

DESENVOLVIMENTO E ACLIMATAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *VALERIANA GLECHOMIFOLIA*

LUZ, D.I.¹; MAURMANN, N.¹; CARVALHO, C.M.B.²; RECH, S.B.³

¹ Bolsista de Iniciação Científica, ² Mestre em Ciências Farmacêuticas, ³ Docente do Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

TRABALHO PREMIADO COM O 2º LUGAR NO XXIV CAPEC, APRESENTADO PELA PRIMEIRA AUTORA

RESUMO: O interesse em *Valeriana spp.* nativas do sul do Brasil deve-se à possibilidade de obtenção de valepotriatos, que possuem atividade ansiolítica, a partir da propagação clonal de indivíduos selecionados. Nos experimentos de otimização da micropropagação, investigou-se o desenvolvimento *ex-vitro*, a aclimatação e a produção de valepotriatos de plântulas de *Valeriana glechomifolia* cultivadas em meio Murashige e Skoog com 30 g/L de sacarose suplementado com 1,0 mg/L de AIA ou isento de regulador de crescimento. Foram analisados os parâmetros morfológicos e a produção dos valepotriatos acevaltrato, valtrato e didrovaltrato, quantificados por CLAE. A adição da auxina AIA ao meio de cultura demonstrou ser adequada à aclimatação das plântulas e a manutenção da biossíntese de valepotriatos.

UNITERMOS: *Valeriana glechomifolia*, propagação clonal, cultivo *ex-vitro*, aclimatação, valepotriatos

ABSTRACT: *Development and acclimatization of Valeriana glechomifolia plantlets.* The interest on *Valeriana spp.* native to South Brasil is due to the possibility of valepotriates obtaintion, which have ansiolitic activity, from the clonal propagation of selected individuals. Performing experiments of optimization of the micropropagation, the *ex-vitro* development, the acclimatization and valepotriate production of *Valeriana glechomifolia* plantlets grown on Murashige & Skoog medium with 30 g/L sucrose supplemented with 1.0 mg/L of IAA or without growth regulators. Morphological aspects and the production of the valepotriates acevaltrate, valtrate e didrovaltrate, quantified by HPLC, were evaluated. The presence of IAA the culture medium showed suitable for plantlet acclimatization and maintenance of valepotriate biosynthesis.

KEYWORDS: *Valeriana glechomifolia*, clonal propagation, *ex-vitro* culture, acclimatization, valepotriates

INTRODUÇÃO

Raízes e rizomas de *Valeriana sp* são utilizados como matéria-prima na produção de fitoterápicos sedativos e ansiolíticos, sendo que estudos da propagação clonal vêm sendo desenvolvidos para a obtenção de indivíduos em larga escala (MATHUR *et al.*, 1988; ENCISO-RODRIGUES, 1997; KAUR *et al.*, 1999).

O cultivo *in vitro* pode resultar na multiplicação eficiente com a obtenção de plantas com uniformidade genética (ROUT *et al.*, 2000). Entretanto, uma das fases mais críticas na micropropagação de espécies vegetais é a transição do meio heterotrófico para o autotrófico (KADLEÇEK *et al.*, 2001). A taxa de sobrevivência, obtida em plantas aclimatizadas *ex-*

vitro, depende do correto tratamento durante o processo da transição *in vitro* para *in vivo*.

Espécies da família Valerianaceae são encontradas nas matas da região Sul do Brasil (SAMPAIO *et al.*, 1993; SOBRAL, 1999), inclusive *Valeriana glechomifolia* Meyer, que apresenta valepotriatos, citados como as substâncias farmacologicamente ativas, comuns às espécies de *Valeriana*, e um valepotriato apenas descrito em *Phyllactis pulvinata* (SALLES *et al.*, 2000). A vantagem dessa espécie e de outras espécies analisadas por SILVA *et al.* (2002) reside no fato dos compostos ativos supracitados estarem presentes predominantemente nas partes aéreas, ao contrário das espécies utilizadas na

terapêutica, que os apresentam nas partes subterrâneas (HOBBS, 1989; HOUGHTON, 1999).

A propagação vegetativa *in vitro* de *V. glechomifolia* foi estabelecida por SALLES *et al.* (2002), e, em experimentos de otimização do cultivo *in vitro* da espécie, CARVALHO (2003) observou que o tipo e a concentração de auxina no meio de cultivo influenciam a rizogênese e a produção de valepotriatos, sendo que a auxina ácido indolacético (AIA) na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ mostrou-se mais adequada para a manutenção do acúmulo de valepotriatos.

O objetivo do presente trabalho foi de proceder a aclimação de plântulas de *V. glechomifolia* e avaliar a sobrevivência das mesmas em casa de vegetação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microestacas de plântulas de *V. glechomifolia* micropropagadas, de aproximadamente 1,0 cm, com 3 a 6 folhas e peso médio de 30 mg, desenvolvidas segundo SALLES *et al.* (2002) em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sem adição de reguladores de crescimento, foram utilizadas como material vegetal.

O experimento foi conduzido em meio MS sem reguladores de crescimento e com concentração constante de 1,0 mg.L⁻¹ AIA. As plântulas foram mantidas em frascos de 175 mL, com 25 mL de meio semi-sólido de cultura, a 25 °C e com fotoperíodo de 16 horas (45 µmol.m⁻².s⁻¹). Após 3 meses de cultivo *in vitro* as plântulas foram retiradas do ágar, lavadas com água destilada, avaliados o peso fresco, o diâmetro das partes aéreas e o comprimento das raízes de cada amostra e transplantadas para substratos de vermiculita expandida (Plant Max, Eucatex) e solo não fertilizado misturados na proporção de 2:1 (solo:vermiculita). As plantas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura variando de 18 a 25 °C, e intensidade luminosa de 70 µmol.m⁻².s⁻¹, durante 45 dias. Foram utilizados quinze explantes para cada tratamento. Ao final do experimento, foi avaliado o percentual de sobrevivência, o teor de valepotriatos das plantas nos dois tratamentos, sendo as mesmas, após, transferidas para casa de vegetação.

A quantificação foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos secos clorofórmicos retomados em metanol, utilizando a metodologia proposta e validada por SILVA (2001) nas seguintes condições: fase estacionária: coluna Nova Pack C₁₈ - Waters 4µm (3,9 x 150 mm), pré-coluna Nova Pack C₁₈ - Waters 60 A 4µm (3,9 x 20 mm); fase móvel: acetonitrila:água (50:50); comprimento de onda: 208 nm (monoênico) e 254 nm (diênicos); volume de Injeção: 20 µL; fluxo: 1 mL/min. Valtrato, acevaltrato e diidrovaltrato foram utilizados como padrões externos conforme descrito por SALLES *et al.* (2000).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

O processo de aclimação de *Valeriana glechomifolia* foi desenvolvido a partir de multiplicação de microestacas cultivadas em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento e com a adição de AIA na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. Após 3 meses de cultivo *in vitro*, foram determinados na transferência para o solo, os parâmetros: peso fresco, diâmetro das partes aéreas e comprimento médio das raízes de 15 explantes. A Figura 1 demonstra que os parâmetros analisados para as plântulas submetidas a AIA não diferiram estatisticamente do tratamento controle.

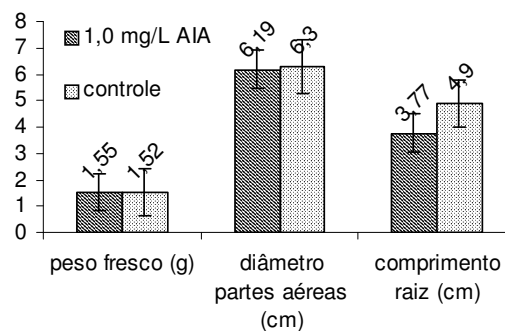


Figura 1. Representação gráfica dos parâmetros peso fresco, diâmetro das partes aéreas e comprimento da raiz anteriores à transferência para o solo de plântulas de *V. glechomifolia* submetidas à aclimação cultivadas em meio MS suplementado com 1,0 mg/L de AIA e sem adição de reguladores de crescimento (tratamento controle)

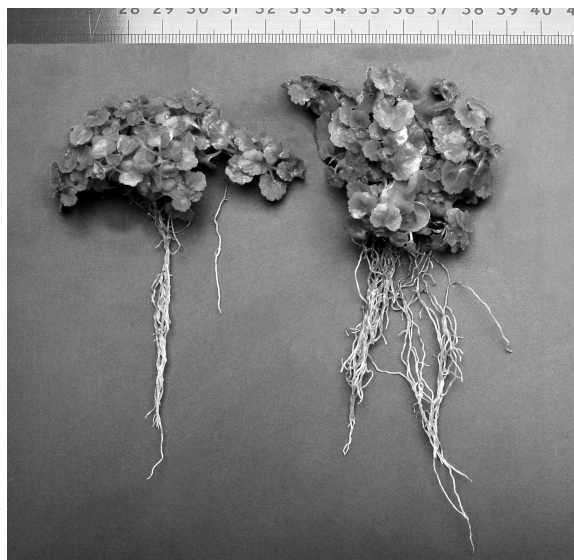


Figura 2. Aspecto morfológico de *V. glechomifolia* após 45 dias de cultivo *ex-vitro*. Planta à esquerda, tratamento controle. Planta à direita, tratamento com 1,0 mg/L de AIA

Após 45 dias do transplante para o solo, as plântulas desenvolveram-se perfeitamente, adaptando-se ao ambiente *ex-vitro*, com 100 % de sobrevivência (Figura 2). A análise dos teores de valepotriatos das partes aéreas das plantas demonstra a manutenção da tendência, observada por CARVALHO (2003), de teores de valepotriatos superiores para os extratos das plântulas submetidas ao experimento com a auxina AIA, em relação às plântulas do experimento controle (Tabela 1). Os teores de valepotriatos determinados após a aclimação são indicativos da manutenção da biossíntese de valepotriatos, apesar do estresse causado pela transferência das plantas para um ambiente não estéril e com menor umidade.

Os resultados obtidos indicam que com a metodologia descrita para a aclimação de *Valeriana glechomifolia* possibilitará o estabelecimento de um protocolo comercial de micropropagação da espécie, uma vez que a etapa crítica de crescimento no solo após o desenvolvimento *in vitro* foi otimizada.

TABELA 1. Teor de valepotriatos de plântulas aclimatadas de *V. glechomifolia*, após 45 dias de cultivo *ex-vitro*

Tratamento	acevaltrato (g%)	diidrovaltrato (g%)	valtrato (g%)
Controle	0,29	0,01	1,29
1 mg/L AIA	0,38	0,06	1,71

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, C.M.B. **Otimização da micropropagação e estabelecimento de culturas de raízes de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Dissertação de Mestrado, 2003.
- ENCISO-RODRÍGUEZ, R. Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. **Planta Medica**, v.63, p. 274-275, 1997.
- HOBBS, C. Valerian. **Herbalgram**, v. 21, p. 19-34, 1989.
- HOUGHTON, P.J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 505-512, 1999.
- KADLEÇEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; ČAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. **Plant Science**, v. 161, p. 695-701, 2001.
- KAUR, R.; SOOD, M.; CHANDER, S.; MAHAJAN, R.; KUMAR, V.; SHAMA, D.R. *In vitro* propagation of *Valeriana jatamansi*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 227-229, 1999.
- MATHUR, J.; AHUJA, P.S.; MATHUR, A.; KUKREJA, A.K.; SHAN, N. *In vitro* propagation of *Valeriana wallicii*. **Planta Medica**, v. 55, p. 82-83, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v.15, p. 473-497, 1962.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.
- SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; RECH, S.B.; ZANATTA, N.; POSER, G.L.V. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 907-910, 2000.
- SALLES, L.A.; SILVA, A.L.; FETT-NETO, A.G.; POSER, G.L.V.; RECH, S.B. *Valeriana glechomifolia*: *in vitro* propagation and production of valepotriates. **Plant Science**, v. 163, p. 165-168, 2002.
- SAMPAIO, M.I.R.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C. Valerianaceae: etnofarmacologia, farmacologia e química. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 54-56, 1993.
- SILVA, A.L.; RECH, S.B.; POSER, G.L.V. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to south Brazil. **Planta Medica**, v. 68, p. 570-572, 2002.

SOBRAL, M. Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul: Valerianaceae. **Boletim do Instituto de Biociências da UFRGS** (Porto Alegre), n. 58, 1999.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. San Francisco: W.H. Freeman, 1981. 859 p.

Endereço para correspondência:

Prof^a. Dr. Sandra Beatriz Rech
Faculdade de Farmácia/UFRGS
Av. Ipiranga, 2752
90610-000 Porto Alegre, RS
e-mail: sandrar@farmacia.ufrgs.br

Recebido em 28.11.2003.

Aceito em 28.11.2003.

Revisto em 18.12.2003.