

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA O ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE JALAPA (*MANDEVILLA ILLUSTRIS*) (VELL.) R. E. WOODSON

Ana Valéria de Souza¹; Bianca Waléria Bertoni², Suzelei de Castro França²; Ana Maria Soares Pereira².

¹Embrapa Semi-Árido – CPATSA, Km 458, Zona Rural, Cx.P. 601, CEP 56304-010, Perolina-PE; ²Deptº de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto-SP; e-mail: ana.valeria@cpatsa.embrapa.br, bbertoni@unaerp.br, scfranca@unaerp.br, apereira@unaerp.br

RESUMO

Mandevilla illustris (Apocynaceae) é uma espécie endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como jalapa ou jalapa do campo, utilizada na medicina popular devido suas propriedades terapêuticas. O xilopódio é purgativo e a casca e o látex são usados nas assepsias de úlceras e contra verrugas. Atualmente, esta espécie está em risco de extinção devido a coleta extrativista predatória. O objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo viável para o enraizamento *in vitro* de *M. illustris* e desta forma, possibilitar a produção de mudas em escala comercial que poderão ser usadas para recompor áreas ou como fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica. Para o início dos experimentos foram utilizadas plântulas já estabelecidas *in vitro* submetidas a diferentes tratamentos. Os experimentos foram: 1) Efeito do tempo de permanência das plântulas na presença de NAA e IBA; 2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas; 3) Efeito de auxina e poliamina e 4) Efeito do Dithiothreitol (DTT). Em todos os experimentos utilizou-se o meio MS/2 líquido e as avaliações foram realizadas quanto a porcentagem de plântulas enraizadas, número e comprimento de raiz e formação de calos. Os melhores resultados foram obtidos no primeiro experimento, onde 70% das plântulas

enraizaram quando permaneceram durante quinze dias na presença de 1 mgL⁻¹ de NAA. Maior média para número e comprimento de raiz também foram obtidas neste tratamento. Em todos os outros experimentos, a porcentagem de enraizamento foi menor, assim como as outras características avaliadas. Não observou-se a formação de calos que pudessem comprometer o enraizamento *in vitro*. O meio MS/2 líquido suplementado com NAA e a alternância no tempo de permanência das plântulas em sua presença, pode ser considerado um método eficiente para promover o enraizamento *in vitro* de *M. illustris*.

PALAVRAS-CHAVE: planta medicinal, Cerrado, extinção.

ABSTRACT

Optimization of protocol for *in vitro* rooting of Jalapa (*Mandevilla illustris*) (Vell.) R. E. Woodson

Mandevilla illustris (Apocynaceae) is an endemic species of the Cerrado, popularly known as Jalapa or Jalapa the field, used in folk medicine due its therapeutic properties. The xylopodium is cathartic and bark and latex are used in the asepsis of cutaneous lesions and against warts. Currently, this species is at

risk of extinction due to predatory extractive collection. This work was optimizing a procolo viable for *in vitro* rooting of *M. illustris* and thus enable the production of seedlings on a commercial scale that could be used to recover parts or as a source of raw material for the pharmaceutical industry. In the early experiments used plants already established *in vitro* under different treatments. The experiments were: 1) Effect of residence time of the seedlings in the presence of NAA and IBA, 2) Effect of different concentrations and types of polyamines; 3) Effect of auxin and polyamine and 4) Effect of Dithiothreitol (DTT). In all experiments using the medium MS/2 liquid and assessments were performed on the percentage of rooted plants, number and length of root and formation of callus. The best results

were obtained in the first experiment, where 70% of the seedlings when they remained embedded for fifteen days in the presence of 1 mgL⁻¹ NAA. Highest average for number and length of roots were also obtained in this treatment. In all other experiments, the percentage of rooting was lower, as well as other characteristics. There was observed the formation of callus that could compromise the *in vitro* rooting. The medium MS/2 liquid supplemented with NAA and alternation in length of stay of the seedlings in their presence, can be considered an efficient method to promote *in vitro* rooting of *M. illustris*.

KEYWORDS: Medicinal plant, Cerrado, extinction.

INTRODUÇÃO

Mandevilla illustris (Apocynaceae) é uma planta medicinal endêmica do Cerrado, conhecida popularmente como jalapa ou jalapa-do-campo, muito utilizada devido suas propriedades medicinais, e por isso, vem sendo coletada indiscriminadamente pela população, como também por laboratórios farmacêuticos para a fabricação de medicamentos, podendo ser extinta. O xilopódio é purgativo e a casca e o látex são usados nas assepsias de úlceras e contra verrugas (Almeida *et al.*, 1998). Franzoi, *et al.*, (2003), testaram a atividade antinoceptiva de derivados do ácido caféico isolado de *M. illustris* e comprovaram a atividade antiinflamatória, analgésica, antifúngica, antibacetrano e antioxidante. Como a técnica da micropropagação possibilita a produção de mudas em larga escala, podendo atender a demanda de matéria prima, requerida pela indústria farmacêutica, como também solucionar o problema de extinção, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente para o enraizamento *in vitro* de *M. illustris*, para posterior produção de mudas em escala comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte de explantes para os experimentos foram utilizadas plântulas já estabelecidas *in vitro*, as quais foram submetidas a ação de diferentes substâncias que apresentam efeito sobre a formação de raízes adventícias *in vitro*. Os experimentos foram: 1) Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA e IBA; 2) Efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas; 3) Efeito de auxina e poliamina e 4) Efeito do Dithiothreitol (DTT). No primeiro experimento, as plântulas permaneceram por períodos de 5, 10, 15 ou 30 dias em MS/2 líquido (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 0, 1, 2, 4 ou 6 mgL⁻¹ de NAA ou IBA, e posteriormente foram transferidas para o mesmo meio (MS/2) porém sem a adição da auxina.

No segundo experimento, as plântulas foram inoculadas em meio MS/2 líquido suplementado com 0, 1, 5 ou 10 mgL⁻¹ das poliaminas: espermina, espermidina, putrescina e 1,3 diaminopropano. No experimento 3, as plântulas permaneceram em o meio MS/2 líquido suplementado com 1 mgL⁻¹ de NAA + 1, 5 ou 10 mgL⁻¹ de espermina e no experimento 4, as plântulas foram deixadas durante 1 hora em solução de 8 mgL⁻¹ de ágar contendo 0,20 mgL⁻¹ de NAA e depois foram transferidas para o meio MS suplementado com 0; 0,10 ou 0,25 mgL⁻¹ de DTT. Em todos os experimentos, os meios foram suplementados com 30gL⁻¹ de sacarose e o pH foi ajustado para 6,01 antes da autoclavagem. Todos os experimentos foram conduzidos em Delineamento Experimental Inteiramente Casualizado (DIC) e todos os tratamentos foram compostos por 6 repetições e 5 cubetas/parcela. As avaliações foram realizadas aos 30 dias quanto a porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz e formação de calos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alternância do tempo de permanência das plântulas de *M. illustris* na presença de diferentes concentrações de NAA, aumentou consideravelmente o número de plântulas enraizadas. No primeiro experimento, apenas 10% das plântulas enraizaram, quando cultivadas em meio sem a suplementação da auxina. A adição de 1 mgL⁻¹ de NAA no meio, com tempo de permanência de 15 dias, foi a melhor condição para o enraizamento *in vitro*, onde mais de 70% das plântulas apresentaram raízes (Tabela 1). Não houve diferença estatística significativa para número de raiz, quando as plântulas permaneceram em 0, 2 e 4 mgL⁻¹ de NAA, mas somente para as concentrações 1 e 6 mgL⁻¹ de NAA. Quando avaliou-se o comprimento das raízes, observou-se que houve diferença estatística significativa para todas as concentrações testadas (1, 2, 4 e 6 mgL⁻¹) e somente o controle, foi não significativo. Sabe-se que as plântulas possuem um certo nível endógeno de auxina, que pode auxiliar na indução de raízes adventícias, quando submetidas à presença de auxinas exógenas, por pequenos períodos (McCown, 1988, Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a espécie *M. illustris*, notou-se que, mesmo no tratamento controle, ou seja, o meio sem a presença de auxina, algumas plântulas enraizaram; o que pode ser devido ao nível de auxina endógena nestas plântulas. No entanto, este percentual foi de enraizamento foi baixo (10%), porque o nível endógeno de auxina pode não ter sido suficiente para que as plântulas apresentassem um número de raiz satisfatório com um comprimento adequado; sendo necessário a presença de auxina exógena no meio de enraizamento. Assim como a maior porcentagem de plântulas enraizadas, ocorreu quando estas permaneceram durante 15 dias em 1 mgL⁻¹ de NAA, o maior número e comprimento de raiz também foi obtido nestas mesmas condições (Figuras 1 e 2). Como existe uma relação entre a necessidade de auxinas exógenas e as fases dependentes e/ou não dependentes de auxina para o crescimento de raízes, a condição ótima de enraizamento, é obtida quando se encontra a melhor relação entre a concentração testada e o tempo de permanência das plântulas neste regulador (Figuras 1 e 2). Contudo, além da concentração, o tipo de auxina empregada no meio de cultura é um dos fatores que também exerce efeito direto sobre a indução de raízes *in vitro*. A maior parte dos trabalhos de enraizamento *in vitro*, utilizam as auxinas NAA e IBA, devido a estabilidade em relação a outros fitorreguladores, como por exemplo o IAA. Mas os resultados quanto ao efeito positivo e/ou negativo destas auxinas, variam de modo significativo entre as espécies (Grattapaglia & Machado, 1998; Pasqual, 2001).

A presença de IBA no meio também favoreceu o enraizamento *in vitro* das plântulas (Tabela 1), porém os melhores resultados foram obtidos com o NAA, em uma concentração consideravelmente baixa (1 mgL^{-1}). Quando avaliou-se o efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas no enraizamento *in vitro* de *M. illustris*, os resultados não foram satisfatórios, uma vez que a porcentagem de enraizamento foi relativamente baixa em todos os tratamentos, quando comparado ao primeiro experimento (Tabela 2). Após a seleção da melhor auxina e melhor poliamina nos experimentos realizados anteriormente, realizou-se este experimento associando ambos os compostos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a associação das duas substâncias, também não foi eficiente para promover o enraizamento *in vitro* satisfatório das plântulas. No entanto, as respostas deste experimento, mostraram que a associação das duas substâncias foi mais eficiente do que quando utilizou-se somente as poliaminas. Maior porcentagem de enraizamento (33,3%), ocorreu quando 1 mgL^{-1} de NAA foi associado a 5 mgL^{-1} de espermidina (Tabela 3).

A maior concentração de espermidina, promoveu a menor porcentagem de enraizamento nos dois tempos de avaliação. Isso mostra que as concentrações utilizadas podem estar próximas do nível de toxicidade como foi mostrado nos trabalhos relatados por Sankhla & Upadhyaya (1988), para a espécie *Vigna radiata*. No experimento realizado com DTT, pôde-se observar que houve um estímulo para a formação de raízes adventícias nas plântulas *in vitro*. Maior porcentagem de enraizamento obtidos aos 30 foi de 43% quando utilizou-se $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de DTT (Tabela 4). Segundo Audersert et al. (1997), os compostos fenólicos como os complexos de thiois quando usado sozinho ou em combinação com auxina, são substâncias que têm proporcionado um aumento considerável na indução de raízes, em espécies herbáceas e/ou lenhosas.

Os compostos de thiois, como o DTT, geralmente são empregados quando o interesse é a eliminação de espécies reativas de oxigênio e a neutralização de oxidantes extracelulares (Murina et al., 2005). Em todos os experimentos não observou-se a formação de calos que pudessem comprometer o enraizamento *in vitro* de *M. illustris*. Portanto, pode-se concluir que a espécie *M. illustris* comporta-se de maneira diferente quanto a indução de raízes adventícias *in vitro*, quando submetida a ação de substâncias empregadas para tal finalidade em estudos de cultura de tecidos e a presença da auxina NAA com alternância no tempo de permanência das plântulas em sua presença, foi consideravelmente eficiente para promover o enraizamento *in vitro* da espécie *M. illustris*; quando comparada às outras substâncias avaliadas.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP (Fundação de apoio a pesquisa do estado de São Paulo) e a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP).

LITERATURA CITADA

ALMEIDA SP; PROENÇA CEB; SANO SM; RIBEIRO JF. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina: Embapa-CPAC, 1998. 464p.

AUDERSERT G. Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol. International Journal of Plant Sciences. 158 (2) 132-135, 1997.

FRANZOI CL; ANONINI G; BUZZI FC; et al. Síntese e atividade antinoceptiva de derivados do ácido caféico isolado de rizomas de *Mandevilla illustris* (Apocynaceae). In: VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais Tecnologia e saúde, 2003, São Pedro. Anais...UNESP, 2003.

GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO J. A. Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPIU / Embrapa-CNPQ, 1998, v.1, p.4376.

MCCOWN BH. Adventitious Rooting of tissue Culture Plants. In DAVIA TD; HAISSIG BE; SANKHLA N. Adventitious root formation in cuttings. Portland – Oregon, 1998, v.2 p.289-302.

MURASHIGE T; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.1, p.437-496, 1962.

MURINA AM; et al. Chemiluminescence in a stimulated polymorphonuclear leucocytes – Luminol system: supression by thiols. Biofizija 50 (6): 1101104, 2005.

PADQUAL M. Cultura de Tecidos. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.

SANKHLA A; UPADHYAYA A . Polyamines and adventitious root formation. In DAVIS TD; HAISSIG BE; SANKHLA N. Adventitious root formation in cuttings. Portland – Oregon, 1988, v.2, p.289-302.

Tabela 1. Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA ou IBA, aos 30 dias. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.

Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de NAA		Efeito do tempo de permanência dos explantes em presença de IBA	
Tratamento	% Enraizamento	Tratamento	% Enraizamento
0 - Controle (MS/2)	10 ± 2,797	0 - Controle (MS/2)	16,7 ± 2,996
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	13,3 ± 1,704	1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	13,3 ± 2,727
2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	43,3 ± 3,898	2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	46,7 ± 4,041
3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	73,3 ± 4,024	3 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	16,7 ± 2,515
4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	53,3 ± 3,441	4 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	26,7 ± 3,296
5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	56,7 ± 5,360	5 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	16,7 ± 2,515
6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	43,3 ± 2,515	6 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	13,3 ± 3,895
7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	53,3 ± 4,024	7 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	10 ± 1,808
8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	56,7 ± 3,282	8 - MS/2 + 2 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	30 ± 3,509
9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	43,3 ± 2,515	9 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	30 ± 3,509
10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	56,7 ± 6,479	10 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	23,3 ± 1,388
11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	66,7 ± 2,727	11 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	26,7 ± 5,013
12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	40 ± 2,529	12 - MS/2 + 4 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	30 ± 4,600
13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 5 dias	43,3 ± 3,292	13 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 5 dias	30 ± 4,600
14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 10 dias	50 ± 1,808	14 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 10 dias	20 ± 2,119
15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 15 dias	63,3 ± 4,912	15 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 15 dias	30 ± 2,809
16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de NAA - 30 dias	46,7 ± 4,543	16 - MS/2 + 6 mgL ⁻¹ de IBA - 30 dias	43,3 ± 3,898

Tabela 2 Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações e tipos de poliaminas em meio MS/2, aos 30 dias. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.

Efeito de diferentes concentrações e tipos de poliaminas em MS/2	
Tratamento'	% Enraizamento
0 – MS/2 – controle	0 ± 0
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
2 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermina	0 ± 0
3 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermina	13,3 ± 1,704
4 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	3,3 ± 1,704
5 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	13,3 ± 1,808
6 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	10 ± 1,808
7 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de putrescina	0 ± 0
8 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de putrescina	13,3 ± 1,704
9 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de putrescina	10 ± 1,808
10 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	6,7 ± 1,704
11 – MS/2 + 5 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	6,7 ± 1,704
12 – MS/2 + 10 mgL ⁻¹ de 1,3-diaminoprop.	0 ± 0

Tabela 3. Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de espermidina, associada a 1 mgL⁻¹ de NAA, aos 30 dias. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.

Tratamento	% Enraizamento (30 dias)
0 – controle - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA	26,7 ± 1,756
1 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 1 mgL ⁻¹ de espermidina	30 ± 2,809
2 - MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 5 mgL ⁻¹ de espermidina	33,3 ± 3,454
3 – MS/2 + 1 mgL ⁻¹ de NAA + 10 mgL ⁻¹ de espermidina	23,3 ± 1,388

Tabela 4. Porcentagem de enraizamento de brotações de *Mandevilla illustris* em função de diferentes concentrações de dithiothreitol (DTT), aos 30 dias. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.

Tratamento'	% Enraizamento (30 dias)
0 – MS	33 ± 3,453
1 – MS + 0,10 mgL ⁻¹ DTT	33 ± 2,744
2 - MS + 0,25 mgL ⁻¹ DTT	43 ± 2,515

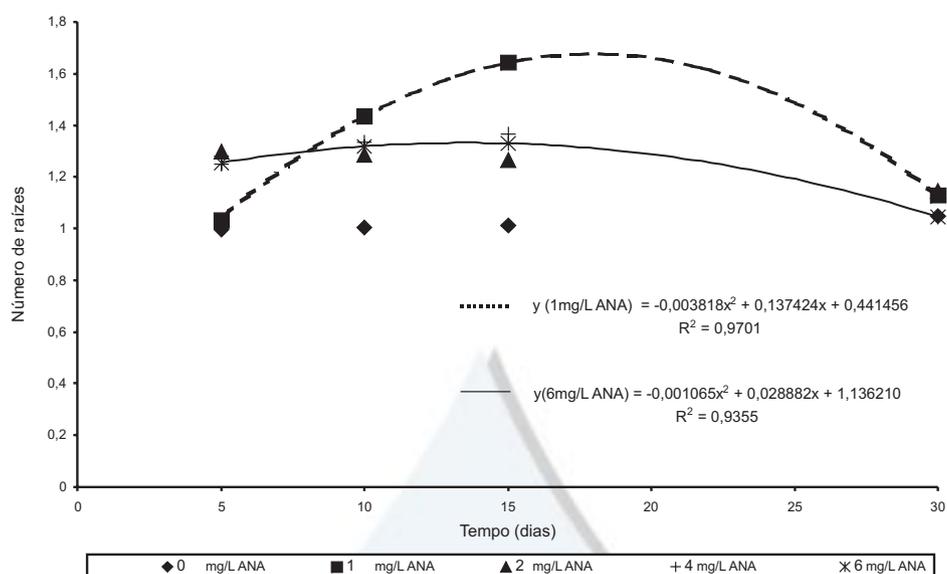
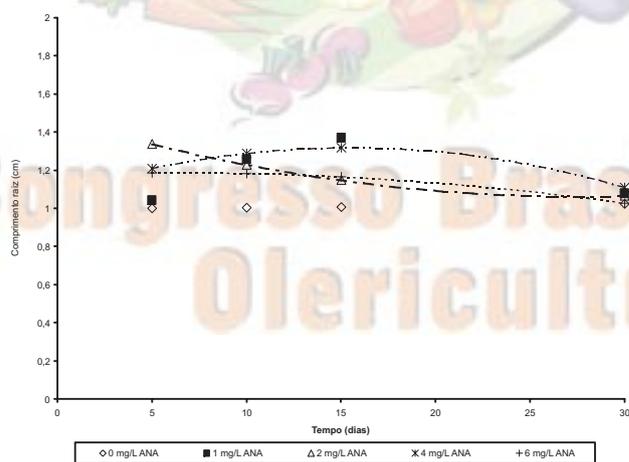


Figura 1. Número de raiz de plântulas de *Mandevilla illustris* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias. (Number of roots of seedlings of *Mandevilla illustris* depending on length of stay (days) at different concentrations of NAA (mgL^{-1}), 30 days. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.



$y (\text{NAA } 1 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,002093 x^2 + 0,74720 x + 0,721132$	$R^2 = 0,9992$
$y (\text{NAA } 2 \text{ mg.L}^{-1}) = 0,000545 x^2 - 0,029993 x + 1,475041$	$R^2 = 0,6218$
$y (\text{NAA } 4 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,000992 x^2 + 0,030781 x + 1,078793$	$R^2 = 0,8085$
$y (\text{NAA } 6 \text{ mg.L}^{-1}) = -0,000280 x^2 + 0,003472 x + 1,175211$	$R^2 = 0,6456$

Figura 2. Comprimento de raiz (cm) de plântulas de *Mandevilla illustris* em função do tempo de permanência (dias) em diferentes concentrações de NAA (mgL^{-1}), aos 30 dias. (Length of root (cm) of seedlings of *Mandevilla illustris* depending on length of stay (days) at different concentrations of NAA (mgL^{-1}), 30 days. UNAERP, Ribeirão Preto - SP, 2007.