

**PRÉ-TRATAMENTO PARA ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE
FRAGMENTOS FOLIARES DE *Cissus verticillata* (L) Nicolson & C.E.Jarvis**

**PRE-TREATMENT FOR *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF
Cissus verticillata LEAF FRAGMENTS**

Maurício Reginaldo Alves dos Santos¹
Maria das Graças Rodrigues Ferreira²
Josilene Félix da Rocha³
Sandra Mirlêny da Silva Carvalho⁴

RESUMO: A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, conhecida como insulina vegetal, é uma trepadeira perene e vigorosa. Nativa da região Amazônica é muito cultivada para fins ornamentais e medicinais. No Norte do país é empregada para tratamento de algumas doenças cardíacas e vem sendo utilizada no tratamento de *diabetes mellitus*. Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes tratamentos de desinfestação de explantes foliares de *C. verticillata* para o seu estabelecimento *in vitro*. Lâminas foliares foram seccionadas em segmentos com área aproximada de 1cm² e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Os explantes foram divididos em oito grupos, os quais foram imersos nas soluções: hipoclorito de sódio a 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0%, durante 30 minutos, e soluções de hipoclorito de cálcio a 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0% também durante 30 minutos. Os explantes foram inoculados em frascos cilíndricos com capacidade de 200 mL, contendo 30 mL de meio de cultivo MS sem reguladores de crescimento, acrescido de 3,0% de sacarose e gelificado com 0,8% de ágar. Em termos gerais, o hipoclorito de cálcio foi mais eficiente que o hipoclorito de sódio. Os melhores tratamentos desinfestantes foram 5,0 e 10,0% de hipoclorito de cálcio, os quais resultaram em 95 e 100% de desinfestação, respectivamente, mas não diferiram significativamente entre si. Porém, observou-se alto nível de necrose no tratamento com hipoclorito de cálcio a 10,0%. Assim, a solução desinfestante mais indicada para folhas de *C. verticillata* foi o hipoclorito de cálcio a 5,0%.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura de tecidos vegetais. Desinfestação. Hipoclorito de cálcio. Hipoclorito de sódio. *Cissus verticillata* (insulina vegetal).

ABSTRACT: *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis) is an Amazonian bush creeper perennial and strong, and it is often cultivated as medicinal and ornamental plant. In Northern Brazil is used in the treatment of some heart diseases and has lately been used in *diabetes mellitus* disease. This work had as objective to evaluate different treatments of surface sterilization of *C. verticillata* leaf explants aiming at its *in vitro* establishment. Leaves were cut into 1 cm² fragments, which were immersed in alcohol 70% (v/v) for 1 minute. Then, the explants were divided in eight groups, which were immersed in different solutions: sodium hypochlorite at 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% and calcium hypochlorite at 1.25, 2.5, 5.0 and 10.0% during 30 minutes. These explants were inoculated in 200 mL cylindrical bottles containing 30 mL of MS medium without growth regulators, supplemented with 3.0% sucrose and 0.8% agar. In general terms, calcium hypochlorite was more efficient than sodium hypochlorite. The best disinfectant treatments were 5.0 and 10.0%

¹ Dr, Biólogo, pesquisador, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, mauricio@cpafro.embrapa.br

² Dr^a, Agrônoma, pesquisadora, Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, mgraca@cpafro.embrapa.br

³ Estudante de Ciências Biológicas, Faculdade São Lucas, Bolsista do CNPq, Porto Velho, RO, josifelixrocha@yahoo.com.br

⁴ Mestranda do Curso de Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia - UNIR, Porto Velho, RO, sandramirleny@gmail.com

calcium hypochlorite, which resulted in 95 and 100% of disinfestation, respectively, but did not differ significantly from each other. However, it was observed high level of necrosis in the treatment with 10.0% calcium hypochlorite. Thus, the indicated disinfectant solution to *C. verticillata* leaves was 5.0% calcium hypochlorite.

KEY WORDS: Plant tissue culture. Disinfestation. Calcium hypochlorite. Sodium hypochlorite.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson&C.E.Jarvis, pertence a família Vitaceae, é uma trepadeira, conhecida como insulina vegetal ou cipó-pucá. É uma planta nativa da região Amazônica onde é muito cultivada em jardins e hortas domésticas para fins ornamentais e medicinais (LORENZI & MATOS, 2008) e é empregada como antiepiléptica e um alcalóide foi identificado como responsável por esse efeito. Recentemente foi detectada atividade fungitóxica em extratos de folhas da planta (SILVA *et al.*, 2007).

De suas folhas é feito o chá usado no tratamento de doenças do coração, taquicardia, hidropsia, tremores e para baixar a pressão arterial (OLIVEIRA, 2006). O chá das partes aéreas de *C. verticillata* é utilizado como antiinflamatório, antitérmico e antirreumático e vem sendo utilizada no tratamento de *diabetes mellitus*. Entretanto, estudos farmacológicos ainda não confirmaram o efeito antidiabético do chá da planta e nenhum princípio ativo foi identificado como responsável por esse efeito (SILVA *et al.*, 2007). Do extrato etanólico das folhas e do caule foi determinado atividade antimicrobiana sobre o *Bacillus subtilis* (DORO *et al.*, 1997).

Cultura de células e tecidos vegetais vem sendo utilizadas como opções ao uso da planta íntegra para o estudo e a produção de diversos metabólitos secundários. Moléculas liberadas de microorganismos ou da própria planta, ou ainda, substâncias de natureza abiótica, todas conhecidas como eliciadores, são utilizadas para induzir rotas de biossíntese de metabólitos secundários em suspensões celulares, visando elucidar sua composição, distribuição e acúmulo (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Atualmente a suspensão celular é, também, empregada em trabalhos com biorreatores visando à produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial (CID, 1998).

A maior dificuldade para o estabelecimento *in vitro* está em se obter material descontaminado sem causar prejuízo aos tecidos. E como os explantes geralmente

são retirados de plantas mantidas em casa de vegetação ou do campo, o estabelecimento *in vitro* é muito importante que se encontre um método eficiente de desinfestação tanto da planta matriz quanto do explante. Dessa forma, para cada caso, o tipo de substância usada na desinfestação bem como a concentração e o tempo de exposição ao agente desinfestante devem ser anteriormente testados, de forma a melhor adequá-los à espécie em estudo, levando em consideração a sensibilidade do tecido a ser descontaminado (DINIZ *et al.*, 2008). Hipoclorito de cálcio e de sódio são os compostos a base de cloro mais empregados na desinfestação de explantes em concentrações que variam de 0,5 a 2% de cloro ativo (ANDRADE *et al.*, 2002).

Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes tratamentos de desinfestação de explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson&C.E.Jarvis para o seu estabelecimento *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas lâminas foliares de plantas da espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson&C.E.Jarvis mantidas no Campo Experimental da Embrapa Rondônia. Os materiais foram conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, onde passaram por uma pré-limpeza, que consistiu da lavagem das folhas com esponja, água destilada com algumas gotas de detergente comercial. Em seguida, foram seccionados em segmentos com área aproximada de 1cm² e imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto. Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram retirados do álcool e imersos em oito tratamentos diferenciados: soluções de hipoclorito de sódio a 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0%, durante 30 minutos, e soluções de hipoclorito de cálcio a 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0% também durante 30 minutos sendo, em seguida, lavado 3 vezes com água bidestilada estéril. Os explantes foram inoculados em frascos cilíndricos com capacidade de 200 mL, contendo 30 mL de meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) sem reguladores de crescimento, acrescido de 3,0% de sacarose e gelificado com 0,8% de ágar e com a face adaxial em contato com o meio. Foram utilizadas vinte repetições por tratamento, sendo cada uma composta por um frasco contendo cinco explantes. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 8 horas, a 28°C, durante 10 dias, sendo avaliado o número de explantes contaminados ao final desse período. Os dados foram

submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

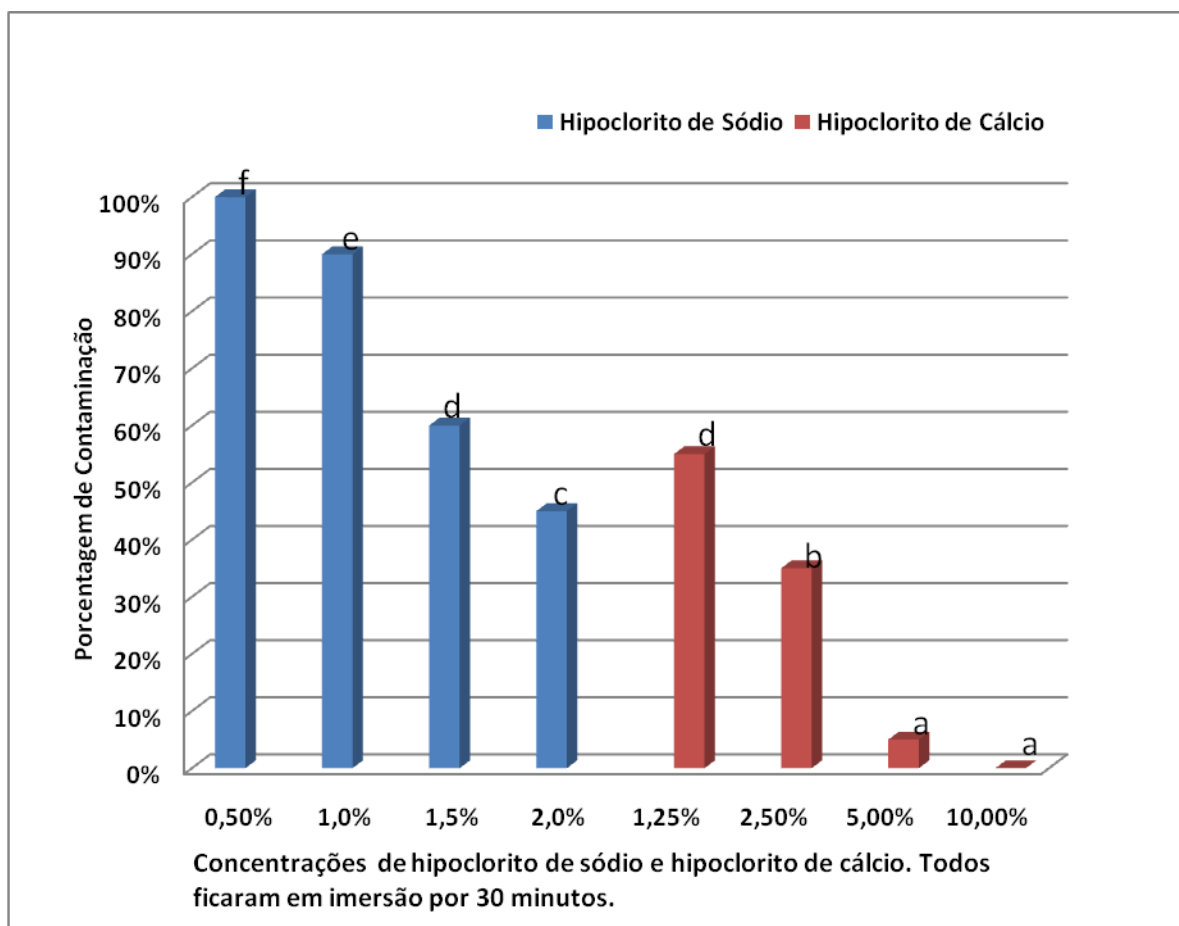


Figura 1. Porcentagens de contaminação de explantes foliares de *C. verticillata* em relação a diferentes soluções desinfestantes, 10 dias após inoculação.

Correlacionando os resultados apresentados na Figura 1, observa-se que o tratamento utilizando hipoclorito de sódio a 0,5% não teve efeito algum, uma vez que a contaminação dos explantes foi de 100%. Entretanto, Donini *et al.* (2005) obteve uma descontaminação de 100% com este mesmo tratamento em lâminas foliares de *S. wallisii* e *Syngonium*, espécies ornamentais da família das aráceas e na concentração de 1,5% de hipoclorito de sódio houve uma descontaminação de 100% de oito espécies (*Dieffenbachia* sp., *Monstera deliciosa*, *P. undulatum*, *S. pictus*, *S. podophyllum*, *Syngonium* sp., *Z. eliotiana* (v 1) e *Z. eliotiana* (v 2)), o que não ocorreu nesse experimento, onde o nível de contaminação nessa concentração

foi de 60% . Ferreira *et al.* (2009) atingiu um percentual de menos de 10% de contaminação com explantes florais de cupuaçuzeiro, utilizando a concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio por 30 minutos.

Em relação ao hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos Karasawa *et al.* (2006) observou que foi eficiente para a descontaminação de lâminas foliares de *Pennisetum purpureum* Schum., enquanto que, no presente trabalho, evidenciou-se que este tratamento resultou em contaminação de 90% dos explantes apesar de ter sido utilizado por 30 minutos.

Guerra *et al.* (1999) trabalhando com plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr., tiveram êxito com o hipoclorito de sódio a 2,0%. Figueiredo (2003) utilizou este mesmo tratamento em sementes de *Acanthostachys strobilacea* (Schultes f.) Klotzsch e também obteve excelentes resultados, diferente deste experimento que obteve um percentual de 45% de contaminação dos explantes.

Chaves *et al.* (2004), realizou desinfestação em ramos de porta-enxerto Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e de cálcio a 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2% e constatou que o hipoclorito de sódio é mais eficiente do que o hipoclorito de cálcio em todas as concentrações. Diniz *et al.* (2008) também realizou este experimento comparativo na concentração de 2% em segmentos de rizomas de *S. wallisii* e obteve resultados semelhantes. Já Garcia *et al.* (2008) realizou o mesmo experimento em *Eugenia pyriformis* Cambess. com a concentração de 2,5% em três tempos diferentes e também constatou que o hipoclorito de sódio é mais eficiente e apresenta menor oxidação. Contudo, Almeida *et al.* (2010), obteve resultados contrários a estes, testando em explantes de *Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea, a concentração de 2,5% de hipoclorito de sódio e cálcio, obtendo os melhores resultados com o hipoclorito de cálcio.

Schiavinato *et al.* (2008) testou a concentração de 2,5% de hipoclorito de cálcio em explantes foliares e radiculares de *Anthurium plowmannii* Croat. e obteve uma variação de 0 a 25% de contaminação de explantes mantidos em ambientes diferenciados (câmara clara e escura). Enquanto que no trabalho em questão, os índices de contaminação foram de 35%.

No presente experimento, os resultados dos tratamentos que utilizaram hipoclorito de cálcio a 5,0 e 10,0% não diferiram significativamente entre si. Considerando-se o alto nível de necrose observado no tratamento com 10,0% do

desinfestante, observa-se que o tratamento mais eficiente para a descontaminação de explantes foliares de *C. verticillata* é o hipoclorito de cálcio a 5,0%.

Rocha *et al.* (2007) obteve resultados satisfatórios utilizando as concentrações 5,0 e 10,0% de hipoclorito de cálcio em explantes de bananeira 'prata anã (ABB)'. Resultados similares foram observados por Cordeiro (1999) ao utilizar como desinfestante o hipoclorito de cálcio 5% em explantes foliares de *Coffea canephora* e *C. arábica* e Heloir *et al.* (1997) em gemas axilares de videira *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir. Já Borelli *et al.* (1990) teve altos índices de contaminação utilizando o hipoclorito de cálcio nas concentrações 1, 2, 4 e 6% em esporos *in vivo* e *in vitro* de pteridófitas (*Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook e *Cyanthea schanshin* Mart.). O tratamento mais eficiente foi o desinfestante a 2%.

Ferrador e Marques (2005) obtiveram uma porcentagem de 30% de necrose ao utilizar o hipoclorito de cálcio a 10% em explantes *Castanea sativa* Mill.

4. CONCLUSÃO

Com base nesses resultados, concluiu-se que o melhor tratamento para a desinfestação de *C. verticillata* é o hipoclorito de cálcio a 5,0% por 30 minutos.

Trabalhos como este possibilitam uma ampliação no conhecimento referente à desinfestação de explantes foliares em plantas medicinais, uma fase fundamental nas técnicas *in vitro*, visando posteriormente o estabelecimento de suspensões celulares para a produção de princípios ativos em biorreatores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; OLIVEIRA, A. B.; HERNANDEZ, F. F. F. **Propagação *in vitro* de mussaenda (*Mussaenda erythrophylla* cv. *Rosea*)**. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, vol. 40, n. 2, pág. 206-212, 2010.

ANDRADE, S. R. M.; PINTO, A. C. Q.; SILVA, H. D.; CORDEIRO, M. C. R.; RAMOS, V. H. V.; TEIXEIRA, J. B. **Avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de manga (*Mangifera indica* L.)** Planaltina: Embrapa Cerrados. Folder. 2002.

BORELLI, F. P.; CASTRO, C. E. F.; MATTHES L. A. F.; TOMBOLATO, A. F. C.; NAGA, V. **Propagação de pteridófitas in vitro e in vivo através de esporos.** Bragantia, vol. 49, n. 2, pág. 205-219, 1990.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J. **Desinfestação de explantes de prunus cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio.** R. bras. Agrociência, vol.10, n. 2, pág. 249-250, 2004.

CID, L. P. B.; De Suspensão Celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Vol. 1, pág. 331. Embrapa-SPI. Brasília. 1998.

CORDEIRO, A. T. **Embriogenese somatica e fusão interespecífica de protoplastos em Coffea.** 1999. 126p.Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

DONINI, L. P.; MOURA, I. F.; GUISSO, A. P.; SOUZA, J. A.; VIÉGAS, J. **Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, vol.72, n.4, pág. 517-522, 2005.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. **Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento in vitro de Spathiphyllum wallisi.** Rev. Ciên. Agron., Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 107-113, 2008.

9. DORO, D. L.; PESSINI, G. L.; CAMPOS, E. J. V.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, L. E. R.; CORTEZ, D. A. G. **Estudo fitoquímico e avaliação antimicrobiana do Cissus sicyoides L. (Vitaceae).** Arq. Ciênc. Saúde Unipara. Pág. 1, 1997.

FERRADOR, S.; MARQUES, G. **Contaminações Endógenas na Micropropagação de Castanea sativa Mill.** Centro de Estudos em Gestão de Ecossistemas - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Indústrias Alimentares. ESAC – Escola Superior Agrária de Coimbra, 2005.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. **Propagação in vitro de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais.** SABER CIENTÍFICO, Porto Velho, vol. 2 pág. 37-44, 2009.

FIGUEIREDO, M. L. **Desenvolvimento de protocolos para propagação in vitro de tres espécies de bromeliaceae nativas do brasil.** 2003. 68p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

GARCIA, M. M.; FIGUEIREDO, G. S.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. **Estabelecimento in vitro de uvaia: tempo de desinfestação, desinfestante e meio de cultura.** In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17. e 10., 2008, Pelotas. **Anais.** Pelotas: FAEM/UFPEL, Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia. 2008.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. **Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação de abacaxizeiro**. Pesq. Agropec. Bras., vol. 34, n.9, pág. 1557-1563, 1999.

HELOIR, M. C.; FOURNIOUX, L.; OZIOL, L.; BESSIS, R. **An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* L. Pinot noir) using auxiliary-bud microcuttings**. Plant Cell, Tissue Organ Culture, vol. 49, pág. 223-225, 1997.

KARASAWA, M. M. G.; PINTO, J. C.; PEREIRA, A. V.; PINTO, J. E. B. P. **Avaliação da consistência do meio de cultura na Propagação *in vitro* de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.)**. Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, vol. 2, n. 1, pág. 29-34, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**. 2ª edição. Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, 829p., 2008.

OLIVEIRA, A. B. ***Cissus verticillata* (Vitaceae): informações etnofarmacológicas e anatomia dos órgãos vegetativos**. 2006. 75p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

OLIVEIRA, M. C.; SIMOES, K.; BRAGA, M. R. **Substâncias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (Rubiaceae)**. Revista Brasil. Bot., vol. 32, n. 3. Pág. 509-519. 2009.

ROCHA, H. S.; SILVA, C. R. R.; ARAUJO, A. G.; SILVA, A. B. **Propagação *in vitro* de bananeira ‘prata anã (aab)’: intensidades luminosas e concentrações de sacarose nas fases de multiplicação e enraizamento**. Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, vol.3, n.1, pág.10-16, 2007.

SCHIAVINATO, Y. O.; LUCON, T. N.; TOMBOLATO, A. F. C.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A. **MICROPROPAGACÃO DE *Anthurium plowmannii* Croat**. Plant Cell Cult. Micropropag., Lavras, vol.4, n.1, pág. 15-20, 2008.

SILVA, L.; CARREIRA, R.C.; ONIKI, G.H.; AGRIPINO, D.G.; YOUNG, M.C.M.; LADEIRA, A.M. **Crescimento e análise do potencial antifúngico em plantas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, vol. 9, n. 1, pág. 73-79. Botucatu. 2007