

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Jornada de Pesquisa

ESTABELECIMENTO IN VITRO DE SEGMENTOS COTILEDONARES DE TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS A. DC.¹

**Marcelo Vielmo Afonso², Aline Soares Pereira³, Athos Odin Severo Dorneles⁴, Marina
Pissatto⁵, Luciane Almeri Tabaldí⁶, Juçara Terezinha Paranhos⁷.**

¹ Projeto de pesquisa realizado no mestrado em Agrobiologia da UFSM.

² Biólogo, MSc em Agrobiologia, Instituto Federal Farroupilha, Campus Panambi, Rua Erechim, 860, Bairro Planalto, CEP 98280-000, Panambi (RS), Brasil. marcelovielmo@yahoo.com.br

³ Bióloga, Mestranda em Agrobiologia, UFSM.

⁴ Msc em Agrobiologia, Doutorando em Fisiologia Vegetal, UFPEL.

⁵ Engenheira Florestal, MSc em Agrobiologia, UFSM.

⁶ Prof^a Dra do Departamento de Biologia, UFSM.

⁷ Prof^a Dra do Departamento de Biologia, UFSM.

INTRODUÇÃO

Tabernaemontana catharinensis A. DC. (Apocynaceae) é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, sendo também encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (PEREIRA et al., 2008). Planta pioneira medindo de 3 a 8 m de altura, popularmente conhecida como cobrina, jasmim-cata-vento, leiteira de dois irmãos e casca de cobra (QUINET; ANDREATA, 2005). O chá ou a infusão das folhas e cascas são utilizados na medicina popular como antídoto para picadas de cobra, para aliviar dor de dente, tratamento de feridas, herpes, tumores e ainda como hemostática, hipotensora, cardiotônica e também como vermífugo (PEREIRA et al., 2005).

A espécie é rica em flavonoides, saponinas, terpenos, alcaloides e esteroides (CHI et al., 2005) sendo que os alcaloides e terpenos são classes fitoquímicas particularmente importantes quando se considera a atividade inseticida de compostos naturais (FERREIRA et al., 2001). Estudos fitoquímicos da espécie demonstraram que os ramos possuem atividade antioxidante maior do que os frutos, revelando além da rutina, um glicosídeo de quercetina e ácido clorogênico, ambos reconhecidos como ativos antioxidantes (PIANA et al., 2014). A espécie possui também um imenso potencial ornamental, sendo indicada para reflorestamentos mistos destinados à recuperação de mata nativa (SOBRAL et al., 2006).

Dada a importância da espécie, a busca por mecanismos para obtenção de plântulas com alta qualidade genética e fitossanitária são imprescindíveis e constituem o ponto de partida para o estabelecimento de povoamentos comerciais produtivos e na conservação e estocagem de germoplasma. Sendo a multiplicação in vitro uma excelente alternativa a ser empregada para manutenção e produção de um grande número de plantas, especialmente espécies consideradas em perigo ou em extinção. Essas espécies podem se tornar disponíveis em proporções comerciais e assim será possível reduzir danos da extração não controlada em seu habitat (GALDIANO JÚNIOR et al., 2012).

A micropropagação destaca-se na área florestal e de espécies com potencial medicinal pela ampla possibilidade de aplicação e por servir de base para outras técnicas biotecnológicas (XAVIER et al., 2009). Contudo, resultados da micropropagação de *T. catharinensis* ainda são

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

incipientes, não se disporo de protocolos que possibilitem a obtenção de plantas assépticas e com alta taxa de multiplicação.

Desse modo, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da 6-benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido naftalenoacético (ANA) na regeneração *in vitro* de segmentos cotiledonares de *T. catharinensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Em câmara de fluxo laminar, segmentos cotiledonares de 1 cm de plântulas obtidas de germinação *in vitro*, com 70 dias de idade, foram inoculados em meio de cultura contendo 100% dos sais minerais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona, fungicida Maxim® 2,5 µl L⁻¹ e bactericida Chlortetracycline 0,15 mg L⁻¹. Ao meio foram acrescidas combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 mg L⁻¹), respectivamente, totalizando cinco tratamentos. Sendo o pH do meio de cultura ajustado para 5,8 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N, e posterior semi-solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar e autoclavado a 1 atm, 120 °C por 20 min.

Os tubos após a inoculação foram fechados com papel alumínio e as culturas foram transferidas para sala de crescimento com temperatura de 25 ±1 °C e fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo de fótons de 35 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, quatro repetições por tratamento e sete explantes por repetição, totalizando 28 explantes por tratamento. Após 45 dias da inoculação as avaliações foram realizadas, obtendo-se a percentagem de regeneração de brotos, número de brotações e folhas. Por meio de três amostras de cada repetição foram avaliados comprimento médio do maior broto com auxílio de paquímetro digital em milímetros (mm) e massa fresca das brotações, em balança analítica de precisão em miligramas (mg).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis dos três experimentos comparadas pelo teste Scott-knott, a 5% de probabilidade de erro, utilizando o aplicativo Sisvar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições do experimento (concentrações de BAP e ANA no meio de cultivo), segmentos cotiledonares não formaram plantas completas, apenas brotações aéreas. Os resultados mostram que a organogênese direta de brotações adventícias em explantes cotiledonares de *coibrina* pode ser induzida sem a necessidade de fitorreguladores de crescimento (Figura 1).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Jornada de Pesquisa

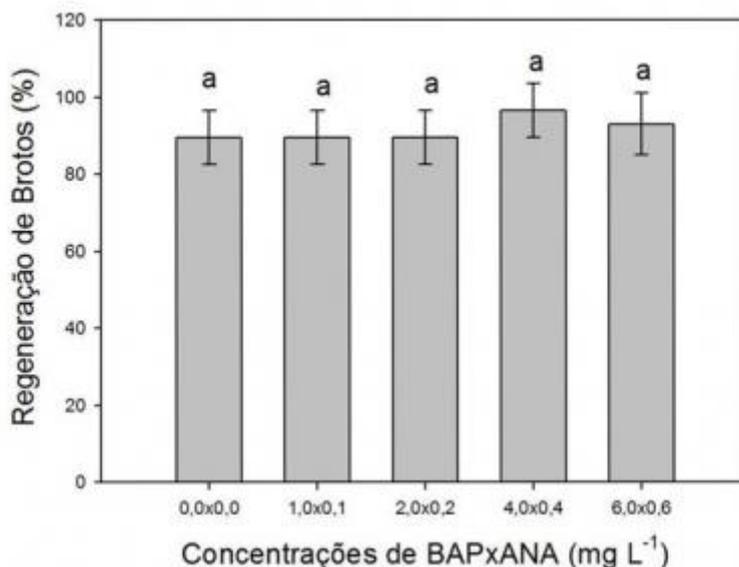


Figura 1-Percentagem de regeneração de brotos de segmentos cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis*.
*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O processo de morfogênese é controlado pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas. Este balanço hormonal é muito peculiar e é influenciado por vários fatores, como espécie, tipo e idade do explante, níveis endógenos de hormônios vegetais e o meio de cultura (SILVA et al., 2012). Oliveira et al. (2003) observaram na multiplicação in vitro de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* que o meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu a produção de novas brotações adventícias em 83% dos segmentos cotiledonares.

Na ausência de fitoreguladores vegetais foi verificado também a formação de brotos em segmentos nodais e cotiledonares de *Tapirira guianensis* Aubl. (GUTIÉRREZ et al., 2013) e *Aniba rosaeodora* Ducke (JARDIM et al., 2010). Essa maior capacidade morfogenética de alguns tecidos pode ser causada pela variabilidade genética de cada espécie (GEORGE; DEBERGH, 2008).

O número de brotos e folhas, comprimento de brotações e a massa fresca das brotações podem ser maximizados com a adição de BAP associada ao ANA no meio de cultura (Figuras 2 e 3); porém, altas concentrações não afetaram significativamente as referidas variáveis para explante cotiledonar, concentrações a partir de 2,0 x 0,2 mg L⁻¹ (BAPxANA) promoveram maior número de brotos por explante (Figura 2A). O aumento das concentrações de BAP e ANA no meio MS promoveu o aumento do comprimento médio da maior brotação de explantes cotiledonares, atingindo um máximo de 14,81 mm na concentração de 6,0 x 0,6 mg L⁻¹ (BAPxANA) (Figura 2B).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Jornada de Pesquisa

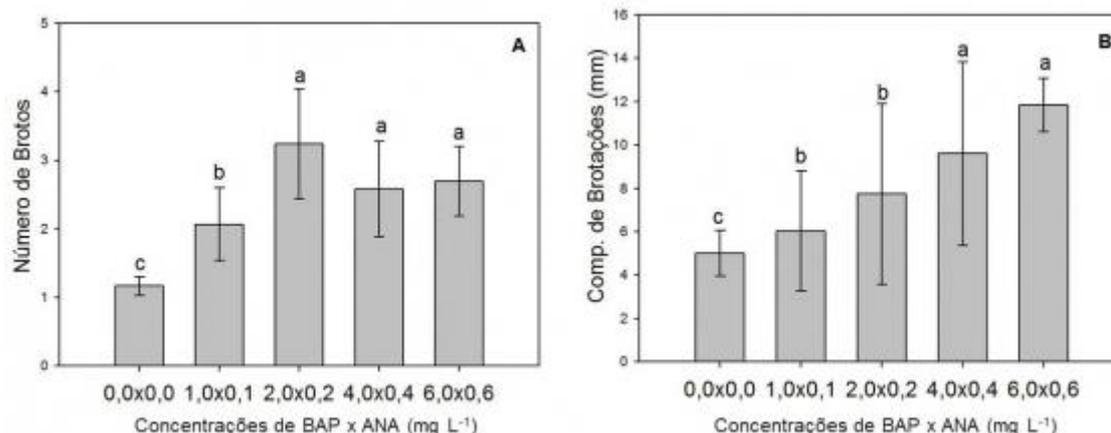
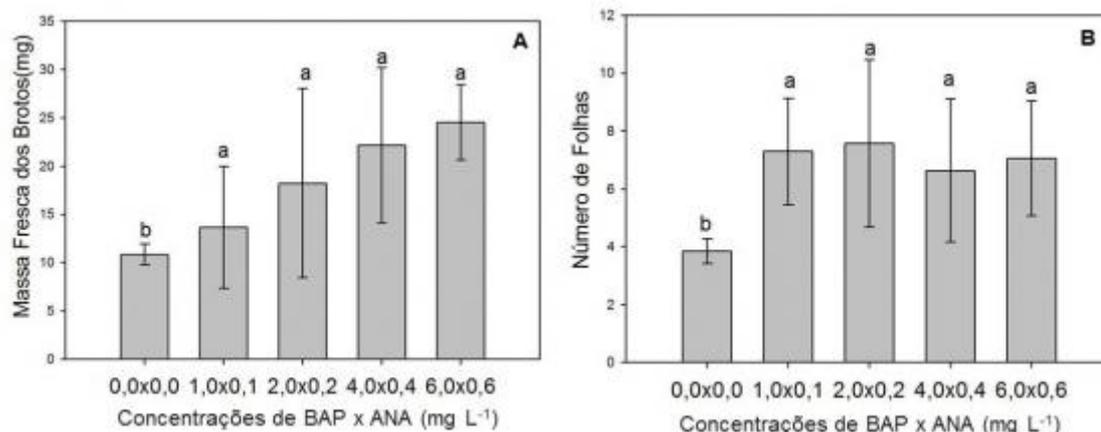


Figura 2-Valores médios do número de brotos e comprimento de brotações de explantes cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC aos 45 dias após a inoculação. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas das brotações até determinada concentração, a partir da qual pode ocorrer diminuição em virtude de possível efeito fitotóxico (REIS et al., 2008). O efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações pode estar relacionado à influência desse regulador na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares, até então inibidas pela dominância apical (MONFORT et al., 2012).

Macêdo et al. (2003) relataram que concentrações menores de BAP e ANA facilitam a individualização dos brotos e apresentam bons resultados para número de brotos, corroborando, com os resultados encontrados no presente trabalho, onde a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP associada a 0,2 mg L⁻¹ de ANA tendeu a promover maior número de brotos (3,23). As citocininas podem favorecer o alongamento de brotos; contudo, é necessário que se adicione ao meio a concentração adequada, sendo esta específica para cada espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para as variáveis massa fresca dos brotos e número de folhas não foi demonstrando diferença significativa entre os tratamentos com presença dos fitorreguladores BAP e ANA no meio (Figura 3).



Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

Figura 3-Valores médios da massa fresca dos brotos e número de folhas de explantes cotiledonares de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC aos 45 dias após a inoculação. *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O incremento no número de folhas na etapa de multiplicação é bastante favorável, pois cada folha dará origem a um novo broto e conseqüentemente aumentará a produção de novas mudas (COSTA et al., 2010), além de auxiliar na fase de aclimatização (MOREIRA et al., 2006); segmentos com maior número de folhas poderão ter maior índice de sobrevivência, pois as folhas são as estruturas responsáveis pela captação de energia solar e produção de matéria orgânica através da fotossíntese, auxiliando no processo de aclimatização na qual a planta passará de uma fase heterotrófica para autotrófica. Decréscimo no número de folhas em resposta ao aumento de concentrações de BAP associada ao ANA, observados em relação às concentrações menores, pode ser atribuído ao fato de o regulador de crescimento BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas (VILLA et al., 2005).

Para todas as variáveis analisadas na multiplicação *in vitro* de plantas de cobraína pode ter ocorrido sinergismo dos fitorreguladores de crescimentos testados. Essa interação pode atuar sinérgica ou antagonicamente, uma vez que a presença de um determinado fitorregulador pode afetar a biossíntese ou metabolismo de outro, alterando os níveis das substâncias endógenas, ou ainda, fatores ambientais inerentes ao processo podem modificar as respostas dos fitorreguladores ou, até mesmo, inativá-los (GUTIÉRREZ et al. 2013).

CONCLUSÕES

A organogênese direta de brotações adventícias em explantes cotiledonares de *T. catharinensis* ocorreu sem a necessidade dos fitorreguladores de crescimento BAP e ANA. O número de brotos e folhas, bem como a massa fresca das brotações pode ser maximizado com a adição de BAP associada ao ANA no meio de cultura. Concentrações maiores de BAP x ANA (6,0 x 0,6 e 4,0 x 0,4 mg L⁻¹, respectivamente), proporcionam aumento no comprimento de brotações.

PALAVRAS-CHAVE: Cobraína; Micropropagação; Organogênese direta; Planta Nativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHI, Y. M. et al. Pharmacological study on the novel antinociceptive agent, a novel monoterpene alkaloid from *Incarvillea sinensis*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. Japan, v. 28, p.1989-1991, 2005.
- COSTA, G. M. DA, et al. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.40, n.5, p.1090-1096, 2010.
- FERREIRA, J. T. B., CORRÊA, A. G., VIEIRA, P. C. *Produtos Naturais no Controle de Insetos*. São Carlos: Editora da UFScar, p.176, 2001.
- GALDIANO JUNIOR, R. F. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.42, n.5, p.801-807, 2012.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXI Jornada de Pesquisa

- GEORGE, E. F; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and methods. In: George EF, Hall MA & De Klerk GJ (Eds.) Plant propagation by tissue culture. 3^a ed. The Background. Dordrecht, Springer. p.29-64, 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: CBAB-EMBRAPA, 1998. p.183-260.
- GUTIERREZ, I. E. M. de et al. Multiplicação in vitro de Tapirira guianensis Aubl. (Anacardiaceae). Revista Ceres. Viçosa, v.60, n.2, p.143-151. 2013.
- JARDIM L, S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke). Acta Amazonica. Manaus, v.40, n.2, p.275-280, 2010.
- MACEDO, C. E. C. et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (Ananas comosus) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas in vitro. Revista Brasileira Fruticultura. Jaboticabal, v.25, n.3, p.501-504, 2003.
- MONFORT, L. E. F. et al. Efeito do BAP no cultivo in vitro de Ocimum selloi Benth. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Paulínia, v.14, n.3, p.458-463, 2012.
- MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.30, n.5, p.875-879, 2006.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, A. J. B. et al. In vitro multiplication of Tabernaemontana fuchsiaefolia L. (Apocynaceae). Revista Árvore. Viçosa, v.27, n.4, p.421-425, 2003.
- PEREIRA, C. et al. Antioxidant and antimycobacterial activities of Tabernaemontana catharinensis extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. Journal of Medicinal Food. New York, v.8, p.533 – 538, 2005.
- PEREIRA, P. S et al. Chemical constituents from Tabernaemontana catharinensis root bark: a brief NMR review of indole alkaloids and in vitro cytotoxicity. Química Nova. São Paulo, v.31, n.1, p.20-24, 2008.
- PIANA, M. et al. Phytochemical analysis and antioxidante capacity of Tabernaemontana catharinensis A. DC. Fruits and branches. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.881-888, 2014.
- QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo Taxonômico e Morfológico das Espécies de Apocynaceae Adans na Reserva Rio das Pedras, Município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisa Botânica. São Leopoldo, v.56, p.13-74, 2005.
- REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de Melissa officinalis L. Revista Ceres. Viçosa, v.55, n.3, p.160-7, 2008.
- SILVA, A. L. L. et al. Germinação in vitro de sementes e indução de calos em plântulas, cotilédones e anteras de porongo (Lagenaria siceraria (Mol.) Stand.) – Cucurbitaceae. Journal of Biotechnology and Biodiversity. Gurupi, v.3, n.4, p.117-126, 2012.
- SOBRAL, M. et al. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande Do Sul, Brasil. São Carlos, SP, p. 350, 2006.
- VILLA, F. et al. Multiplicação in vitro da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. Ciência e Agrotecnologia. Lavras, v.29, n.3, p.582-589, 2005.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXI Jornada de Pesquisa

XAVIER, A.; WENDLING, I.; DA SILVA, R. L. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 272, 2009.