Efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos de *Ginkgo biloba* L.

Mantovani, Nilton[1]; Grando, Magali Ferrari[2], Otoni, Wagner Campos[3], Grison, Tobias Pizzato[4]

[1]Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Botânica (UFV), Campus Universitário.CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, fone (31) 3899-2519, email: mantovani.nilton@gmail.com; [2]Professora do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo (UPF), Campus Universitário, Caixa Postal 661, CEP 99001-970, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, fone (54) , email: magali@upf.br, [3] Professor da Universidade Federal de Viçosa (UFV), email: wotoni@ufv.br; [4]Acadêmico do curso de Agronomia (UPF), email: tobiasgrison@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

Ginkgo biloba L., é uma gimnosperma lenhosa, que sintetiza valiosos metabólitos, os glicosídeos flavonóides (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) e as lactonas terpênicas (ginkgolídeos e bilobalídeo) (Van Beek et al., 1998). Estes metabólitos são amplamente utilizados na medicina, em função de suas propriedades terapêuticas, que estão relacionadas à regulação da circulação sanguínea e proteção contra radicais livres (O'Reilly, 1993). Estes compostos são acumulados nas folhas, cascas, e nas raízes de ginkgo (Yu et al., 1999).

As indústrias farmacêuticas têm explorado o potencial medicinal dos compostos extraídos principalmente das folhas do ginkgo, através da produção de extratos padronizados. No entanto, a possibilidade de produzir *in vitro* os compostos medicinais de *G. biloba,* em calos e suspensões celulares, tem despertado o interesse por pesquisas nesta área (Carrier et al., 1991; Balz et al., 1999; Yu et al., 1999; Kang et al., 2006).

Os efeitos de diferentes fatores físico-químicos, no crescimento de calos de ginkgo foram investigados por Yu et al. (1999), porém, pouca atenção tem sido dada aos efeitos do tipo de carboidrato na produção de calos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos carboidratos sacarose, glicose, frutose, galactose e maltose, no desenvolvimento de calos de *G. biloba,* produzidos a partir de explantes foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e obtenção dos explantes: folhas expandidas de plantas-matrizes adultas de *G. biloba*, cultivadas em casa de vegetação, foram utilizadas como fontes de explantes. Em condições assépticas, as folhas foram desinfestadas com etanol 70% (v/v) por 1 minuto e água sanitária 50% (v/v) por 10 minutos, e em seguida enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada, para a obtenção dos explantes. Discos foliares de 6mm de diâmetro, e segmentos de pecíolos de 10mm de comprimento, foram utilizados como explantes para a indução de calos.

Os explantes foram inoculados em placa de Petri descartáveis de poliestireno (90 X 15 mm), vedadas com filme de PVC, contendo alíquotas de 25 ml de meio de cultura.

Fase de indução de calos: calos foram induzidos em explantes foliares, cultivados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose (87,6 mM), mio-inositol (100 mgL^{-1}), Agar (7,0 gL^{-1}), 2,4D (1,0 mgL^{-1}) e KIN (0,1mgL^{-1}), com pH 5,7.

Para avaliar os efeitos de diferentes carboidratos no desenvolvimento de calos, foram testados os carboidratos sacarose, glicose + frutose, galactose, e maltose, na concentração de 87,6 mM, adicionados ao meio de cultura MS, especificado na fase anterior.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 repetições (placas de Petri) por tratamento, e cada repetição constituída de 4 calos, com peso inicial de 200 mg cada um, totalizando 800 mg de calo por repetição.

Os calos foram pesados a cada 21 dias, e subcultivados no mesmo meio de cultura. No final de 3 subcultivos, a massa fresca (mg), e a taxa de crescimento (mg), dos calos foram determinadas. As culturas foram mantidas à temperatura de 25 ± 2 ºC, sob

fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 36 µmol m^2s^{-1}, na fase de indução e desenvolvimento dos calos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a folha bilobada característica (Figura 1 A), os tipos de explantes (Figura 1 B, C e D), utilizados na indução de calos em *G. biloba*, e a seqüência do processo calogênico (Figura 1 E – H).

A formação de calos foi observada inicialmente como proliferações celulares nas margens dos discos foliares, geralmente associadas às nervuras (Figura 1 E e F) e nas extremidades dos segmentos de pecíolo (Figura 1 G). Aos 30 dias de cultivo os calos formados foram separados dos explantes primários e subcultivados por mais 30 dias no mesmo meio.

Calos de coloração branco-amarelada, e estrutura friável (Figura 1 H), se desenvolveram nos explantes, nos diferentes tratamentos contendo sacarose, glicose + frutose, galactose, ou maltose, na concentração de 87,6 mM, após 3 subcultivos.

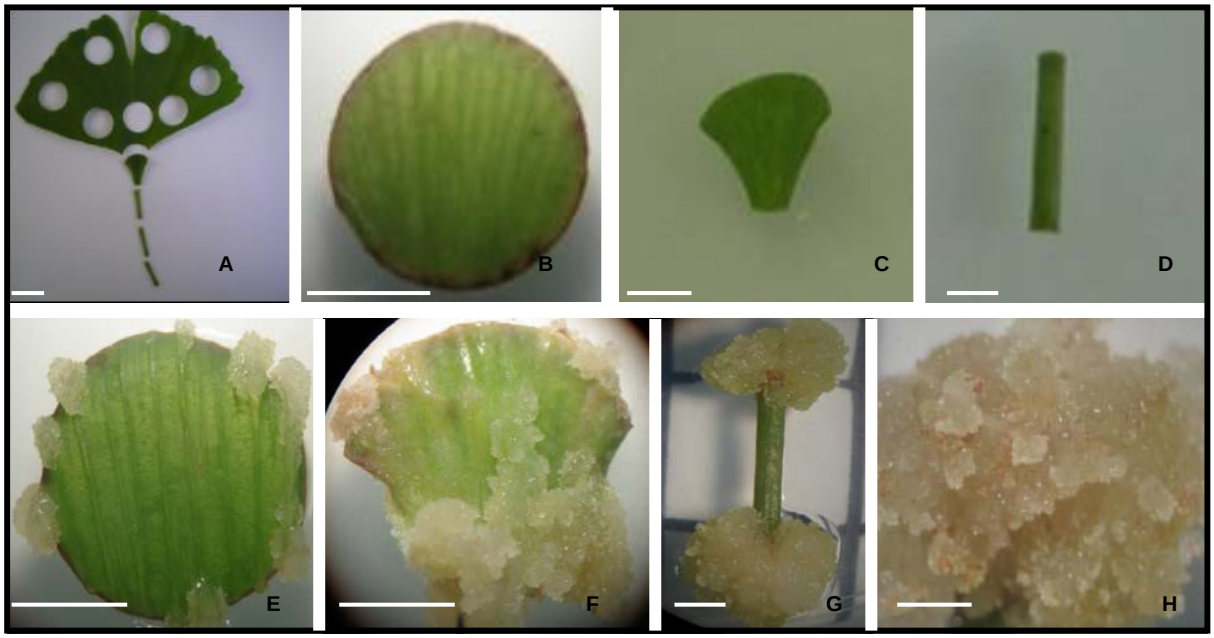

Figura 1 – Tipos de explantes utilizados na indução de calos e seqüência do processo calogênico em *G. biloba.* Folha (A), disco foliar (B), disco foliar com parte do pecíolo (C), segmento de pecíolo (D), início do processo calogênico (E, F e G), calo padrão, branco-amarelado friável (H). Barras = 6,0 mm (A), 3,0 mm (B – H).

O desenvolvimento dos calos foi influenciado pelo tipo de carboidrato no meio de cultura (Figura 2). A sacarose foi o carboidrato que proporcionou maior crescimento médio dos calos (394,57 mg), em relação à massa fresca, em três subcultivos. A maltose e a galactose não diferiram estatisticamente, e proporcionaram menor crescimento dos calos que a mistura de glicose mais frutose.

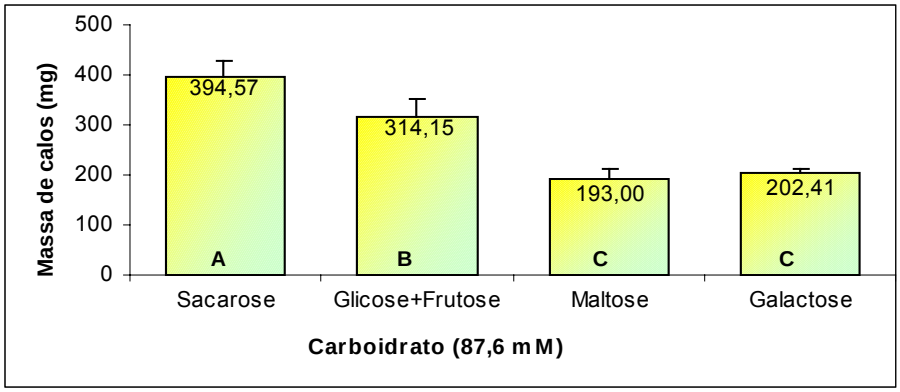

Figura 2 – Média da massa fresca de calos, em 3 subcultivos, no meio de cultura MS, suplementado com 2,4D (1,0 mgL^{-1}) e KIN (0,1mgL^{-1}) e diferentes carboidratos. Colunas com letras iguais, indicam que as médias não diferem pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Barras verticais indicam desvios das médias.

A avaliação do comportamento das taxas de crescimento dos calos (Figura 3), indica que a sacarose, além de proporcionar maior crescimento médio dos calos, manteve a produção de massa fresca, em taxas crescentes em 3 subcultivos. Os demais carboidratos proporcionaram taxas decrescentes de crescimento ao longo deste período.

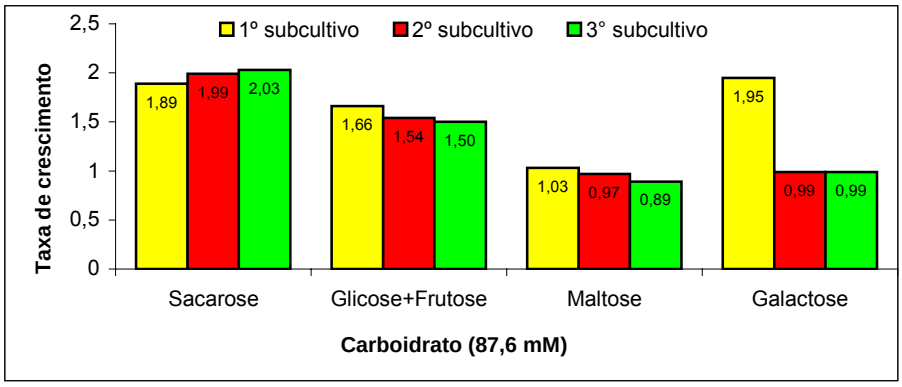

Figura 3 – Taxas de crescimento dos calos, em 3 subcultivos, no meio de cultura MS, suplementado com 2,4D (1,0 mgL^{-1}) e KIN (0,1mgL^{-1}) e diferentes carboidratos.

CONCLUSÃO

A sacarose é o carboidrato mais indicado para o desenvolvimento de calos de *G. biloba*, induzidos em explantes foliares em meio de cultura MS suplementado com 2,4D (1,0 mgL^{-1}) e KIN (0,1mgL^{-1}). A sacarose na concentração utilizada (87,6 mM), induziu a maior produção de massa fresca de calos, e manteve crescente suas taxas de crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALZ, J.P., COURTOIS, D., DRIEU, J. DRIEU, K., REYNOIRD, J.P., SOHIER, C., TENG, B.P., TOUCHÉ, A., PÉTIARD, V. Production of Ginkgolides and Bilobalide by *Ginkgo biloba* plants and tissue cultures. **Planta Medica**. v. 65, n. 7, p.620-626, 1999.

CARRIER, D.J., CHAURET. N., MANCINI, M., COULOMBE, P., NEUFELD, R., WEBWER, M., ARCHAMBAULT, J. Detection of ginkgolide A in *G. biloba* cell cultures. **Plant Cell Rep***.* v. 10, p. 256-259, 1991.

KANG, S.M., MIN, J.Y., KIM, Y.D., KANG, Y.M., PARK, D.J., JUNG,H.N., KIM, S.W., CHOI, M.S. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of bilobalide and ginkgolides in cell cultures of *Ginkgo biloba.* ***In vitro*** **Cell. Dev. Biol. – Plant.** v. 42, p. 44-49, 2006.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum,** v.15, p. 473-497, 1962.

O'REILLY, J. Ginkhgo biloba – cultivation, extraction, and therapeutic use of the extract. In: VAN BEEK T.A., BRETELER, H. (Eds). **Phytochemistry and Agricultue.** Clarendon Press, Oxford, p.253-270, 1993.

VAN BEEK, T.A, BOMBARDELLI, E., MORAZONI, P. PETERLONGO,F. *Ginkgo biloba* L. **Fitoterapia**, v.69, p. 195-244, 1998.

YU, R.M., ZHAO, H., ZHENG, Y. YAO, X., ZHANG, H. Studies on the callus cultures of *Ginkgo billoba* and its metabolites-Ginkgolides. **Chinese Journal of Biotechnology,** v.15, n.1, p.51-58, 1999.

PALAVRAS-CHAVES: *Ginkgo biloba* L; calogênese, carboidratos, massa fresca, taxa de crescimento