



Estabelecimento *in vitro* de *Tabernaemontana catharinensis* DC. (Apocynaceae) em diferentes meios de cultivo

SOUZA, Jean Roque Peres¹; SCHIMDT, Suele Fernanda¹; HORN, Roberta Cattaneo²;
KOEFEENDER, Jana²; MANFIO, Candida Elisa³, GOLLE, Diego Pascoal^{4, 5*}

Palavras-Chave: Cultura de Tecidos. Cobrina. Espécie nativa.

Introdução

A cobrina - *Tabernaemontana catharinensis* DC. - é uma espécie lenhosa pertencente à família Apocynaceae. Caracteriza-se pelo porte arbustivo, atingindo até dez metros de altura. Ocorre frequentemente nas capoeiras e durante os primeiros estágios sucessionais; apresenta preferência por solos úmidos (seletiva higrófila), orlas das matas e clareiras da região da mata pluvial atlântica (GONÇALVES *et al.*, 2011).

A espécie tem chamado atenção de pesquisadores por seu potencial farmacêutico, pois possui diversas moléculas de interesse. Na medicina popular, seu uso como antídoto para picadas de serpentes e insetos é conhecido; na comunidade científica, vem sendo destacadas atividades farmacológicas como antileishmanial, antibacteriana, antiinflamatória, estrogênica, relaxante da atividade muscular, estimulante e depressor do sistema nervoso central, antitumoral, hipoglicemiante, analgésica e cardiotônica (BELKE *et al.*, 2011; BOLIGON *et al.*, 2011; GINDRI *et al.*, 2011).

Dentre as várias formas de propagação de plantas, a cultura de tecidos vegetais apresenta algumas vantagens. Pode-se destacar a obtenção de um elevado número de plantas em espaço reduzido e em curto período de tempo; além disso, permite o aceleração de programas de melhoramento e serve como base para outros processos biotecnológicos, como a transformação genética (FERREIRA *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estabelecimento *in vitro* de *T. catharinensis* a partir de explantes de origem seminal oriundos da germinação *ex vitro* e *in vitro*.

¹ Acadêmicos do curso de Agronomia da Universidade de Cruz Alta. E mail: jeanroqueperes@gmail.com; suele_fernanda@hotmail.com

² Prof^a. Dr^a, Universidade de Cruz alta. E mail: jkoefener@unicruz.edu.br / rcattaneo@unicruz.edu.br

³ Bolsista DOCFIX-CAPES/FAPERGS, Universidade de Cruz Alta. E mail: candidamanfio@gmail.com

⁴ Prof. Orientador, Dr., Universidade de Cruz alta. E mail: dgolle@unicruz.edu.br

⁵ Polo de Inovação Tecnológica do Alto Jacuí, Universidade de Cruz Alta, Cruz Alta, RS, Brasil.

*APOIO: PROBIC/FAPERGS



Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais *in vitro* da Universidade de Cruz Alta. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo bifatorial 2 x 3, sendo os níveis do fator “A” correspondes a origem dos explantes (plântulas germinadas *in vitro* ou *ex vitro*) e os níveis do fator “B” correspondentes aos diferentes meios de cultivo – meio MS (Murashige; Skoog, 1962), meio MS reduzido à metade da concentração de sais [$\frac{1}{2}$ MS] e meio WPM (Lloyd; McCown, 1981). As unidades experimentais foram compostas por um frasco de vidro com capacidade para 200 mL, contendo 30 mL do meio nutritivo e dois explantes, com 20 repetições por tratamento; totalizando 120 unidades experimentais e 240 explantes inoculados.

Para obtenção de explantes por meio da germinação *in vitro e ex vitro*, sementes foram coletadas de frutos oriundos de uma única planta matriz, situada no Campus da Universidade de Cruz Alta. As sementes foram desinfestadas assepticamente seguindo o seguinte procedimento: imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por trinta segundos; imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% (v/v) acrescida de duas gotas de detergente comercial, por 10 minutos; e triplo enxágue em água destilada estéril. Na sequência, foram inoculadas nos meios de cultura, processo este que ocorreu em câmara de fluxo laminar. Após 60 dias de cultivo em sala de crescimento, foram obtidos os explantes *in vitro*. Para obtenção dos explantes a partir da germinação *ex vitro*, as sementes foram germinadas em substrato comercial Plantmax® em copos plásticos com capacidade para 200 mL, contendo 150 mL do substrato. Foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas (26°C e 65% de UR). Aos 60 dias de cultivo, quando as plântulas apresentavam aproximadamente oito centímetros de altura, os explantes foram obtidos. Neste caso, foram imediatamente imersos em solução fungicida de Benomyl (Benlate500®) a 6 g L⁻¹, permanecendo assim durante o transporte até o laboratório (30 minutos) onde foi realizado o corte do limbo foliar (reduzido pela metade) e imersão em nova solução fungicida (igual a anteriormente citada) por 10 minutos; na sequência foram imersos em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto. Seguiu-se o seguinte processo de desinfestação: imersão em álcool etílico a 70% (v/v) por trinta segundos; imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% (v/v) acrescida de 2 gotas de detergente comercial, por 10 minutos; e triplo enxágue em água destilada estéril.

Todos os meios de cultura utilizados foram acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado em 5,8 (previamente a inclusão do



ágar) e os meios foram esterilizados a 121°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Passados 30 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis: sobrevivência (%), estabelecimento (%), oxidação fenólica. Os dados foram submetidos à análise de variância e para a comparação múltipla de médias foi utilizado o Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. O programa estatístico SISVAR para Windows (FERREIRA, 2000) foi utilizado para processamento dos dados.

Resultados e Discussão

Não foi observada interação entre os fatores testados, tampouco diferenças para os níveis isolados do fator “A” (fonte de explantes). Para o fator “B” (meios de cultivo) foram observadas diferenças para todas as variáveis analisadas.

Para as variáveis estabelecimento e sobrevivência, foi observado que os meios de cultivo diferem entre si, sendo que os meios $\frac{1}{2}$ MS mostrou-se mais adequado em relação ao meio MS com a concentração normal de sais, porém, não diferiu do meio WPM o qual, por sua vez, também não diferiu do meio MS, apresentando-se como um intermediário (Tabela 1). No que se refere a variável oxidação fenólica, os meios $\frac{1}{2}$ MS e WPM apresentaram 5% de oxidação fenólica, não diferindo entre si. O meio MS não apresentou explantes oxidados.

Pode-se avaliar que a espécie apresenta preferência por meios de cultura com menor concentração iônica para o seu estabelecimento. Vengadensan (2002) relata que o meio de cultura WPM possui 45% da capacidade iônica do meio MS; todavia, neste estudo, também foi usado o meio MS reduzido, o qual apresenta 50% da capacidade iônica. No entanto, observou-se que não houve diferença para as variáveis estabelecimento e sobrevivência quanto ao uso dos meios WPM e MS, este último em sua constituição normal de sais. Este dado permite inferir que além da menor concentração iônica, a composição do meio MS é mais adequada, porém precisa estar reduzida. Embora tenha apresentado oxidação fenólica, o índice pode ser considerado baixo, especialmente para espécies lenhosas nativas.



TABELA 1 – Influência do meio nutritivo no estabelecimento *in vitro* de cultivos assépticos de *Tabernaemontana catharinensis* DC. (Apocynaceae) após 30 dias de cultivo. Foram analisadas as variáveis, em porcentagem: sobrevivência (SB), oxidação fenólica (OF) e estabelecimento (EBT). Cruz Alta, RS, UNICRUZ, 2014.

Meio de Cultura	Variáveis Analisadas		
	SB (%)	OF (%)	EBT (%)
MS	55,0 b	0,0 b	55,0 b
WPM	77,5 ab	5,0 a	85,0 ab
½ MS	82,5 a	5,0 a	95,0 a
CV (%)**	20,40	14,35	21,00

*Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

**Coeficiente de variação expresso em porcentagem.

Conclusão

Para o estabelecimento *in vitro* de cobraína, o meio MS reduzido à metade da concentração de sais é o mais adequado.

Referências

BELKE, Bianca Vargas.; PIANA, Mariana.; BOLIGON, Aline Augusti.; ZADRA, Marina.; FRÖHLICH, Janaina Kieling.; BRUM, ThieleFaccim de.; ATHAYDE, Margareth Linde. **Doseamento de Flavonóides nos Ramos de *Tabernaemontana Catharinensis* A. DC.** Revista Contexto & Saúde, Ijuí. v. 10. n. 20. Jan./Jun. 2011.

BOLIGON, Aline Augusti; SCHWANZ, Tiago, Guilherme; DE BRUM, ThieleFaccim.; FROHLICH, Janaína Kieling; PIANA, Mariana; ATHAYDE, Margareth Linde. **Composição Química do Óleo Essencial das Folhas de *Tabernaemontana Catharinensis* A. DC.** Educação e Ciência na Era Digital. SEPE – XV Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão 5 a 7 de outubro de 2011.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In...45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq, 1998. p. 21 - 43.

GINDRI, Amanda Leitão.; BOLIGON, Aline Augusti.; MARIO, Débora Nunes.; FROHLICH, Janaina Kieling.; BRUM, ThieleFaccim de.; ALVES, Sydney Hartz Alves.; ATHAYDE, Margareth Linde. **Potencial Antimicrobiano do Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Tabernaemontana Catharinensis* A. DC.** Revista Contexto & Saúde, Ijuí • v. 10 • n. 20 • Jan./Jun. 2011.



GONÇALVES, D.M.; ARAÚJO, J.H.B.; FRANCISCO, M.S.; COELHO, M.A.; FRANCO, J.M. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontanacatharinensis* A.DC. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, n.2, p.197-202, 2011.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, Washington, v. 30, p. 327 - 421, 1981.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

VENGADESAN, G. et al. *In vitro* propagation of *Acacia sinuate* (Lour.) Merr. from nodal segments of 10-year-old-tree. *In vitro cellular and developmental biology – plant*, Columbia, v.39, n.4, p.409-414, July, 2003.