

# Multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (Apocynaceae)

Heltion Ivan Hubner<sup>1</sup>, Luiz Vieira da Silva<sup>1</sup>, Idivaldo Capatti<sup>1</sup>, Elisângela Fumagali<sup>2</sup>, Eliezer Rodrigues de Souto<sup>3</sup>, Regina Aparecida Correia Gonçalves<sup>2</sup> e Arildo José Braz de Oliveira<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: ajboliveira@uem.br

**RESUMO.** O presente estudo relata um método simples e promissor para multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum*, uma espécie encontrada no sudeste do Brasil e seriamente ameaçada de extinção, utilizada com propósitos medicinais e como fonte de compostos que podem ser usados para desenvolver novos fármacos sintéticos. O trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* de *Aspidosperma ramiflorum* (guatambu), a partir de segmentos apicais de material juvenil originários de plântulas obtidos a partir de sementes. A avaliação da multiplicação *in vitro* foi realizada em meio de cultura Woody Plant Medium (WPM), suplementado com concentrações variadas de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (6-BAP). A multiplicação de *A. ramiflorum* foi positivamente influenciada principalmente nas combinações aonde as concentrações de 6-BAP foram relativamente maiores do que as do ANA, nessas concentrações houve a indução de múltiplas brotações.

**Palavras-chave:** micropropagação, *Aspidosperma ramiflorum*, Apocynaceae, cultura de tecidos.

**ABSTRACT.** *In vitro* multiplication of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. (Apocynaceae). The present study described a simple and promissory method for *in vitro* multiplication of *Aspidosperma ramiflorum*, a species found in the South of Brazil and seriously extinction menaced. The method was used for medicinal proposes and as a source of compounds to develop new synthetic drugs. The objective of this work was to establish an *in vitro* multiplication protocol of *Aspidosperma ramiflorum* (guatambu), from apical segments of juvenile material of plantlets obtained from seeds. The *in vitro* multiplication evaluation was done in WPM medium, supplemented with variable concentrations of Naphthalene acetic acid (NAA) and 6- Benzyl aminopurine (6-BAP). The multiplication of *A. ramiflorum* was positively influenced mainly in the combinations when 6-BAP concentrations were relatively higher than NAA. In these concentrations multiple shoots were induced.

**Key words:** micropropagation, *Aspidosperma ramiflorum*, Apocynaceae, tissue culture.

## Introdução

A *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg., conhecida vulgarmente como Guatambu-amarelo, guatambu-grande, peroba-amarela, peroba-café, tambu, é uma árvore de grande porte, podendo alcançar de 12-30 m de altura, nativa das florestas do sudeste do Brasil e tem ocorrência normal em Minas Gerais e Rio de Janeiro até Santa Catarina (Lorenzi, 1992). Essa espécie corre perigo de extinção pela exploração desordenada para a extração madeireira e a transformação de áreas florestais para o uso na agricultura. A Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo enquadrou o Guatambu como espécie

rara da Floresta Estacional Semi-Decidual na lista de plantas ameaçadas de extinção daquele estado (Secretaria de Meio Ambiente, 2001 e 2003).

A espécie *A. ramiflorum* tem atraído contínuo interesse dos químicos de produtos naturais pela sua importância na fitoterapia devido a sua capacidade de produzir alcalóides indólicos (Reis *et al.*, 1994). Alguns dos alcalóides presentes nessas espécies, como a ramiflorina A e ramiflorina B, tiveram suas ações farmacológicas comprovadas e bem descritas, dentre elas podem-se destacar: antimicrobiana (Tanaka *et al.*, 2006) e antileishmania (Ferreira *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2007).

A propagação de espécies florestais normalmente é via sementes, com exceção de algumas espécies que podem ser multiplicadas via estaquia de material juvenil. Em espécies que apresentam dificuldade de propagação por essas vias, como é o caso do Guatambu, a micropropagação é uma ferramenta importante para a multiplicação dessa espécie. Técnicas baseadas na micropropagação de plantas podem ser empregadas com sucesso para a propagação massal de genótipos selecionados, visando à conservação e melhoramento genético (Thorpe e Kumar, 1993).

A micropropagação tem sido ferramenta útil para multiplicação clonal e produção de mudas de muitas espécies florestais de importância econômica ou que se encontram em extinção, por exemplo, *Pinuspinaster* (Gomes et al., 1999), *Myracrodruon urundeuva* (Andrade et al., 2000), *Acacia seyal* (Al-Wasel, 2000) e *Fraxinus angustifolia* (Tonon et al., 2001), no entanto ainda não existem relatos na literatura sobre a micropropagação do Guatambu.

Por isso o objetivo do trabalho é o estabelecimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* de mudas de *Aspidosperma ramiflorum*, a partir de segmentos apicais de materiais juvenis originários de plântulas obtidos a partir de sementes. A obtenção de mudas de *Aspidosperma ramiflorum* pode contribuir para o aproveitamento e conservação dessa espécie de interesse medicinal, além de oferecer opções para o uso dos recursos genéticos advindos dessa espécie de uma maneira racional e auto-sustentável.

## Material e métodos

### Estabelecimento de culturas assépticas

As sementes de *A. ramiflorum* foram adquiridas junto ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF-Esalq-USP). As sementes foram submetidas à desinfecção por imersão em uma solução Folicur 0,02% (50 µL de Tebuconazole a 20% dissolvidos em 500 mL de água destilada) durante 20 minutos, seguido de imersão em solução de NaOCl comercial diluída a 50% (v/v) durante 15 minutos, ao final do processo as sementes foram lavadas com água destilada estéril.

Após a desinfecção das sementes, estas foram colocadas para germinar no meio de cultura Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd e McCown, 1980), em 25°C na presença de luz com fotoperíodo de 16h. Após quatro semanas as plântulas que se desenvolveram foram utilizadas como fonte de explantes estéreis.

### Indução de brotações múltiplas

As brotações apicais estabelecidas *in vitro* foram cortadas em sua extremidade basal e utilizadas como explantes para indução de brotações múltiplas. O meio

de cultura utilizado foi o WPM, suplementado com diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (6-BAP: 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0; 5,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA: 0,0; 1,0; 3,0 mg L<sup>-1</sup>), conforme o descrito na Tabela 1. A avaliação foi feita pela contagem do número de brotações por explante, após quatro semanas, durante o cultivo inicial e nos dois subcultivos subsequentes.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 6 x 3, com quatro repetições e uma planta por frasco. As médias foram comparadas pela análise de variância e pelo teste de Tukey.

**Tabela 1.** Tratamentos (T) com diferentes combinações de ANA e 6-BAP (mg L<sup>-1</sup>) em meio WPM.

ANA 6-BAP	0,0	1,0	3,0
0,0	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
0,5	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>
1,0	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>
1,5	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>
3,0	T <sub>13</sub>	T <sub>14</sub>	T <sub>15</sub>
5,0	T <sub>16</sub>	T <sub>17</sub>	T <sub>18</sub>

## Resultados e discussão

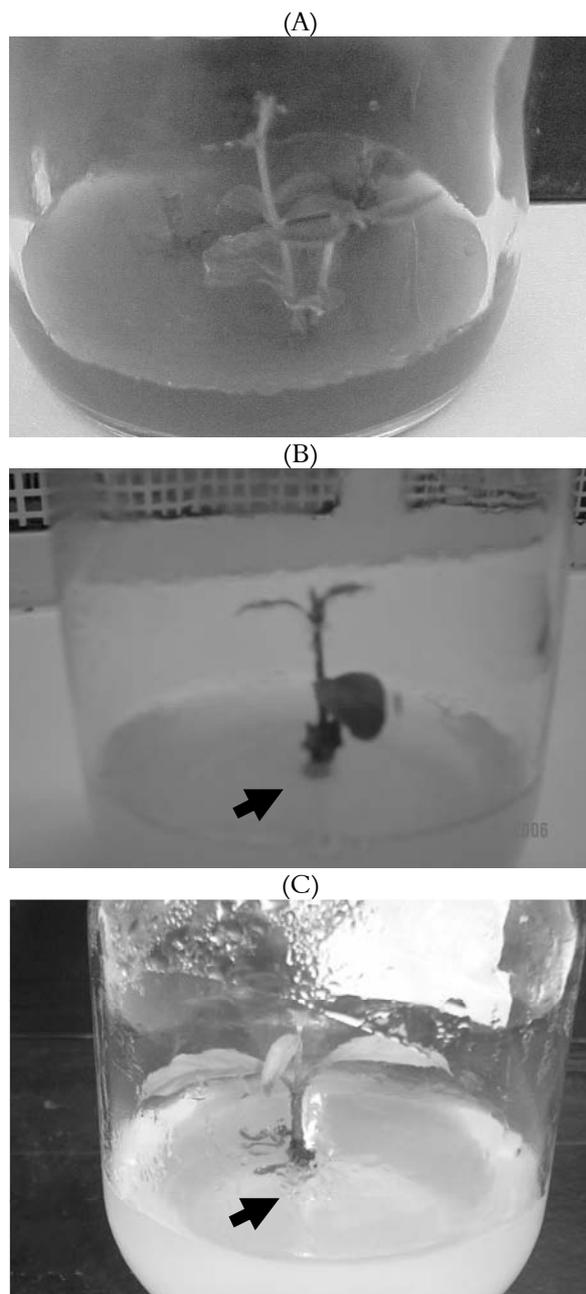
No presente trabalho, de maneira geral, o uso de concentrações mais elevadas de 6-BAP combinadas com ANA resultou nas melhores taxas de indução de brotações. O 6-BAP e não a Cinetina (KIN) foi a citocinina escolhida para os experimentos porque esta tem apresentado bons resultados na indução de brotações em muitas espécies arbóreas (França et al., 1995). Tem sido aceito que a KIN promove baixas taxas médias de regeneração, ou então, em algumas espécies esse fitorregulador promove o alongamento das brotações, sendo menos eficiente que o 6-BAP, como já constatado em alguns trabalhos com *Eucalyptus globulus* (Trindade et al., 1990), *Morus australis* (Pattnaik et al., 1996) e *Cercis canadensis* (Mackay et al., 1995). A indução de brotações em explantes apicais de *A. ramiflorum* foi mais efetiva nos meios contendo 3,0 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA (T<sub>14</sub>) e 5,0 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA (T<sub>17</sub>) conforme apresentado na Tabela 2 e Figuras 1A e B.

Os explantes apicais e nodais submetidos aos tratamentos com concentrações maiores de 6-BAP na ausência da ANA não induziram brotações e nos explantes nodais ocorreu um processo de necrose acentuado. Esses resultados mostram a necessidade de um balanço citocinina/auxina adequado para indução da formação de brotações nos explantes de *A. ramiflorum*. Resultados similares foram encontrados por Declerck e Korban (1994) em culturas de *Cornus florida*, pois quando empregaram meios de cultura

**Tabela 2.** Taxa média de indução de brotações em explantes apicais de *A. ramiflorum* obtidas em meio WPM suplementado com as combinações de fitorreguladores mais efetivas.

Fitorreguladores (mg L <sup>-1</sup> )	Taxa média de indução das brotações		
	Cultivo inicial	Primeiro subcultivo	Segundo subcultivo
T <sub>14</sub> – 3,0 6	3,0 a <sup>1</sup>	2,5 a	2,5 a
T <sub>17</sub> – 5,0 6	2,0 a	2,0 a	1,8 a
T <sub>11</sub> – 1,5 6	1,0 a	1,0 a	1,0 a

<sup>1</sup>Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente, pelo teste de Tukey (p≤0,05).



**Figura 1.** Indução de brotações em explantes apicais de *Aspidosperma ramiflorum* em meio WPM contendo: (A) 3,0 mg L<sup>-1</sup> 6-BA + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, T<sub>14</sub>; (B) 5,0 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, T<sub>17</sub>; (C) 1,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA, T<sub>11</sub>; A flecha indica a formação de calos na base do explante.

contendo auxinas combinadas com altas concentrações de 6-BAP estimularam um incremento na produção de brotações. Já com o emprego de auxinas combinadas com concentrações menores de 6-BAP não interferiu na taxa média de brotação, assim como o observado no presente trabalho.

Os motivos porque somente dois tratamentos foram efetivos para a indução de brotações em explantes apicais e nodais de *A. ramiflorum* estão relacionados com as diversas dificuldades que podem ser encontradas ao longo das diferentes etapas do processo de micropropagação de espécies lenhosas. Uma das dificuldades dessa técnica tem sido o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro* (Assis e Teixeira, 1998). A variabilidade encontrada nos resultados, decorrentes de características inerentes na planta (genótipo, idade e condições fisiológicas) ou meio ambiente é outro empecilho ao emprego de metodologias de micropropagação (Paranjothi *et al.*, 1990).

Além desses fatores, na iniciação de culturas lenhosas é comum a ocorrência de compostos fenólicos, mesmo quando se empregam tecidos muitos jovens como plântulas geradas por germinação *in vitro*, que podem estar ligados a processos de regulação do crescimento, especialmente as auxinas, dependendo da concentração endógena no tecido induzem a síntese desses compostos (Teixeira, 2006).

A oxidação fenólica dificultou o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro* de *A. ramiflorum*, porque algumas enzimas oxidaram os compostos fenólicos formando quinonas, as quais foram responsáveis pela coloração marrom observada nos meios de cultura, além de levaram os explantes a um processo de necrose acentuada e posteriormente a morte, esse fato ocorreu principalmente nos tratamentos T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> onde o ANA (1,0 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) foi empregado como o único fitorregulador e, também, naqueles tratamentos em que a concentração de 6-BAP era baixa T<sub>5</sub> e T<sub>6</sub> (0,5 mg L<sup>-1</sup>) em relação à de ANA.

Outro aspecto importante a ser mencionado foi a formação de calos na base dos explantes nodais que ocorreu em alguns tratamentos: T<sub>2</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>14</sub> e T<sub>18</sub>, a Figura 1C demonstra esse aspecto, isto é muito comum em espécies lenhosas mas indesejado na micropropagação, pois em etapas posteriores pode comprometer a rizogênese e o desenvolvimento da parte aérea (Grattapaglia e Machado, 1998).

### Conclusão

No presente trabalho, foi estabelecido um protocolo multiplicação clonal de *Aspidosperma ramiflorum* a partir de material juvenil. De maneira geral,

os fitorreguladores testados foram eficientes para promover a quebra de dominância apical e o desenvolvimento de brotações axilares em plântulas estéreis obtidas a partir de sementes de *A. ramiflorum*. Duas combinações dos fitorreguladores testados foram eficientes para promover brotações em explantes apicais. Além disto, esses resultados permitem vislumbrar uma metodologia com uma boa taxa de multiplicação, mas necessita ainda de um refinamento visando aumentar a eficiência do estágio de indução de brotações. Este é o primeiro relato de multiplicação *in vitro* de plantas de *Aspidosperma ramiflorum*.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Desenvolvimento a Pesquisa da Unioeste, Estado do Paraná (Fundep), pelo suporte financeiro.

### Referências

- AL-WASEL, A.S. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. *J. Arid Environ.*, New York, v. 46, n. 4, p. 425-431, 2000.
- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. et al. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPq, 1998. p. 261-296.
- DECLERCK, V.; KORBAN, S.S. Effects of source macronutrients and plant growth regulator concentration on shoot proliferation of *Cornus florida*. *Plant. Cell Tiss. Org.*, Dordrecht, v. 38, n. 1, p. 57-60, 1994.
- FERREIRA, I.C.P. et al. Antileishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.
- FRANÇA, S.C. et al. Acomparasion of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Piceae glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant. Cell Tiss. Org.*, Dordrecht, v. 40, n. 3, p. 281-287, 1995.
- GOMES, F. et al. Micropropagação do pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton). *Silvia Lusitana*, Oeiras, v. 7, n. 2, p. 139-152, 1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPq, 1998. p. 183-260.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, Southold, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p. 29.
- MACKAY, W.A. et al. Micropropagation of Mexican redbud, *Cercis Canadensis*. *Plant. Cell Tiss. Org.*, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 295-299, 1995.
- PARANJOTHI, K. et al. Clonal multiplication of woody perennials. In: BHOJWANI, S.S. (Ed.). *Plant tissue culture: applications and limitations*. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 190-219.
- PATNAIK, J. et al. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis* Poir. *syn M. acidosa*. *Plant Cell Report*, Berlin, v. 15, n. 11, p. 841-845, 1996.
- REIS, F.A.M. et al. Indole Alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 41, p. 963-967, 1994.
- SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE (Estado de São Paulo) Resolução nº 21/2001, Fixa orientação para o reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas e dá providências correlatas, *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 23 de novembro, 2001.
- SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE (Estado de São Paulo) Resolução nº 47/2003, Altera e amplia a Resolução SMA 21, de 21-11-2001; Fixa orientação para o reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas e dá providências correlatas, *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 26 de novembro de 2003.
- TANAKA, J.C.A. et al. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 39, n. 3, p. 387-391, 2006.
- TANAKA, J.C.A. et al. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Phytomedicine*, Stuttgart, v.14, p. 377-380, 2007.
- TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: <<http://www.redbio.org>>. Acesso em: 30 nov. 2006.
- THORPE, T.A.; KUMAR, P.P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M.R. (Ed.). *Micropropagation of woody plants*. The Netherlands: Kluwer Academic, 1993. p. 11-29.
- TONON, G. et al. Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by *in vitro* shoot organogenesis. *Sci. Hort.*, Amsterdam, v. 87, n. 4, p. 291-301, 2001.
- TRINDADE, H. et al. The role of cytokinin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globules* grown *in vitro*. *Aust. Forestry*, Yarralumla, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.

Received on October 31, 2007.

Accepted on December, 18, 2007.