

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus ilicifolia* Mart.)

FLORES, Rejane¹; STEFANELLO, Suzana²; FRANCO, Elcí T. H. ³; MANTOVANI, Nilton ⁴

¹ Aluna do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - UFPel, Pelotas, RS

² Aluna do Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais - UFSC, Florianópolis, SC.

³ Prof.^a. Dr.^a. Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal - UFSM, RS

⁴ Aluno do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal - UFSM, Santa Maria, RS
(Recebido para publicação em 03/11/98)

RESUMO

Avaliou-se o efeito de concentrações de ácido ascórbico, fitoreguladores e tipos de explantes na regeneração *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*. O meio de cultivo básico utilizado foi o MS/2 (50% dos sais) com ferro reduzido a ¼, 30 gL⁻¹ de sacarose e 6 gL⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8. No primeiro ensaio, segmentos nodais foram imersos durante 30 minutos em cinco concentrações (0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 e 0,5 %) de ácido ascórbico, a fim de reduzir a oxidação fenólica. No segundo ensaio, testaram-se cinco concentrações (0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 e 2,5 mgL⁻¹) de BAP (benzilaminopurina) ou de KIN (6-furfurilaminopurina) e dois tipos (segmentos nodais e apicais) de explantes. A solução contendo 0,05% de ácido ascórbico proporcionou os melhores resultados quanto a regeneração de brotações e os menores índices de oxidação. Não houve efeito significativo quanto ao tipo de explante testado. O BAP foi superior ao KIN quanto a percentagem de explantes com brotações.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*, micropropagação, planta medicinal, ácido ascórbico, oxidação fenólica, BAP, KIN

ABSTRACT

IN VITRO REGENERATION OF *MAYTENUS ILICIFOLIA*. This research work had the objective of evaluating the concentrations of ascorbic acid, growth regulators and type of explants on *in vitro* regeneration of *Maytenus ilicifolia*. The basal medium culture consisted MS/2 (half strength) with iron reduced at ¼, added of 30gL⁻¹ of sucrose and 6 gL⁻¹ of agar. The pH was adjusted to 5.8. In the first assay, nodal segments were immersed by 30 minutes in five concentration (0.05; 0.1; 0.2; 0.3 and 5%) of ascorbic acid in order to reduce the phenolic oxidation. In the second assay, five concentration (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 e 2.5 mgL⁻¹) of BAP or of KIN and two different explants (nodal and apical segments) were tested. The solution contends 0.05% ascorbic acid showed the best regeneration rates and the slowest oxidation rates. Nodal and apical segments

did not show significant difference. BAP was more effective than KIN with regard to percentage of explants regenerative.

Key words: *Maytenus ilicifolia*, micropropagation, medicinal plant, ascorbic acid, phenolic oxidation, BAP, KIN

INTRODUÇÃO

Maytenus ilicifolia, também conhecida como espinheira-santa, é uma planta medicinal nativa, comum nas matas ciliares da região sul do Brasil. As folhas do gênero *Maytenus* são comumente utilizadas para o tratamento de úlceras no estômago, dispepsias e outros problemas gástricos. SOUZA-FORMIGONI *et al.* (1991) relatam que os efeitos da *Maytenus* contra as ulcerações no estômago em animais de laboratório tendem a confirmar o seu uso popular. A espinheira-santa também é usada popularmente devido suas propriedades analgésicas, anti-sépticas e cicatrizante (ALMEIDA, 1993). Pode ser propagada usualmente por sementes (TAYLOR-ROSA, 1994), mas devido ao constante uso de suas folhas corre o risco de extinção, pela exploração predatória.

A proliferação *in vitro* de plantas inteiras, a partir da cultura de gemas e meristemas, é basicamente uma extensão da propagação vegetativa feita em muitas espécies. Esta metodologia vem sendo aplicada em grande número de plantas herbáceas e lenhosas, sendo geralmente o mais rápido, eficiente e confiável método de micropropagação (HUSSEY, 1986). Porém, a competência morfogenética *in vitro* é complexa e indiretamente influenciada por fatores fisiológicos e ambientais (VASIL, 1987).

As citocininas são reguladores de crescimento que desempenham um papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como, a indução e a proliferação de brotações adventícias (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Protocolo altamente regenerativo e eficiente foi descrito para *M. emarginata*, utilizando meio de cultura MS

adicionado de BAP e AIA (Rathore, 1992). Brotações de *Maytenus ilicifolia* foram obtidas a partir de segmentos nodais, em meio de cultura MS, influenciadas pela concentração de BAP utilizada e pelo grau de juvenildade do explante e sua posição no caule (PEREIRA *et al.*, 1995).

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*. A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas (LERCH, 1981). As quinonas são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (MONACO *et al.*, 1977).

Existem substâncias naturais das plantas que possuem atividade antioxidante. O ácido ascórbico é considerado antioxidante biológico, estando presente em altas concentrações em muitos compartimentos celulares, como o estroma dos cloroplastos (LARSON, 1988). Desta forma, avaliou-se a influência do ácido ascórbico na oxidação dos explantes, bem como o efeito de diferentes citocininas e de explantes na regeneração *in vitro* de *Maytenus ilicifolia*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram no Laboratório de Cultura de Tecidos (Setor de Fisiologia Vegetal) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. Utilizaram-se como explantes segmentos nodais e apicais (± 1 cm) de plântulas de *Maytenus ilicifolia* com um ano de idade, mantidas em casa de vegetação. Estes segmentos foram lavados em água corrente por duas horas, desinfestados em solução contendo álcool 70% durante 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de detergente durante 15 minutos. Posteriormente, foram lavados em água destilada e autoclavada. O meio básico de cultivo continha 50% dos sais de MS (MS/2) (Murashige & Skoog, 1962) com ferro reduzido a $\frac{1}{4}$, 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

As culturas foram mantidas no escuro por ± 10 dias, sendo posteriormente, conduzidas à sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e ± 1000 lux.

O delineamento experimental foi o completamente ao acaso com diferentes repetições para cada ensaio. Os dados foram transformados segundo arco seno da raiz quadrada de $(X+1)$ e analisados pelo teste de Duncan, com α 0,01 e 0,05.

Ensaio 1. Efeito do ácido ascórbico na oxidação e regeneração *in vitro*

Devido a alta taxa de oxidação, observada nesta espécie, em testes preliminares, avaliaram-se cinco concentrações (0.05 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.3 e 0.5 %) de ácido ascórbico, a fim de reduzir a oxidação fenólica. Utilizaram-se, como explantes, segmentos nodais, os quais permaneceram, após a assepsia, 30 minutos em solução aquosa com as diferentes concentrações de ácido ascórbico testadas. O meio de cultura básico foi acrescido de 0.1 mg L^{-1} de ANA (ácido-naftalenoacético) e 1.0 mg L^{-1} de BAP (6-benzilaminopurina).

As avaliações foram após 45 dias de cultivo mediante a percentagem de explantes oxidados e percentagem de explantes regenerativos.

Ensaio 2. Efeito do BAP e KIN na indução de regeneração *in vitro* de segmentos nodais e apicais

Testaram-se cinco concentrações (0.5 ; 1.0 ; 1.5 ; 2.0 e 2.5 mg L^{-1}) de BAP (benzilaminopurina) ou de KIN (6-furfurilaminopurina), combinados com 0.1 mg L^{-1} de ANA e dois tipos (segmentos nodais e apicais) de explantes. Após a assepsia, os explantes permaneceram 30 minutos em solução aquosa com 0,1% de ácido ascórbico. As avaliações foram aos 45 dias de cultivo pela percentagem de regeneração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito altamente significativo das concentrações de ácido ascórbico quanto a percentagem de oxidação e regeneração dos explantes (Tabela 1). Os melhores resultados foram para 0.05% de ácido ascórbico, havendo crescente percentagem de explantes regenerativos (86,9%) e baixo índice de oxidação (1.5%). Com 0.2% de ácido ascórbico nenhum explante oxidou, entretanto, houve resultados inferiores da regeneração dos explantes quando comparada com 0,05%.

TABELA 1. Análise da variação para percentual de oxidação e regeneração de segmentos nodais de espinheira-santa

Causa da variação	GL	Quadrado médio	
		% de oxidação	% de regeneração
Ácido ascórbico (A)	4	7328,79**	4552,72**
Resíduo	20	571,57	699,35
Média geral		43,40	26,49
CV (%)		58,00	85,36

** -Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

O aumento da concentração do ácido ascórbico reduziu a percentagem de regeneração (Tabela 2), provavelmente pelo efeito tóxico do ácido ascórbico para os explantes. BROOME & ZIMMERMAN (1978), verificaram que agentes redutores como o ácido ascórbico, ácido cítrico e a cisteína são prejudiciais no desenvolvimento de explantes de amora preta. BIASI *et al.* (1994), trabalhando com micropropagação em

abacateiro, verificaram que concentrações mais reduzidas (0.01 e 0.02%) de ácido ascórbico e de ácido cítrico reduzem a oxidação nos explantes. Ácido ascórbico e o cítrico, em solução aquosa, também reduzem a oxidação de explantes de *Strelitzia* (ZIV & HALEVY, 1983) e *Pelargonium* (HILDEBRANDT & HARNEY, 1988).

TABELA 2. Explantes regenerativos e oxidados de espinheira-santa em função das concentrações de ácido ascórbico

Variáveis (%)	Ácido ascórbico (%)				
	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
Regeneração	86,9 a	46,6 a	46,5 a	0 b	0 b
Oxidação	1,5 c	46,6 b	0 c	83,4 ab	100 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%

Além dos antioxidantes biológicos (LARSON, 1988), a imersão dos tecidos em meio líquido, diminui o dano nas células e reduz a exposição do tecido ao oxigênio (MONACO *et al.*, 1977), reduzindo a oxidação. A diminuição da luminosidade na câmara de fluxo laminar, durante a excisão dos explantes e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo, também é benéfica (MARKS & SIMPSON, 1990), pois a luz aumenta a produção de fenóis na planta. Observou-se, também, que a redução em 50% a concentração de sais do meio de cultura MS minimizou a oxidação fenólica em espinheira-santa. Para o abacateiro, BIASI *et al.* (1994) salientam que a adição de antioxidantes ao meio de cultura é menos vantajosa, uma vez que, melhores resultados foram alcançados pela diminuição da concentração de sais do meio de cultura. Resultados similares foram obtidos

para o estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira Jales e Campinas, que pode ser realizado em 50% dos sais de MS, suplementado com 10µM de BAP (BIASI *et al.*, 1997)

O resumo da análise de variação (Tabela 3) para a percentagem de regeneração em função dos tipos de explantes, tipo de citocinina e concentrações das mesmas, mostra diferença estatística significativa apenas para o tipo de citocinina (BAP e KIN) testada. Entretanto, PEREIRA *et al.* (1995), verificaram que em *M. ilicifolia*, o número de brotos formados foi influenciado pela concentração de BAP, idade do explante e posição da gema no mesmo.

Conforme Figura 1, os melhores resultados, quanto a percentagem de regeneração, foram com BAP, independente do tipo de explante (segmentos nodais e apicais) utilizado.

TABELA 3. Análise de variação percentual de regeneração de explantes de espinheira-santa

Causa da variação	GL	Quadrado médio
		% de regeneração
Tipo de explante (A)	1	166,89 ^{ns}
Tipo de citocinina (B)	1	15,2667,91 **
Concentrações de citocininas (C)	4	800,70 ^{ns}
A*B	1	1237,92 ^{ns}
A*C	4	150,29 ^{ns}
B*C	4	300,74 ^{ns}
A*B*C	4	481,36 ^{ns}
Resíduo	60	388,29
Média geral		19,55
CV (%)		75,09

** -Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

^{ns} – Não significativo

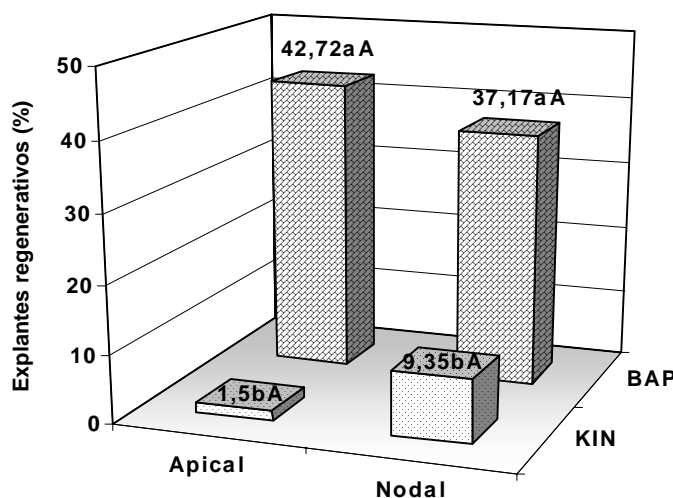


Figura 1. Regeneração de segmentos nodais e apicais de espinheira-santa em meio de cultura com BAP e KIN

O BAP foi mais eficiente que o KIN na proliferação *in vitro* de brotos de crisântemo (OLIVEIRA & PASQUAL, 1995) e, ainda, favoreceu a multiplicação e desenvolvimento de brotações de *Coffea arabica* L. (CARVALHO *et al.*, 1996) e *Maytenus emarginata*. Para BIASI *et al.* (1994) o BAP e o KIN exerceram o mesmo efeito na multiplicação *in vitro* de brotações de abacateiro.

As concentrações de BAP e de KIN não diferiram estatisticamente, mas 2.0 mgL⁻¹ de BAP e 1.5 – 2.5 mgL⁻¹ de KIN resultaram melhor indução de brotações originadas de segmentos nodais, com médias de 59,7 e 9,2% respectivamente. Estes resultados são similares

aos obtidos por RATHORE *et al.* (1992) na multiplicação *in vitro* de *Maytenus emarginata* em MS acrescido de 0.1 mgL⁻¹ de AIA e 2.5 mgL⁻¹ de BAP e aos de Pereira *et al.* (1995), que regeneraram plantas a partir de gemas axilares de *M. ilicifolia* no meio MS suplementado com 3.0 mgL⁻¹ de BAP, porém com baixa frequência. Na micropropagação do cajueiro anão precoce, maior número de gemas em segmentos nodais, também foram obtidos em meio acrescido de 2.0 mgL⁻¹ de BAP (CORREA & ALVES, 1997). Neste trabalho, com explantes juvenis de um ano, obteve-se baixa proliferação de gemas, enquanto RATHORE (1992) utilizou explantes de plantas adultas.

CONCLUSÕES

Nas condições do trabalho, com espinheira-santa, pode-se concluir que:

Ácido ascórbico reduz a oxidação fenólica nos explantes;

BAP induz pouca brotação a partir de gemas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Eng.^o Agr.^o Denilson Flores pelo apoio e valiosa ajuda na coleta das sementes e ao PET-CAPEs e FAPERGS pelo auxílio financeiro na execução do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993.
- BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro Ouro Verde a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, 1994.
- BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. da S.; POMMER, C. V. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira através de ápices meristemáticos e segmentos nodais, Curitiba, PR, 1997. In: II Encontro Brasileiro de Biotecnologia vegetal, 1997. Gramado, RS. **Anais...** Gramado, 1997. p. 103.
- BROOME, O. C.; ZIMMERMAN, R. H. *In vitro* propagation of blackberry. **HortScience**, v.13, p. 151-153, 1978.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C. *et al.*. Influência do benomyl e benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* do café cv. Catuaí. **Ceres**, v. 43, n.248, p. 402-408, 1996.
- CORREA, D.; ALVES, M. da C. S. Micropropagação do cajueiro anão precoce, Fortaleza, CE, 1997. In: II Encontro Brasileiro de Biotecnologia vegetal, 1997. Gramado, RS. **Anais...** Gramado, 1997. p. 257.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley; Exegetics Limited, 1984.
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agricultural applications**. London: Butterworths, 1986. Cap. 6. p. 69-84.
- HILDEBRANDT, V.; HARNEY, P. M. Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium x hortorum*. **Journal of Horticultural Science**, v. 63, p. 651-657, 1988.
- LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Biochemistry**, v. 27, n.4, p. 969-978, 1988.
- LERCH, K. Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenases. In: SIEGEL, H (Ed.). **Metal ions in biological systems**. Marchel Deckker, 1981. p. 143-186.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.
- MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. *et al.* Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-verlag, 1977. P. 109-126.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Pl.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, P. D.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de brotos de crisântemo, 1995. In: Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 1995. Lavras, MG. **Anais...** Lavras, 1995, p.128.
- PEREIRA, A. M. S.; MORO, J. R.; CERDEIRA, R. M. M.; FRANCA, S. C. Effects of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.3, p.295-297, 1995.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G. *et al.*. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethno. Pharmacol.**, v. 34, n. 1, p. 21-27, 1991.
- RATHORE, T. S.; DEORA, N. S.; SHEKHAWAT, N. S. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd.) Ding Hou-tre of the Indian Desert, through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 9, p. 449-451, 1992.
- TAYLOR-ROSA, S. G. ; INCHAUSTI DE BARROS, I. B. **Caracterização das sementes de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss, espinheira - santa e viabilidade de sua propagação sexuada**. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, 1994, 106p.
- VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grape crops. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 128, p. 193-218, 1987.
- ZIV, M.; HALEVY, A. H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, v. 18, p. 434-436, 1983.