

Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*

Cláudia Simone Madruga Lima¹, Juliana de Magalhães Bandeira², Sílvia Rubin², Márcia Vaz Ribeiro², Letícia Benitez², José Antonio Peters³ e Eugenia Jacira Bolacel Braga³

Introdução

A técnica de micropropagação é utilizada para a produção de plantas em larga escala com qualidades morfológicas e fisiológicas, bem como para a obtenção de um mínimo de variação somaclonal. Isto é alcançado através do controle da composição do meio, das condições da planta matriz e origem dos explantes [1].

Na cultura de tecidos, a composição e concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento, sendo as auxinas e as citocininas as classes de fitorreguladores mais utilizadas neste sistema de cultivo [2].

Esta técnica pode utilizar gemas axilares ou adventícias, sendo, no entanto, as gemas axilares preferidas por apresentarem menores variações somaclonais e epigenéticas [3].

Atualmente e sob expectativas futuras, a micropropagação é direcionada às atividades comerciais, objetivando a limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais, florestais, agrônomicas e medicinais. A micropropagação de espécies medicinais justifica-se pela crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica bem como, com a capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, através do melhoramento genético [2].

A *Mentha viridis* L. (Lamiaceae), conhecida popularmente como Hortelã verde, é muito utilizada na medicina popular. As mentas possuem efeitos antiespasmódicos, antireumáticos, diuréticos, carminativos, estomáquicos, além das propriedades tônicas e estimulantes, favorecem a expectoração, no uso contra tosse e asma [4,5]. São também largamente utilizadas pelas indústrias de vários países para extração do óleo essencial, que é rico em monoterpenos, com propriedades cosméticas, farmacêuticas, culinárias, bem como para fabricação de licores [6].

Este trabalho teve como objetivo determinar a melhor concentração e combinação do ácido naftaleno acético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP) para obtenção de melhores características das plantas de *Mentha viridis*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de

Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Os explantes utilizados foram retirados de plantas previamente cultivadas *in vitro* em meio MS 30 g L⁻¹. Segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento, foram transferidos para o meio MS [7] acrescido das combinações de BAP (0, 1 e 2 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 após a adição dos fitorreguladores, antes da autoclavagem. Os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de 25 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 40 µmol m⁻² s⁻¹, provida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de um esquema fatorial 3x3, com cinco repetições, sendo cada uma, representada por um frasco contendo quatro explantes. Os dados analisados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os parâmetros avaliados foram altura, números de folhas e gemas, além da massa fresca da parte aérea, após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Resultados e Discussão

Observou-se diferença significativa para todos os tratamentos, em que as plantas de *Mentha viridis* foram submetidas. Para a altura das plantas as médias mais elevadas foram obtidas nos tratamentos contendo 1 mg L⁻¹ de BAP sem adição de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP com 0,5 mg L⁻¹ de ANA. No entanto, estes não diferiram estatisticamente do meio sem suplementação de fitorreguladores, sugerindo que para redução de custos, estes podem ser utilizados em baixas concentrações ou até mesmo evitados (Tab.1). Ao contrário de Diniz [8], que observou maior crescimento em altura, de plantas de Macela (*Egletes viscosa*), na ausência de BAP, assim como, Erig *et al.*[9] em pesquisas com amoreira preta, o aumento nos níveis de BAP resultou na diminuição do comprimento médio das brotações.

O meio MS contendo 1 mg L⁻¹ de BAP combinado com qualquer uma das concentrações de ANA e ausência de BAP com zero ou 0,50 mg L⁻¹ de ANA foram melhores para o número médio de gemas, não diferindo estatisticamente entre si. Proporcionando um maior número de explantes para subcultivo (Tab. 2). No

1. Aluna da Faculdade de Agronomia - FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Bolsista de Iniciação Científica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Capão do Leão, RS. Caixa Postal 354, CEP 96010-900. E-mail: claudialim@pop.com.br

2. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Apoio financeiro: CAPES e FAPERGS.

trabalho de micropropagação realizado por Souza *et al.* [10] com *Lychnophora pinaster* Mart, as melhores respostas para o número de gemas foram obtidas com adição de 0,62 mg L⁻¹ de BAP ao meio, atestando a eficiência deste fitorregulador para a formação de gemas. Assim como Pasqual *et al.* [11], que encontraram uma maior indução da multiplicação de brotos de amoreira-preta com a adição de uma auxina sintética (ácido indolilbutírico).

Maior média de massa fresca da parte aérea foi obtida com 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,50 mg L⁻¹ de ANA, com subsequente redução da massa fresca, à medida que se diminui a concentração desses reguladores de crescimento (Tab. 3). Essa resposta provavelmente é devida a um desbalanço na relação auxina/citocinina. Comportamento oposto ao encontrado por Dutra *et al.* [12], em trabalhos de multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.), onde a medida em que aumentou a concentração de BAP, houve redução nessa variável.

Para o número de folhas, a maior média foi encontrada no meio suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP e zero de ANA, não diferindo estatisticamente dos meios contendo zero e 2 mg L⁻¹ de BAP, combinados com 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ de ANA (Tab. 4). Villa *et al* [13] verificou em seus estudos com amoreira preta (*Rubus* spp.), que o maior número de folhas foi encontrado no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e que a massa fresca da parte aérea sofre incremento, em virtude da diminuição nas concentrações de BAP. Cheema & Sharma [14], indicam que o BAP induz a uma alta taxa de multiplicação nas concentrações de 2 a 4 mg L⁻¹ para macieira. Um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* [15].

Segundo Torres *et al.* [1] o uso de citocininas estimula maior produção de parte aérea através do aumento da massa fresca, número de gemas e folhas, porém o contrário é obtido com a utilização de concentrações mais elevadas, acima da ótima para a multiplicação da espécie em estudo.

Foi observado enraizamento das plantas em todos os tratamentos, constatando que o acréscimo de auxinas e citocininas não danificaram o desenvolvimento radicular.

Conclui-se através do presente estudo que existe combinações ideais dos fitorreguladores, citocinina e auxina, para o desenvolvimento específico de cada parte aérea de *Mentha viridis*.

Referências

- [1] TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Volume I. Embrapa/Brasília. 509p. 1998.
- [2] CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks-EMLA *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 131, p. 75-88, 1983.
- [3] TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Volume II. Embrapa/Brasília. 517p. 1999. Acesso em: 25 de abril, 2005.
- [4] BRUGNERA, A.; CARDOSO, D.; BOUERI, M.A.; MALUF, W.R. Cultivo e propriedades medicinais da hortelã. *Boletim Técnico de Hortaliças* N° 34. UFPA, Departamento de Agricultura, 1ª ed. Julho, 1999.
- [5] COOK, W.M.H. [Online]. *The Physiomedical Dispensary*, Medical Herbalism journal, Mentha Viridis spearmint. Homepage: <http://medherb.com/cook/cook.pdf>.
- [6] KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S.; SHASANY, A.K.; DHAWAN, S.; DAROKAR, M.P.; TRIPATHY, A.K.; SATAPATHY, S.; KUMAR, T.R.S.; GUPTA, V.K.; TRIPATHI, A.K.; AWASTHI, S.; PRAJAPATI, V.; NAQVI, A.A.; AGRAWAL, K.K.; BAHAL, J.R.; SINGH, A.K.; AHMED, A.; BANSAL, R.P.; KRISHNA, A.; SAIKIA, D. 2005 [Online]. *Mint plant mentha spicata l. var. viridis christened as 'ganga'*. Homepage: <http://www.freshpatents.com/Novel-mint-plant-mentha-spicata-l--var-viridis-christened-as-ganga--dt20050224ptan20050044600.php>
- [7] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco culture tissues. *Physiological Plant*, v.15, p.473-497, 1962.
- [8] DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L.; TEIXEIRA, A.L.A.; GOMES, E.S. E HERNANDES, F.F.F. Ácido giberélico (GA3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de Macela [Egletes viscosa (L.) Less.] *Ciência e agrotecnologia*, Lavras. V.27, n.4, p.934-938, jul./ago, 2003.
- [9] ERIG, A.C.; GERSON, A.R.; FORTES, R.L. 6-benzilaminopurina e ácido indolilbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*rubus idaeus* l.), cv. tupy. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002
- [10] SOUZA, A.V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003.
- [11] PASQUAL, M.; PEIXOTO, P. H. P.; SANTOS, J. C. dos., *et al.* Propagação *in vitro* da amora-preta (*Rubus* sp) cv. Ébano: Uso de reguladores de crescimento. *Ciência e Prática*, Lavras, v.3, p.282-286, 1991.
- [12] DUTRA, L.F.; OLIVEIRA, A.F.; FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M. *Comunicação: Multiplicação in vitro de Oliveira (Olea europaea L.) Olive (Olea europaea L.) in vitro multiplication*. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, v. 28, n. 1, p. 220-223, jan./fev., 2004.
- [13] VILLA, F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.; PIO, L.A.P. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. *Acta Scientifc Agronomy*, Maringá, v. 28, n. 1, p. 47-53, Jan./March, 2006.
- [14] TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M.G.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. *Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: Formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas*. Circular Técnica nº24. Embrapa, Brasília, p.1-20, 2001.
- [15] PIERIK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 356 p.

Tabela 1. Altura média das plantas (cm) de *Mentha viridis*, mantidas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP no meio de cultivo

ANA (mg L ⁻¹)		BAP (mg L ⁻¹)	
	0	1	2
0	7,60 AB a	9,17 A a	5,62 B b
0,25	8,85 A a	8,30 A a	8,57 A a
0,5	8,90 A a	5,95 B b	9,10 A a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Número médio de gemas formadas em plantas de *Mentha viridis*, mantidas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP no meio de cultivo

ANA (mg L ⁻¹)		BAP (mg L ⁻¹)	
	0	1	2
0	12,50 A a	12,72 A a	9,25 B b
0,25	11,72 B a	14,00 A a	12,00 B a
0,5	12,60 A a	12,27 A a	10,12 B b

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Massa fresca média da parte aérea (g) das plantas de *Mentha viridis*, mantidas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP no meio de cultivo

ANA (mg L ⁻¹)		BAP (mg L ⁻¹)	
	0	1	2
0	0,32 AB b	0,61 A ab	0,25 B b
0,25	0,43 B b	0,79 A a	0,79 A a
0,5	0,77 A a	0,34 B b	1,03 A a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Número médio de folhas das plantas de *Mentha viridis*, mantidas *in vitro*, por 40 dias com diferentes concentrações de ANA e BAP no meio de cultivo

ANA (mg L ⁻¹)		BAP (mg L ⁻¹)	
	0	1	2
0	10,27 B a	12,50 A a	6,65 C b
0,25	9,00 A a	10,50 A b	10,57 A a
0,5	9,87 A a	9,85 A b	9,12 A a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.