

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

FERNANDA DE MELO MUNDIM

**CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE HORTELÃ-
PIMENTA.**

**Uberlândia – MG
Setembro – 2013**

FERNANDA DE MELO MUNDIM

CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE HORTELÃ-PIMENTA.

Apresentação de trabalho de conclusão do curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Dr. José Magno de Queiroz Luz

**Uberlândia – MG
Novembro – 2012**

FERNANDA DE MELO MUNDIM

CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE HORTELÃ-PIMENTA.

Apresentação de trabalho de conclusão de curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em _____

Dra. Adelaide Siqueira Silva
Membro da Banca

Ms. Roberta Camargos
Membro da Banca

Prof. Dr. José Magno de Queiroz Luz
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças concedidas.

Agradeço aos meus pais Luci Mary e Jânio que foram maravilhosos em todos os sentidos e que me deixam a herança mais preciosa, que é a oportunidade de poder estudar.

Aos meus irmãos Bruno e Murilo que foram amigos fieis e torceram muito por mim.

Ao orientador José Magno, pela paciência e dedicação e a Adelaide pelo aprendizado que me proporcionou.

Aos conselheiros, e a todos meus amigos, principalmente ao Diogenes que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho se realizassem.

À 44ª turma do Curso de Agronomia e demais, com os quais tive a oportunidade de contribuir em sua história, vocês vão ficar em minhas lembranças e agradeço por levar comigo várias amizades pra vida toda.

RESUMO

O hortelã-pimenta é um híbrido triplo, *Mentha Piperita*, utilizado de forma medicinal. Na micropropagação, o BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (cinetina) têm sido as fontes de citocininas mais empregadas. o principal meio de propagação da cultura é via vegetativa, porém maior eficiência poderia ser constatado por meio da utilização de micropropagação, na qual o BAP e o KIN configuram os reguladores de crescimento mais utilizados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de reguladores vegetais na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta. Explantes constituídos de segmentos nodais provenientes de plântulas já estabelecidas *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm foram inoculados em meio MS, suplementado com diferentes associações de BAP e KIN, em adição de 30 g L⁻¹ de sacarose. A utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP promove a multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta, porém, diminui o índice de sobrevivência. O uso de citocininas aumenta a massa fresca e seca dos explantes e a ausência destes reguladores propicia o alongamento nesta espécie.

Palavras chave: *Mentha piperita*, cultura de tecidos e regulador de crescimento.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	7
2 Revisão de Literatura.....	8
3 Material e Métodos.....	10
4 Resultados e discussão.....	11
5 Conclusões.....	16
Referências Bibliográficas.....	17

1 Introdução

A *Mentha piperita* L. é uma planta conhecida como hortelã-pimenta, menta ou hortelã-apimentada, pertencente à família Labiatae. Seu uso medicinal é recomendado para o tratamento de náuseas, cólicas gastrointestinais, flatulências, cálculos biliares, icterícia, ansiedade, expectoração e expulsão de vermes intestinais. As propriedades medicinais desta planta estão relacionadas com o óleo essencial extraído de suas folhas frescas (LORENZI & MATOS, 2002; CORRÊA et al., 2003).

Sua propagação pode ser sexuada ou vegetativa. No entanto, a multiplicação via sementes é laboriosa. De acordo com Veronese et al. (2001), 18000 botões florais de hortelã-pimenta contendo mais de 2,75 milhões de óvulos desenvolveram apenas 6 sementes viáveis. Ainda, a variabilidade genética decorrente da multiplicação via sementes pode comprometer o uso desta espécie para propósitos farmacêuticos, devido a variações na composição química do óleo extraído. Por outro lado, a propagação assexuada do hortelã-pimenta pode permitir o acúmulo de fungos sistêmicos, bactérias e infecções virais que prejudicam a produção desta espécie.

Neste contexto, a cultura de células e de tecidos pode resolver ou minimizar pontos críticos na multiplicação sistematizada de plantas com propriedades medicinais e ou produtoras de óleos essenciais pelo processo de micropropagação.

Um dos principais fatores que interferem na propagação *in vitro* é a suplementação do meio de cultivo com reguladores de crescimento. Na micropropagação, o BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (cinetina) têm sido as fontes de citocininas mais utilizadas (NAGORI & PUROHIT, 2004), pois são reguladores de crescimento associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, participando no controle da divisão celular. As citocininas estimulam o crescimento pela expansão mais que pelo alongamento (STOYNOVA et al., 2004) e, em plantas aromáticas, também vêm sendo utilizadas para maximizar a biomassa e a produção de óleos essenciais (STOEVA & ILIEV, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de reguladores vegetais na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta, utilizando-se diferentes concentrações de BAP e KIN.

2. Revisão de Literatura

O gênero *Mentha* pertence à família da Lamiaceae e compreende um número muito grande de espécies, dentre elas a *Mentha piperita* L., planta aromática e medicinal, conhecida como hortelã e menta. Essas plantas são originárias da Europa, suportam temperaturas muito baixas, mas são bem adaptadas ao clima tropical (Souza et al., 2007).

A micropropagação é um método de propagação vegetativa amplamente estudado em diversas espécies vegetais, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos que mais se tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas. Entre as vantagens de sua utilização, estão as possibilidades de se obter várias plantas a partir de um único explante inicial, independentemente de condições climáticas; redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente com fidelidade durante a multiplicação e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (Schuch, 2005).

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos (Carvalho, 2005). A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas, mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelera a propagação de orquídeas (Machado, 1998).

A micropropagação é utilizada principalmente nas plantas de difícil propagação, permitindo a obtenção de grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes, em curto período de tempo. A citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Já a cinetina afeta o crescimento e a diferenciação das raízes, quebra a dominância apical em gemas laterais, estimula a divisão e o crescimento celulares, estimula a germinação e a floração, retarda o envelhecimento.

A propagação vegetativa tem sido utilizada para a produção de mudas de diversas espécies. Entre as técnicas utilizadas destacam-se a estaquia, a miniestaquia e a micropropagação. A principal vantagem da micropropagação em relação às demais técnicas se encontra na possibilidade de rápida multiplicação de plantas em qualquer época do ano, além da eliminação de vírus (GALLO; CROCOMO, 1995).

Neste contexto, a cultura de células e de tecidos pode resolver ou minimizar pontos críticos na multiplicação sistematizada de plantas com propriedades medicinais e ou produtoras de óleos essenciais pelo processo de micropropagação.

3. Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Explantes constituídos de segmentos nodais provenientes de plântulas já estabelecidas *in vitro* com aproximadamente 0,5 cm foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com diferentes associações de BAP e KIN, em adição de 30 g L⁻¹ de sacarose.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos consistindo de 5 frascos cada um, sendo que cada frasco continha 4 explantes, um fatorial 3x3. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2000), utilizando-se o teste de regressão, a 5% de probabilidade. As concentrações de citocininas utilizadas foram 0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de KIN.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,2 atm durante 20 minutos. Posteriormente em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em frascos de 200 mL, contendo 30 mL do meio de cultivo MS. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 52,5W m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

Após 30 dias foram avaliadas as seguintes características: índice de sobrevivência (número de explantes desenvolvidos por número de explantes inoculados), número, comprimento, massa fresca e seca das brotações desenvolvidas.

4. Resultados e Discussão

O índice de sobrevivência e o número de brotos por explante foram significativamente influenciados apenas pelas concentrações de BAP (Tabela 1). Porém, os tratamentos que apresentaram ausência desta citocinina ou sua menor dose ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), tiveram 100% de sobrevivência. A menor taxa de sobrevivência (95,8%) foi verificada no tratamento com BAP a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 1).

Tabela 1. Análise de variância para as características avaliadas em plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP e KIN (mg L^{-1}).

FONTE DE VARIACÃO	Índice de sobrevivência (Pr>Fc)	Número de brotos (Pr>Fc)	Comprimento dos brotos (Pr>Fc)	Massa fresca (Pr>Fc)	Massa seca (Pr>Fc)
BAP	0,0470*	0,0007*	0,0001*	0,0001*	0,0000*
KIN	0,4428 ^{NS}	0,1795 ^{NS}	0,0103*	0,0009*	0,0000*
BAP x KIN	0,5130 ^{NS}	0,1362 ^{NS}	0,0960 ^{NS}	0,5802 ^{NS}	0,4871 ^{NS}
CV (%)	5,17	20,33	23,94	31,18	30,68

* significativo a 5% de probabilidade, ^{NS} não significativo



FIGURA 1. Índice de sobrevivência (%) em plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Por outro lado, o aumento da concentração de BAP estimulou a multibrotação, sendo que maior número de brotos (5,75) foi encontrado na maior concentração utilizada ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 2). Isto ocorre uma vez que esta citocinina é capaz de promover a quebra da dominância apical e da dormência das gemas laterais culminando, assim, com a formação de

novos brotos (GEORGE, 1993). Brotações múltiplas no gênero *Mentha* também têm sido reportadas a partir de calos derivados de embriões maduros e imaturos e de folhas, em meio MS suplementado com BAP+ANA (ácido naftaleno-acético) ou somente com BAP (VAN ECK & KITTO, 1990; 1992).

O resultado deste trabalho também corrobora com o encontrado em estudos de micropropagação de outras plantas medicinais, nos quais maiores taxas de multiplicação de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) (PEREIRA ET AL., 2000) e poejo do campo (*Cunila galioides* Benth.) foram observadas apenas com a adição de BAP ao meio de cultura (FRACARO & ECHEVERRIGARAY, 2001).



FIGURA 2. Número de brotos em plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}). Os valores são média de cinco repetições. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

O comprimento, a massa fresca e seca dos brotos foram estimulados pelas concentrações de BAP e de KIN, porém, não houve interação entre estes dois fatores para estas variáveis (Tabela 1). Maior comprimento de brotos foi obtido na ausência de BAP (7,05 cm) (Figura 3), como também na ausência de KIN (6,36 cm) (Figura 4). Skala & Wysokinska (2004) e Garlet et al. (2011) também observaram redução no alongamento de plantas de *Salvia nemorosa* L. e de *Mentha x gracilis* Sole, respectivamente, durante a proliferação *in vitro* destas espécies com o aumento da concentração de BAP. Pasqual (2001) relata que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações. Diante disto, pode-se inferir que concentrações mais elevadas de citocininas, principalmente o BAP, são eficientes para o aumento do número de novos brotos, enquanto que, contrariamente, concentrações mais baixas ou a ausência deste regulador promovem o alongamento do explante.



FIGURA 3. Comprimento de brotos (cm) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.



FIGURA 4. Comprimento de brotos (cm) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de KIN (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

As massas fresca e seca aumentaram linearmente à medida que as concentrações de BAP e KIN eram adicionadas ao meio de cultivo. A melhor resposta encontrada para massa fresca foi quando se utilizou $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Figura 5) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN (Figura 6), sendo os valores $1,05 \text{ g}$ e $0,95 \text{ g}$, respectivamente. Com o aumento da massa fresca no decorrer do tempo, o potencial osmótico do meio fica maior. Consequentemente, as plantas nesse meio conseguem absorver mais água para os seus tecidos e adquirem maior massa fresca (VILLA et al., 2005). Comportamento oposto, no entanto, foi encontrado por Dutra et

al. (2004) em trabalho de multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.), no qual à medida em que aumentou a concentração de BAP, houve redução nessa variável.



FIGURA 5. Massa fresca (g) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições Universidade Federal de Uberlândia, 2011.



FIGURA 6. Massa fresca (g) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de KIN (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

Para massa seca, os melhores resultados encontrados também foram nas maiores concentrações de citocininas, e os valores obtidos foram de 0,07 g com a utilização de BAP (Figura 7) e de 0,06 g utilizando-se KIN (Figura 8).



FIGURA 7. Massa seca (g) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de BAP (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições Universidade Federal de Uberlândia, 2011.



Figura 8. Massa seca (g) de plântulas de hortelã-pimenta cultivadas em diferentes concentrações de KIN (mg L^{-1}). Os valores são médias de cinco repetições Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

5. Conclusão

Com esse estudo, pode-se concluir que a utilização da maior dose de BAP promove a multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta, porém, diminui o índice de sobrevivência. O uso de citocininas aumenta a massa fresca e seca dos explantes, e a ausência destes reguladores propicia o alongamento nesta espécie.

Referências Bibliográficas

- CARVALHO, J.M.F.C. de; SOUZA, D.M. de; SANTOS, J.W. dos. Indução de superbrotamento e regeneração de plantas *in vitro* na cultivar de algodão CNPA 7H. *Revista de Oleaginosas e Fibrosas*, Campina Grande, v.4, n.2, p.61-65, maio/ago. 2000.
- CORRÊA, A.D. et al. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 6 ed. Petrópolis: Bozes, 2003. 247p.
- DUTRA, L.F. et al. Comunicação: Multiplicação *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.1, p.220-223, 2004.
- FERREIRA, D.F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA/DEX, 2000.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, n.1, p.1-4, 2001.
- GARLET, T.M.B. et al. Influência de citocininas na micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.1, p.30-34, 2011.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 1.ed. Dordrecht: Springer, 1993. 574p.
- GHANTI, K. et al. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.594-598, 2004.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NAGORI, R.; PUROHIT, S.D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* L. through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments. **Scientia Horticulturae**, v.99, n.1, p.89-98, 2004.

- PAOLICCHI, F. et al. Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L. **Scientia Horticulturae**, v.92, n.3-4, p.305-315, 2002.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PEREIRA, F.D. et al. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.74-80, 2000.
- SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a39v35n4.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2005.
- SKALA, E.; WYSOKINSKA, H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L., from shoot tips and leaf explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, p.596-692, 2004.
- STOEVA, T.; ILIEV, I. Influence of some phenylurea cytokinins on spearmint essential oil composition. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, v.23, n.3-4, p.66-71, 1997.
- STOYNOVA, B.E. et al. Cell division and cell expansion in cotyledons of arabidopsis seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.
- SUNANDAKUMARI, C. et al. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.108-112, 2004.
- VAN ECKE, J.M.; KITTO, S.L. Callus initiation and regeneration in *Mentha*. **Horticultural Science**, v.25, p.804-806, 1990.
- VAN ECKE, J.M.; KITTO, S.L. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.30, p.41-46, 1992.
- VERONESE, P. et al. Bioengineering mint crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.133-144, 2001.
- VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ÉBANO' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.3, p.582-589, 2005.
- WANG, X. et al. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. **In Vitro Cellular & Developmental**

Biology - Plant, on line first, 2008. Disponível em:

<<http://www.sjziam.ac.cn/sjziam/medial/2008/08pdf/20081204-wangxiaohuan.pdf>>. Acesso em: ago. 2011. doi 10.1007/s11627-008-9170-x.