

# PROPAGAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *Cissus sicyoides*, UMA PLANTA MEDICINAL

Ilka Nacif de ABREU<sup>1</sup>, José Eduardo Brasil Pereira PINTO<sup>2</sup>, Suzan Kelly Vilela BERTOLUCCI<sup>2</sup>, Augusto Ramalho de MORAIS<sup>2</sup>, Clara GEROMEL<sup>2</sup>, Ângela LADEIRA<sup>1</sup>, Osmar Alves LAMEIRA<sup>3</sup>.

**RESUMO:** O estudo da propagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo. O objetivo do trabalho foi a propagação *in vivo* e *in vitro* (estabelecimento e multiplicação) de *Cissus sicyoides*. Plantas mantidas em casa de vegetação forneceram estacas com 10 e 20 cm de comprimento, as quais foram tratadas com 0, 80 ou 160 mg/l de AIB, com ou sem sacarose + ácido bórico, por duas horas. Para o estabelecimento *in vitro*, após desinfestação, segmentos nodais com 10 mm de comprimento foram inoculados em meio de cultura sólido (MS), com diferentes concentrações de cinetina, BAP e ANA. Para a multiplicação *in vitro*, segmentos nodais com 10 mm foram inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA, e ANA e cinetina. Na propagação *in vivo* as estacas com 10 cm de comprimento apresentaram maior eficiência no enraizamento quando tratadas com 160 mg/l de AIB. *In vitro* os explantes foram melhor estabelecidos e multiplicados em meio de cultura suplementado com cinetina e ANA, que proporcionaram maior indução de gemas, crescimento em altura e ausência de calos na base das plântulas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insulina vegetal, boro, enraizamento, micropropagação, regulador de crescimento.

## IN VIVO AND IN VITRO PROPAGATION OF *Cissus sicyoides*, A MEDICINAL PLANT

**ABSTRACT:** The study of the propagation of species used in common medicine has intensified in the last few years due to the increasing investment in research for the discovery of new pharmaceuticals and utilization of phytotherapy as an alternative. The objective of this study was *in vivo* and *in vitro* propagation (establishment and multiplication) of *Cissus sicyoides*. Greenhouse plants furnished 10 and 20 cm long cuttings which were placed for two hours in 0, 80 or 160 mg/l of IBA, with or without sucrose and boric acid. For the *in vitro* establishment, the nodal segments were sterilized, 10 mm sections were inoculated in a solid culture (MS), and supplemented with kinetin, ANA and BAP. For the multiplication *in vitro*, 10 mm nodal segments were inoculated in a solid culture (MS), supplemented

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Dept° de Fisiologia, 33010-150 Campinas, SP., Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras – UFLA, Dept° de Agricultura, Cx. P. 37, 37200-000 Lavras, MG., Brasil.

<sup>3</sup>EMBRAPA/CPATU, Cx. P. 48, 66095-100 Belém, PA, Brasil.

with the following interactions: BAP x ANA and ANA x kinetin. The 10 cm long cuttings presented good rooting when treated with 160 mg/l of AIB. *In vitro* the explants were established and multiplied better in a culture supplemented with 4.64  $\mu\text{M}$  of kinetin and 2.7  $\mu\text{M}$  of ANA, which promoted greater induction of buds, greater height and absence of callus formation at the base of plantlets.

**KEYWORDS:** Vegetable insulin, boron, rooting, micropropagation, growth regulator

## INTRODUÇÃO

*Cissus sicyoides* L.(Vitaceae), também conhecida como insulina vegetal, cipó-pucá e anil trepador, é uma trepadeira da América Tropical e encontrada na Região Amazônica. Esta espécie é usada popularmente no tratamento de diabetes, controle de estados epilépticos, sudorífico, hipotensor e no tratamento de doenças do coração (Albuquerque, 1989; Costa, 1990; Silva, 1995). Na sua composição há alcalóides, flavonóides (Moura, 1986; Albuquerque, 1989), esteróides, saponinas, mucilagens, compostos fenólicos (Silva, 1995), antocianinas (Toledo, 1983) e tem atividade farmacológica comprovada no tratamento de convulsão, doenças do coração (Elizabetsky, 1988; Moura, 1986; Costa, 1990) e controle de diabetes crônica (Pepato et al., 1998).

O estudo da propagação de espécies utilizadas na medicina popular tem sido intensificado nos últimos anos, devido ao crescente investimento em pesquisas para a descoberta de novos fármacos e da utilização da fitoterapia como um meio alternativo. Neste trabalho foi apresentada metodologia rápida e prática de propagação, *in vivo* e *in vitro*, de *Cissus sicyoides*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Enraizamento *in vivo* de estacas de *C. sicyoides*.**

Com a finalidade de avaliação do enraizamento *in vivo* de estacas de *Cissus sicyoides* foi conduzido um experimento em casa de vegetação, no Departamento de Agricultura, na Universidade Federal de Lavras (UFLA),MG, utilizando-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com cinco repetições, em que cada parcela foi constituída por quatro estacas, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 2x3x2, definidos pelas combinações dos fatores: comprimento da estaca (10 e 20 cm), soluções de AIB (0, 80 ou 160 mg/l) e sacarose + ácido bórico (ausência e presença).

As estacas foram coletadas da região mediana de plantas matrizes com um ano de idade, sendo que as estacas com 10 cm de comprimento tinham uma gema e as de 20cm duas gemas. Os dois tipos de estacas foram colocados, durante 2 horas, em solução de AIB (0; 80; 160 mg/l) acrescidas ou não com 20 g de sacarose + 150 mg/l de ácido bórico, exceto as estacas controle ( 0 ) que foram colocadas diretamente no substrato. O pH das soluções

foi ajustado para 5,8. Após a imersão nas soluções, as estacas foram colocadas em saco de polietileno, com capacidade para 500 ml, contendo areia lavada, mantidas sob sombrite, com redução de luz em 50% e irrigação uma vez ao dia.

Foram avaliados aos 45 dias após a instalação do experimento: o número, comprimento e peso da matéria seca de raízes.

### **Propagação *in vitro* de *C. sicyoides*.**

**a) Estabelecimento de *C. sicyoides in vitro*** - Para estabelecimento de *C. sicyoides in vitro* utilizou-se plantas com um ano de idade, mantidas em casa de vegetação, como fonte de explantes. Após retirados, os segmentos nodais foram submetidos às seguintes condições de assepsia: 30 minutos em água corrente, 30 segundos em álcool 70%, 20 minutos em 0,75% de hipoclorito de sódio. Em seguida, os explantes com 10 mm de comprimento foram lavados por seis vezes em água estéril, em câmara de fluxo laminar, e inoculados em meio de cultura sólido (0,7% de ágar) de Murashige e Skoog (MS), e suplementado com os tratamentos: 4,64 mM de cinetina; 4,44 mM de BAP; 4,64 mM de cinetina + 2,7 mM de ANA; 4,44 mM de BAP + 2,7 mM de ANA e o controle. O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e os explantes foram colocados em tubo de ensaio (25 x 150 mm) e incubados a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  num fotoperíodo de 16 horas luz, sob  $25 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de irradiância em sala de crescimento.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo usado 5 explantes por parcela. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial  $2 \times 2 + 1$ , sendo constituídos por fitoregulador (4,64 mM cinetina e 4,44 mM BAP) e ANA (ausência e presença) mais

um tratamento controle (testemunha).

Aos 60 dias após a instalação foram avaliados: número de gemas, altura (cm) das plântulas, número de raízes e presença de calos.

**b) Multiplicação de *C. sicyoides in vitro*** - Para multiplicação de *C. sicyoides in vitro*, procedeu-se à cultura nodal utilizando explantes com 10 mm de comprimento, obtidos a partir de plântulas estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura sólido MS (0,7% de ágar) e suplementado com os tratamentos: **1)** BAP 2,22 + ANA 2,7 mM; **2)** BAP 2,22 + ANA 5,4 mM; **3)** BAP 4,44 + ANA 2,7 mM; **4)** BAP 4,44 + ANA 5,4 mM; **5)** Cinetina 2,32 + ANA 2,7 mM; **6)** Cinetina 2,32 + ANA 5,4 mM; **7)** Cinetina 4,64 + ANA 2,7 mM; **8)** Cinetina 4,64 + ANA 5,4 mM. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e os explantes foram mantidos nas mesmas condições de ambiente utilizadas para o estabelecimento *in vitro*.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo que cada parcela continha 4 tubos.

Aos 60 dias após instalação avaliou-se: número de gemas, altura (cm) da plântula, número de raízes e presença de calos.

As análises de variância dos dados obtidos foram realizados de acordo com esquema adaptado de Pimentel Gomes (2000) para os experimentos fatoriais, e as comparações de médias dos tratamentos, foram feitas usando-se o teste de Tukey (5%) ou com o uso de contrastes ortogonais.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Enraizamento de estacas**

Analisando o ganho de matéria seca das raízes formadas a partir das estacas controle, observou-se que esta espécie é de fácil

enraizamento, pois ele ocorreu na ausência de qualquer fator indutor deste processo, para os dois tipos de estacas.

O uso do AIB foi significativo, propiciou maiores quantidade de matéria seca do que sem o seu uso (Tabela 1). Nas estacas de 20 cm as concentrações de 80 a 160mg/l proporcionaram matéria seca superiores aos da matéria seca de 0 mg/l, tanto na presença como na ausência de sacarose + ácido bórico. Nas estacas de 10 cm e com sacarose + ácido bórico não houve efeito significativo das concentrações de AIB, mas, na ausência de sacarose +ácido bórico, o uso de 160mg/l proporcionou maiores teores de matéria seca do que com 0 e 80mg/l.

Segundo Jarvis (1983), a adição de boro proporciona um maior desenvolvimento de raízes em estacas de feijão, quando adicionado após a aplicação de auxina, uma vez que este elemento é responsável pelo desenvolvimento dos primórdios radiculares e a auxina pela diferenciação das células para iniciar o enraizamento. Portanto, não houve efeito do ácido bórico e sacarose uma vez que a matéria seca das raízes não diferiram dos tratamentos controle para os dois tipos de estacas.

Kersten (1990), observou que a presença de boro diminui o teor de AIA livre em raízes de trigo e milho. O boro tem a função de aumentar a atividade da enzima AIA-oxidase, sendo esta enzima responsável pela degradação da principal auxina indutora do enraizamento (AIA) (Jarvis, 1983). Epstein & Lavee (1983) verificaram que, em estacas de videira e oliveira, o AIB era convertido em AIA durante o processo de enraizamento.

A propagação desta espécie a partir de estacas com 10cm é eficaz desde que seja acompanhado da adição de 160 mg/l de AIB, e estacas com 20cm adição a partir de 80mg/l pode ser usado. Em relação ao número e comprimento de raízes não houve diferença entre os tratamentos.

#### Propagação *in vitro*:

#### Estabelecimento:

O explante não apresentou problemas de oxidação ou contaminação, e apresentou um hábito de crescimento com dominância apical e não houve a presença de múltiplas brotações. As plântulas controle desenvolveram um siste-

**Tabela 1.** Matéria seca (g) de raízes de diferentes tamanhos de estacas de *Cissus sicyoides*, aos 45 dias, submetidas a diferentes concentrações de AIB, na presença ou não de sacarose e ácido bórico.

Tamanho de estacas (cm)		AIB (mg/l)				
		0	80	160	X	X
10	Sem sacarose e ac. bórico	0,14b	0,18b	0,24a	0,186A	0,183B
	Com sacarose e ac. bórico	0,17a	0,17a	0,20a	0,180A	
20	Sem sacarose e ac. bórico	0,22b	0,28a	0,29a	0,263A	0,256A
	Com sacarose e ac. bórico	0,20b	0,29a	0,26a	0,250A	

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ma radicular, fato que sugeriu elevada concentração endógena de auxina em relação as citocininas, nesta espécie. A Tabela 2 apresenta os valores dos contrastes usados para avaliar o efeito dos fitoreguladores cinetina e BAP associados ou não com ANA. Foi observado que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura influenciou de modo significativo nos resultados, uma vez que as médias obtidas no tratamento controle são inferiores às dos outros tratamentos, para altura, número de gemas e de raízes. Os fitoreguladores tiveram uma altura de 3,34cm, 1,3 gemas e 1,12 raízes a mais do que o controle. A cinetina apresentou 0,3cm de altura a menos que BAP e 0,6 gemas e 0,85 raízes a mais que o meio com BAP mas, estas diferenças foram não significativas. Na presença da cinetina o uso de ANA foi significativo em aumentar a altura e o número de raízes. Entretanto, na presença de BAP não houve efeito significativo de ANA. O tratamento que proporcionou um maior número de gemas (4,0), altura (6,5 cm) e número

grande desvantagem para o desenvolvimento das brotações, uma vez que o metabolismo do explante passa aproximadamente 50% do período necessário para o estabelecimento, gastando toda energia produzida na formação de calos, e só depois é que ocorre a formação e crescimento das brotações. Essa proliferação celular pode ter ocorrido em função de um desbalanço hormonal entre o conteúdo endógeno do explante e a concentração do regulador de crescimento no meio de cultura, como observado por Becker (1997), que utilizou a citocinina TDZ em *Phyllanthus niruri* e também observou a formação de calos em toda a base do explante.

### Multiplificação:

Quando os segmentos nodais foram transferidos para o meio de multiplicação, não houve uma regeneração de multiplobrotos, e sim um alongamento do segmento nodal.

Verificou-se que os tratamentos com as maiores concentrações de cinetina obtiveram

**Tabela 2.** Valores dos contrastes da altura média e número médio de gemas e raízes para comparação entre controle e fitoregulador, entre fitoreguladores e entre doses de ANA na presença de cinetina e de BAP, das plântulas de *Cissus sicyoides* estabelecidas aos 60 dias.

Contraste	Altura (cm)	Nº Gemas	Nº Raízes
Controle vs Fitoregulador	3,34*	1,3*	1,12*
Cinetina vs BAP	-0,30	0,6	0,85
ANA d. Cinetina	2,80*	0,8	3,3*
ANA d. BAP	0,60	-1,0	0,6

\*Significativo pelo teste F

de raízes (4,7) foi o que continha 4,64 mM de cinetina acrescido de 2,7 mM de ANA.

Com exceção dos explantes mantidos em meio de cultura sem a adição de regulador de crescimento, todos os demais apresentaram calos em todo o explante com aproximadamente 30 dias com posterior emissão de raiz e formação de brotos. Isso representa uma

as maiores médias no número de gemas (Tabela 3). Observou-se que os tratamentos que apresentaram as maiores médias no número de raízes foram aqueles que continham maior concentração de ANA associado a maior concentração de BAP (Tabela 3). Na presença de BAP ocorreu formação de uma massa celular ao redor do sistema radicular, enquanto

que na presença de cinetina não houve a mesma formação. Nota-se, que a menor concentração de BAP (2,22mM) proporcionou maior altura em relação a maior concentração; em relação a

1991).

O melhor desenvolvimento e crescimento das plântulas mantidas no meio de multiplicação, ocorreu no meio contendo

**Tabela 3.** Valores médios de altura, número de gemas e de raízes de plântulas de *Cissus sicyoides* aos 60 dias, em diferentes concentrações de BAP, ANA e cinetina.

Trat.	BAP(mM)	ANA(mM)	Altura (cm)	Nº Gema	Nº Raízes
1	2,22	2,7	10,4a	4,4a	6,0ab
2	2,22	5,4	8,3ab	3,8ab	7,1ab
3	4,44	2,7	4,0b	2,5b	2,5b
4	4,44	5,4	6,2ab	3,6ab	9,6a
	Cinetina	ANA			
5	2,32	2,7	7,2ab	4,0ab	4,0ab
6	2,32	5,4	7,8ab	4,1ab	7,0ab
7	4,64	2,7	7,9ab	4,8a	5,6ab
8	4,64	5,4	7,0ab	4,5a	4,8ab

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

cinetina, houve uma maior uniformidade na altura das plântulas (Tabela 3).

Durante o desenvolvimento de plântulas mantidas em meio de cultura contendo BAP, houve a ocorrência de vitrificação nas folhas. Segundo Ziv (1991), a vitrificação é um evento comum na cultura de tecidos, gerando anormalidades fisiológicas e morfológicas no tecido vegetal. Estas desordens, ocorrem principalmente nas folhas, afetando os dois principais processos: fotossíntese e trocas gasosas (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e vapor). Os fatores que geralmente provocam estas anormalidades são: elevada umidade, excesso de fatores nutricionais (mineral e carboidratos), elevados níveis de reguladores de crescimento e baixa intensidade de luz. As plantas quando estão vitrificadas apresentam um aspecto de hiperidricidade nos tecidos e não são aptas a serem aclimatadas. Tal ocorrência só foi verificada nos tratamentos com BAP, provavelmente por esta citocinina ser mais ativa do que a cinetina (Gray & Benton,

2,7mM de ANA + 4,64mM de cinetina, proporcionando aproximadamente uma taxa de multiplicação de 5 plântulas por segmento nodal e com 6 raízes por plântula, e com altura próxima de 8 cm além de não ocorrer nenhuma calogênese na base do segmento nodal.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FINEP - Projeto número 6496072400 - Biotecnologia em Plantas Medicinais e CNPq - Projeto 462293 - Cultivo *in vitro* e *in vivo* de Plantas Medicinais, pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Albuquerque, J.M.D. 1989. *Plantas medicinais de uso popular*. Programa de agricultura nos Trópicos, 6, ABEAS Brasília, 96p.
- Becker, L. 1997. *Propagação vegetativa in vivo e in vitro, indução de calos, nutrição,*

- extração e quantificação de alcalóides nas espécies Phyllanthus niruri L. e Phyllanthus corcovadensis Muell. Arg. (Quebra-Pedras)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 96p.
- Costa, C.M.M. 1990. Cipó-pucá (*Cissus sycioides*). Apostila do curso de especialização em medicamentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 109p.
- Elizabetsky, E. 1988. Ação anticonvulsivante de *Cissus sycioides*, cipó-pucá. *Ciência e Cultura*, 40 (Suplemento): 985 (resumo).
- Epstein, E.; Lavee, S. 1983. Conversion of AIB to AIA by cuttings of grapevine and olive. *Plant Physiology*, 72 (Supplement): 116.
- Gray, D.J.; Benton, C.M. 1991. *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27(1):7-14.
- Jarvis, B.C. 1983. Auxin and boron in relation to the rooting response and ageing of mung bean cuttings. *The New Phytologist*, 95:509-518.
- Kersten, E. 1990. *Efeito do boro, zinco e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de dois cultivares de ameixeira (Prunus salicina Lindl.)*. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 109p.
- Moura, B.A.S. 1986. Estudo químico e farmacológico de espécie vegetal *Cissus sycioides* Linn. Apostila do curso de especialização em química de produtos naturais Universidade do Pará, Belém, 98p.
- Pimentel Gomes, F. 2000. *Curso de estatística experimental*. 14 ed. Nobel Piracicaba, 467p.
- Pepato, M.T; Keller, E.H; Silva, M.P.M; Baviera, A.M. 1998. Efeito da administração crônica de *Cissus sycioides* no metabolismo de carboidratos. *In: Anais do Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais*. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais, Águas de Lindóia, SP, p.78.
- Silva, G.A. 1995. *Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluído de Cissus sycioides L.* Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 98p.
- Toledo, M.C.F. 1983. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sycioides*). *Journal Food Science*, 48:1368-1369.
- Ziv, M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In: Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) Micropropagation – Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, London, p.45-69.

**Submetido à publicação:** 16/12/1998.

**Aceito :** 09/11/2002.