population and other countries. It has had its consumption increased from its inclusion in the list of the Medicine Central office and subsequent verification of its effectiveness as analgesic and antiinflammatory. The objective of the present study was to establish a methodology for the induction and multiplication of undifferentiated cellular biomass (callus) in *Ageratum conyzoides* aiming to attend the demand of vegetable material for the extraction of these metabolites. The establishment of the aseptic cultures was obtained from the *in vitro* germination of seeds. The induction of undifferentiated cellular mass occurred independent of the increase or not of growth regulators in the culture medium and the type of explant, whereas the multiplication was higher in MS medium supplemented with 2,4-D and KIN. The species *Ageratum conyzoides* presents good

in vitro morphogenetic response for production of undifferentiated cellular biomass.

Index terms: mentrasto, *Ageratum conyzoides*, micropropagation, calogenesis, BAP.

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais obtidos a partir de metabólitos secundários e derivados representam 50% do total das drogas de uso clínico, sendo que 25% do total são originárias de plantas superiores (SERAFINI et al., 2001). A concentração dos metabólitos secundários nas plantas, em geral, é baixa, se comparada com os metabólitos primários. A biossíntese é restrita a alguns tipos de células e tecidos especializados, o que dificulta os processos laboratoriais e industriais de produção, extração e purificação dos metabólitos secundários (SERAFINI et al., 2001).

A produção *in vivo* de algumas substâncias por meio de plantas também enfrenta limitações, como a baixa concentração de alguns produtos de interesse, a falta de tecnologia agrícola para o cultivo em larga escala e a impossibilidade de produção em qualquer época do ano, em razão das variações das condições ambientais. A obtenção de biomassa para a produção de metabólitos *in vitro* vem sendo utilizada pela indústria farmacêutica como uma alternativa de produção em condições ambientais controladas (HOSTETTMANN et al., 2003).

Atualmente, inúmeros estudos estão sendo realizados na área de cultura de tecidos vegetais com

(Recebido em 01 de outubro de 2009 e aprovado em 29 de maio de 2011)

resultados promissores. Com o avanço crescente da biotecnologia, esses estudos ganharam um grande impulso utilizando a micropropagação e bioreatores para a obtenção de metabólitos secundários com um mínimo de impacto à natureza (OKSMAN-CALDENTY & INZÉ, 2004).

A utilização da espécie *Ageratum conyzoides* L. Sieber como planta fitoterápica pela medicina popular e o interesse da indústria farmacêutica por suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (MARQUES NETO et al., 1998) tem intensificado a demanda por material vegetal dessa espécie. Nesse sentido, neste trabalho. Objetivou-se alcançar a produção de massa celular indiferenciada (calo) *in vitro* para a obtenção de metabólitos secundários, uma vez que pode proporcionar um permanente fornecimento de biomassa e redução de custos para a indústria.

MATERIAL E MÉTODOS

A indução de calo foi realizada a partir de explantes foliares e caulinares (entrenós), oriundos de plântulas germinadas *in vitro*, provenientes do laboratório de cultura de tecidos vegetais da Universidade do Vale do Itajaí, com 40 dias de idade. Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), na presença dos fitoreguladores Benzilaminopurina (BAP) (0,00; 8,88; 13,33 μM), cinetina (CIN) (0,00; 14,00 μM) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,00; 9,00 μM) em diferentes combinações; sacarose (3%) como fonte de carbono; e solidificado com ágar (7g L⁻¹). Foram mantidos por um período de 30 dias em câmara de crescimento, sob temperatura constante de 23 °C \pm 2 °C, umidade relativa do ar aproximadamente 60%, fotoperíodo de 16 horas de luz branca com intensidade de 40 a 50 mmol m⁻² s⁻¹. Após esse período, a avaliação foi realizada pela porcentagem de explantes que formaram calo e a porcentagem de formação de plântulas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos, 11 repetições por tratamento e um explante por parcela, durante 30 dias.

Os calos obtidos na fase de indução foram submetidos à multiplicação em meio MS acrescido de 2,4-D

(4,52; 9,00 e 18,00 μM) e CIN (0,0; 4,65; 9,30 e 18,60 μM) em diferentes combinações; sacarose (3%) como fonte de carbono e solidificado com ágar (7g L⁻¹). Foram realizadas 11 repetições por tratamento e cada repetição consistiu de 1 frasco contendo um 1 grama de calo e mantido por 90 dias na fase de multiplicação. As culturas foram mantidas por um período de 90 dias em sala de crescimento, sob temperatura de 28 \pm 2°C e fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 40 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As avaliações foram feitas a cada 30 dias e foi verificado o aumento de massa por meio do peso em miligramas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução de massa celular indiferenciada (calo) ocorreu em 100% dos explantes foliares independentemente da composição do meio de cultura (tabela 1). O mesófilo da folha é grandemente constituído de parênquima, que é um tecido com considerável plasticidade e possui uma maior facilidade de desdiferenciação (PINTO E LAMEIRA, 2001). Por outro lado, os explantes nodais apresentaram resposta morfogênica diferenciada em relação à composição do meio de cultura. Os tratamentos que continham reguladores de crescimento BAP (8,88 μM) isolados e BAP (13,33 μM), 2,4-D (9 μM) e CIN (13,95 μM) combinados induziram 100% de formação de calo. O caule, apesar de ser um tecido especializado, é utilizado na micropropagação, pela presença do periciclo, que é uma camada de células competentes e prontas para a diferenciação que origina as raízes laterais ou adventícias (RAVEN et al., 1996).

A ausência de reguladores de crescimento nos segmentos nodais reduziu a porcentagem de formação de calo para 58,30%. Possivelmente, após a separação da planta matriz, alguns tecidos passaram a produzir hormônios endogenamente e, se a relação do balanço de auxina/citocinina for próxima a um, a tendência será a formação de calo, mas se for menor que um ocorrerá a regeneração da parte aérea (RAVEN et al., 1996). Os

explantes nodais que não formaram calo apresentaram o desenvolvimento da gema lateral, com a regeneração de plântula (41,70%) (dados não apresentados). Foi observado que em 25% das plântulas regeneradas houve a formação de calo na região basal. O aparecimento de calo na base das plântulas pode ter ocorrido, em razão de uma posterior alteração no balanço entre auxina/citocinina pelo metabolismo das células. Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (SKOOG & MILLER, 1957).

A multiplicação de calos de *Ageratum conyzoides*, ao longo de 90 dias de cultivo, apresentou variadas respostas em função do tipo, combinação e concentração dos reguladores de crescimento (Tabela 2). Os meios contendo 4,52 μM e 18,00 μM de 2,4-D proporcionaram um acréscimo de 26,36 e 24,24 mg, na massa fresca dos calos, respectivamente, aos 30 dias de cultivo. Entretanto, o tratamento contendo 4,52 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN e

o tratamento contendo 9,00 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN obtiveram efeito sobre a taxa de multiplicação aos 30 dias de cultivo. O aumento da concentração de CIN de 4,65 μM para 18,60 μM acompanhado de 9,00 μM de 2,4-D inibiu a proliferação celular dos calos aos 90 dias de cultivo. Os tratamentos que continham 18,00 μM de 2,4-D combinados com 4,65 ou 9,30 μM de CIN proporcionaram um maior incremento de massa no calo, diferindo significativamente dos tratamentos que continham 4,52 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN, 9,00 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN, 9,00 μM de 2,4-D e 18,60 μM de CIN e o tratamento 18,00 μM de 2,4-D e 18,60 μM de CIN aos 30 dias de cultivo. Culturas de segmentos nodais de *Gymnema sylvestris* em meio MS adicionado de 22,60 μM 2,4-D e 4,65 μM CIN proporcionaram a indução de calo em 25 dias de cultivo e a multiplicação celular foi mais efetiva quando os calos foram mantidos no mesmo meio ou em meio MS sem reguladores de crescimento (ROY et al., 2008). Em *Phyllanthus urinaria* L. a maior frequência de indução e multiplicação dos calos foi obtida em segmentos nodais

TABELA 1 – Porcentagem de indução de massa celular indiferenciada (calo) em explantes foliares e caulinares de *Ageratum conyzoides* cultivados em meio MS, acrescido de Benzilaminopurina (BAP), Cinetina (CIN) e Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

	Reguladores de crescimento (μM)			Formação de calo (%)
	BAP	2,4-D	CIN	
Explante foliar				
T1	-	-	-	100
T2	8,88	-	-	100
T3	13,33	9	13,95	100
Explante nodal				
T1	-	-	-	58,30
T2	8,88	-	-	100
T3	13,33	9	13,95	100

cultivados em meio MS adicionado de 5,00 μM de AIB. As auxinas 2,4-D e ANA promoveram um moderado incremento na massa fresca dos calos, quando utilizados separadamente (CATAPAN et al., 2002). Explantes foliares de *Hypericum perforatum* L. apresentaram maior indução de calo quando cultivados na presença de 4,40 μM de BAP e 4,50 μM 2,4-D no escuro (PRETTO & SANTARÉM, 2000). A permanência das culturas de *Ageratum conyzoides*, nos diferentes tratamentos descritos pelo período 60 e 90 dias não promoveu um incremento significativo da massa de calos. Entretanto, o maior incremento de calo foi obtido no meio contendo 18 μM de 2,4-D e 9,30 μM de CIN aos 60 dias de cultivo, diferindo, significativamente, dos meios contendo 4,52 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN e do meio contendo 9,00 μM 2,4-D e 18,60 μM de CIN. O meio contendo 9,00 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN e o meio contendo 18,00 μM de 2,4-D e 18,60 μM de CIN, apesar de terem proporcionado baixo incremento de massa celular aos 30 dias, evidenciaram um efeito tardio positivo na proliferação de calos aos 60 dias de cultivo. Por outro lado, o tratamento contendo 18,00 μM de 2,4-D e 4,65 μM de CIN apresentou um incremento constante de massa celular do calo, ao longo de todo o período de cultivo, porém, a maior diferença de incremento ocorreu dos 60 aos 90 dias.

O cultivo prolongado dos calos por 60 e 90 dias não se mostrou viável em termos de multiplicação celular, visto que não houve diferença significativa no crescimento de massa fresca dos calos. Esse efeito não significativo pode ser decorrente da falta de ação dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, por um período de tempo mais prolongado. Segundo Kerbauy (2004), alguns reguladores de crescimento, principalmente as auxinas, são de fácil degradação pela ação da luz e das altas temperaturas (como na autoclavagem), levando a uma perda significativa de sua ação. Outra possível explicação para o baixo rendimento no incremento dos calos, aos 60 e 90 dias de cultivo, seria a de que as culturas que deram origem à formação de calo, utilizando explante foliar e caulinar, tenham apresentado maior capacidade de biossíntese de fitohormônios do que aquela apresentada pelos calos, na fase de multiplicação, produzindo maior biomassa celular (observação visual). Uma das maneiras de manter a taxa de proliferação das células elevada é utilizar explantes diferenciados, tanto para a indução quanto para a multiplicação.

Outro possível efeito relacionado ao baixo incremento de massa celular aos 60 e 90 dias, foi a observação de calos amarronzados após 30 dias de cultivo

TABELA 2 – Incremento de massa fresca de calos de *Ageratum conyzoides* cultivados em meio MS, acrescido de Ácido 2,4-Diclorofenoxyacético (2,4-D) e Cinetina (CIN), aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

Reguladores de crescimento (μM)		Incremento de calo (mg)		
2,4-D	CIN	30 dias	60 dias	90 dias
4,52	-	26,36 b c A	14,54 a b A	24,54 a A
18	-	24,24 b c A	21,81 a b A	31,81 a A
4,52	4,65	0,00 c A	0,00 b A	7,27 a A
9,00	4,65	6,36 c A	59,09 a b A	53,63 a A
9,00	18,60	0,00 c A	3,66 b A	0,00 a A
18,00	4,65	45,45 a b A	57,27 a b A	90,00 a A
18,00	9,30	58,18 a A	77,27 a A	76,36 a A
18,00	18,60	2,72 c A	20,91 a b A	20,00 a A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,005$).

(dados não apresentados), o que pode significar o aparecimento de oxidação fenólica. Cid (1999), revela que o escurecimento das massas celulares é um sinal de oxidação dos fenóis pela polifenoxidase, que forma quinonas que, ao se polimerizarem, originam tecidos amarronzados, que podem impedir a metabolização dos hormônios das classes das auxinas e das citocininas, estes importantes na ativação do ciclo celular. Portanto, a oxidação do calo pode reduzir a velocidade do ciclo celular, inibindo o crescimento e a multiplicação das células. O baixo incremento de massa celular, obtido no cultivo mais prolongado das culturas, sugere a necessidade de repicagem dos calos a cada 30 dias, para maior eficiência do meio de cultura na ativação do ciclo celular.

CONCLUSÕES

A obtenção de massa celular indiferenciada de *A. conyzoides* é promovida independente da concentração e do tipo de regulador de crescimento, bem como do explante de origem.

O incremento da massa fresca dos calos de *A. conyzoides* é dependente dos reguladores de crescimento 2,4-D e CIN e diminui em cultivos prolongados (60 e 90 dias).

A espécie *A. conyzoides* apresenta boa capacidade morfogenética *in vitro* para a produção de biomassa celular indiferenciada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CATAPAN, E.; LUIS, M.; DA SILVA, B.; NETTO MORENO, F.; VIANA, A. M. Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae). **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 70, n. 3, p. 301-309. 2002.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S & BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: CBAB/ EMBRAPA, 1999. p. 183-260.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Editora Guanabara Koogan: São Paulo, 2004. 451p.
- MARQUESNETO, J. F.; COSTALLAT, L. T. L.; FERNANDES, S. R. M.; NAPOLI, M. D. M.; SAMARA, A. M. Efeitos de *Ageratum conyzoides*, Linee no tratamento da artrose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 28, n. 109, 1998.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, Lisboa, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 102p.
- PRETTO, F. R.; SANTAREM, E. R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 62, n. 2, p. 107-113, 2000.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007. 728p.
- ROY, A.; GHOSH, S.; CHAUDHURI, M.; SAHA, P. K. Effect of different plant hormones on callus induction in *Gymnema sylvestris* R. Br. (Asclepiadaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n 13, p. 2209-2211, 2008.
- SERAFINI, L, A.; BARROS, N, M.; AZEVEDO, J, L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. v. 11, p. 118-130, 1957.