

**CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE *GINKGO BILOBA*<sup>1</sup>**  
***IN VITRO* CULTURE SOOT-TIPS OF *GINKGO BILOBA***

**Paloma Alves da S. Sexto\***

**Magali F. Grando\*\***

**Alexandre Augusto Nienow\*\***

**Delvino Nolla\*\***

**Lizete Augustin\*\***

**\*Engenheira Agrônoma Mestra. Professora do Instituto de Desenvolvimento  
Educativo do Alto Uruguai (IDEAU).**

[palomasexto@ideau.com.br](mailto:palomasexto@ideau.com.br)

**\*\* Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo.**

[magali@upf.br](mailto:magali@upf.br)

**RESUMO**

A *Ginkgo biloba* é uma árvore ornamental e medicinal originária da Ásia. O extrato de folha contém composições de princípios ativos utilizados pela indústria farmacêutica como ginkgolides, bilobalides e flavonóides. A dioiccia e o reduzido número de exemplares disponíveis justificam o desenvolvimento de técnicas de reprodução vegetativa. A micropropagação é uma técnica empregada para multiplicação *in vitro* de inúmeras espécies florestais e medicinais, permitindo a produção de grande número de exemplares em espaço físico e tempo reduzido. Este estudo objetivou avaliar o comportamento de ápices caulinares obtidos de estacas herbáceas durante o cultivo *in vitro*, visando a micropropagação dessa espécie. Os ápices foram cultivados em meio de cultura WPM com diferentes reguladores de crescimento BAP (0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>), ANA (0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e GA<sub>3</sub> (0 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso com dez repetições. Aos 30 e 60 dias de cultivo, avaliou-se o desenvolvimento de brotações, formação de calos, frequência e diâmetro dos calos organogênicos. Os ápices caulinares produziram brotações em meio de cultura sem reguladores de crescimento. No meio de cultura contendo BAP, houve a formação de calos em 100% dos ápices. Os meios contendo a combinação de BAP (1 ou 2 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) produziram porcentagem superior de calos organogênicos (80%) aos 30 dias de cultivo, quando comparado ao meio sem reguladores de crescimento. A adição de GA<sub>3</sub> ao meio não teve efeito positivo na indução de calos com nódulos

---

1 Parte da dissertação do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal.

meristemáticos. Os tratamentos influenciaram o diâmetro dos calos. Aos 60 dias de cultivo, a média de calos organogênicos foi de 44,5%, sendo que os calos desenvolvidos em meio com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP mantiveram-se verdes e saudáveis por mais tempo.

**Palavras-chave:** *Ginkgo biloba* L., cultura de tecidos, calogênese, plantas medicinais.

## ABSTRACT

The *Ginkgo biloba* is an ornamental and medicinal tree from the Asian continent. The leaf extract produces important active principles pharmaceutical components, such as ginkgolides, bilobalides and flavonols. The condition of dioecious plants and the reduced number of available samples justify the development of alternatives reproduction techniques. Micropropagation is a technique used for *in vitro* multiplication of many wood and medicinal species in a short period of time and space. The present study aimed to evaluate the behavior of herbaceous branches derived shoot-tips during the *in vitro* culture, for micropropagation of this specie. The shoot-tips were cultivated on culture media WPM with different growth regulators BAP (0,5; 1,0 and 2,0 mg L<sup>-1</sup>), ANA (0 and 0,1 mg L<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> (0 and 0,5 mg L<sup>-1</sup>). It was used the randomized blocks experimental design with ten replications. At 30 and 60 days of cultivation, it was evaluated the development of the explants, callus formation, frequency and diameter of organogenic callus. The shoot-tips produced shoots on the culture medium without growth regulators. However, the presence of BAP induced the formation of callus in 100% of shoot-tips. The supplemented media whit a combination of BAP (1 or 2 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), produced superior percentages of organogeneses callus (80%) in the 30 days of culture, when compared to the medium without growth regulators. The addiction of GA<sub>3</sub> on culture medium did not effect positively the induction of callus with meristematic nodal. The treatments influenced the callus diameter. At 60 days of culture, the average of organogenic callus was 44,5% and the callus developed in the presence of 2mg L<sup>-1</sup> of BAP were maintained green and healthy for a longer period of time.

**Keywords:** *Ginkgo biloba* L., tissue culture, callus, medicinal species.

## INTRODUÇÃO

A ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) é uma gimnosperma de origem asiática, sendo a única espécie viva pertencente à família Ginkgoaceae (TESKE, 1995). Esta espécie é utilizada mundialmente pela medicina popular e pela indústria fitoterápica por apresentar propriedades medicinais. Os flavonóides, ginkgolides e bilobalides encontrados nessa espécie podem ser utilizados nos tratamentos de insuficiência cardiovascular, redução de memória, problemas circulatórios, renais, perdas auditivas, desordem cognitiva, senilidade e regulação da circulação cerebral (Curtis-Prior et al.,

1999). O extrato de ginkgo também tem sido indicado para reduzir o progresso da doença de Alzheimer (BIRKS et. al., 2002).

Esta espécie apresenta dificuldades de propagação através de métodos vegetativos e, por ser uma espécie dióica, requer plantas masculinas e femininas para formação de sementes. A multiplicação dessa espécie pelo uso da cultura de tecidos surge como uma alternativa para contornar estes problemas.

O primeiro relato de regeneração de plantas de *Ginkgo biloba*, visando a micropropagação, foi realizado por Chu et al. (1987), a partir de ápices caulinares de plântulas germinadas *in vitro*. A obtenção de plantas completas regeneradas *in vitro* a partir de explantes obtidos de plantas adultas, não tem sido ainda relatada. Ápices caulinares obtidos de estacas lenhosas não têm se mostrado útil para iniciar o cultivo *in vitro* devido a grande quantidade de contaminações e lento desenvolvimento dos explantes (SEXTO, 2005; MANTOVANI, 2007).

Na literatura, existem relatos quanto à produção de calos de ginkgo a partir de embriões e tecidos cotiledonares, cultura de células e raízes para extração de ginkgolides *in vitro* (BALZ et. al., 1999), cultivo de ápices caulinares com desenvolvimento de folhas e brotações, mas sem a obtenção de plantas completas (MONTÉZ-LÓPEZ & RODRÍGUES DE LA O., 2001; MANTOVANI et. al., 2007a) e regeneração de plantas a partir de ápices caulinares obtidos de plântulas germinadas *in vitro* (TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004). Sucesso na micropropagação de *Ginkgo biloba* a partir de explantes obtidos de plantas adultas não tem sido ainda relatado na literatura.

Dessa forma, visando estabelecer no futuro um protocolo básico para a micropropagação de *Ginkgo biloba*, objetivou-se avaliar a resposta *in vitro* de ápices caulinares obtidos de estacas herbáceas cultivados em meio de cultura básico WPM suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento BAP, ANA e GA<sub>3</sub>.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo-RS. Estacas herbáceas de 1,5 cm de

comprimento, obtidas de matriz jovem de cinco anos de idade, cultivada em solo e ambiente não protegido, foram desinfestadas com álcool 70% por 5 minutos, imersas em uma solução de 1,5% hipoclorito de sódio contendo gotas de tween 20 por 20 minutos, seguida de três enxágües com água destilada/deionizada e autoclavada.

Os ápices caulinares contendo aproximadamente 0,3 cm de comprimento foram excisados com auxílio de lupa estereomicroscópica e cultivados em meio básico WPM (Wood Plant Medium) (LLOYD & McCOWN, 1980), com sete variações na concentração de reguladores de crescimento BAP (0, 1 e 2 mgL<sup>-1</sup>); ANA (0 e 0,1 mgL<sup>-1</sup>) e GA<sub>3</sub> (0 e 0,5 mgL<sup>-1</sup>) e foram mantidos em câmara de crescimento, no escuro a 25 ± 2° C. As culturas posteriormente foram transferidas para a luz após 5 dias (fotoperíodo de 16 horas luz/dia a 25°C ± 2°C e luminância de ± 25 mmol.m<sup>-2s-1</sup>). O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio contendo um ápice caulinar.

Após 30 dias de cultivo, os explantes e estruturas formadas foram avaliados e subcultivados em meio fresco. Para avaliação da resposta *in vitro*, foram analisados: desenvolvimento do explante; formação e tipo de calo; e diâmetro dos calos organogênicos aos 30 e 60 dias de cultivo. As médias foram submetidas à análise de variância. As frequências de calos foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 30 dias de cultivo, foi observado que os ápices caulinares cultivados em meio WPM sem reguladores de crescimento apresentaram desenvolvimento de meristemas pré-existentes com expansão foliar (Figura 1a), não havendo produção de gemas adventícias e brotações múltiplas. Ainda, os brotos desenvolvidos diretamente do meristema pré-existente neste, não se desenvolveram até o estágio de plântula, mesmo sendo subcultivados a cada 30 dias para meio fresco.

A regeneração *in vitro* de plantas completas de *Ginkgo biloba* tem sido relatada exclusivamente a partir de embriões zigóticos e de plântula germinada *in vitro* (CHU et al., 1987; LAURAIN et al., 1996; HAO et al., 2000; MONTÉZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ DE LA O., 2001; HU et al., 2002; TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004;

CHOI et al., 2003, 2004). No entanto, estes tipos de explantes são de difícil acesso devido ao fato da espécie ser exótica, dióica e com baixa disponibilidade de exemplares no país.

Existem somente três relatos na literatura empregando o cultivo de segmentos nodais e ápices caulinares obtido de plantas adultas objetivando estabelecer o processo de micropropagação, mas sem sucesso na regeneração de plantas completas (MONTÉZ-LÓPEZ & RODRÍGUEZ DE LA O., 2001; TOMMASI & SCARAMUZZI, 2004; MANTOVANI, 2007). Alterações na composição do meio de cultura podem servir de alternativa para indução da morfogênese em explantes oriundos de plantas adultas. Mantovani et al (2007), relatam que o uso de caseína hidrolisada ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ), na fase de isolamento, estimula o crescimento de gemas (85%) e induzem a formação de múltiplos brotos (35%). Quando combinada com KIN ( $0,1$  ou  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) na fase de multiplicação, a caseína induz a formação de brotações múltiplas 41,5% dos propágulos, sendo o primeiro relato de formação de múltiplos brotos, tanto na fase de isolamento como na de multiplicação, a partir de explantes obtidos de plantas adultas em *Ginkgo biloba*.

A presença de BAP no meio de cultura propiciou a formação de calos em 100% dos ápices caulinares, evidenciando assim o efeito do BAP na indução de calos de ginkgo aos 30 dias de cultivo. Da mesma forma, Montéz-López & Rodríguez-de La O (2001), constataram que altas concentrações de BAP no meio de cultura induz a formação de calos na base das brotações de ginkgo obtidas deste mesmo tipo de explante. Hao et al. (2000), também observaram a indução e formação de calos organogênicos em gemas apicais de *Ginkgo biloba* cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS suplementado com variadas concentrações de ANA e zeatina.

Os calos formados nos diferentes tratamentos apresentaram diferenças quanto à cor (branco amarelado e verde) e estrutura (aquoso e compacto nodular). Os calos aquosos apresentaram coloração branco-amarelado com estrutura externa esponjosa e não evoluíram para formar estruturas morfogenéticas, necrosando ao longo dos subcultivos. Os calos que apresentaram nódulos e coloração verde foram considerados como organogênicos (Figura 1b). O calo organogênico apresenta pontos verdes que correspondem a centros meristemáticos capazes de regenerar plantas (NABORS et al., 1983 apud GRANDO, 2002) e o calo aquoso é feito de tecido translúcido, granular e macio, incapaz de regenerar plantas (WELTER et al., 1995 apud MANTOVANI, 1997).

Os pontos verdes que se desenvolvem nos calos podem corresponder a centros meristemáticos com capacidade de regenerar plantas e, portanto, podem ser chamados de organogênicos (NABORS et al., 1983 apud GRANDO, 2002).

Aos 30 dias de cultivo, os meios contendo a combinação de BAP (1 ou 2 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), produziram porcentagem superior de calos organogênicos (80%), quando comparado ao meio sem reguladores de crescimento (Figura 2). Desta forma, observou-se que a combinação citocinina (BAP) e auxina (ANA) foi efetiva na formação de calos organogênicos em *Ginkgo biloba*. A adição de GA<sub>3</sub> no meio auxiliou na indução desse tipo de calo. Quando utilizada somente a adição de BAP ao meio, o mesmo mostrou-se pouco eficiente na formação de calos organogênicos. A frequência média de calos aquosos formados a partir dos ápices caulinares foi de 5,7%, e a de calos necrosados foi de 30% não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

Passados 60 dias de cultivo, a porcentagem de calos organogênicos foi de 44,5%, calos aquosos foi de 20,2% e a de calos necrosados foi de 24,5% (Figura 3). Embora o teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância não tenha indicado diferença significativa na frequência de calos organogênicos, o meio suplementado com 2mg L<sup>-1</sup> de BAP apresentou 85,7% deste tipo de calos, sendo que os mesmos mantiveram-se verdes e organogênicos por mais de 60 dias.

Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Huetteman & Preece (1993), onde a presença de altas concentrações de citocininas no meio induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. Estudos realizados por Martins et al. (2001), demonstraram que ápices caulinares de ginkgo inoculados no meio de cultura WPM suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, promoveu a indução de calos organogênicos.

Os tratamentos utilizados neste experimento influenciaram no diâmetro dos calos. Calos maiores foram observados em meio contendo combinação dos três reguladores (BAP, ANA e GA<sub>3</sub>). Mantovani et al. (2007b), relataram a importância da auxina ANA na formação de calos a partir de discos foliares e segmentos de pecíolos, sendo que a presença do BAP não influenciou neste processo. No entanto, calos mantidos na presença de auxina se mantiveram friáveis e com coloração branco - amarelados, enquanto que na presença de auxina e citocinina, os calos se tornaram compactos e de cor verde, destacando a importância da combinação de reguladores de crescimento no desenvolvimento dos mesmos.

## CONCLUSÃO

O desenvolvimento de brotos e obtenção de calos organogênicos relatados no presente experimento indicam a possibilidade de estabelecimento do processo de micropropagação a partir de ápices caulinares oriundos de estacas herbáceas de plantas jovens de *Ginkgo biloba*.

## AGRADECIMENTOS

À Engenheira Agrônoma MSc. Marilei Suzin, bem como ao Engenheiro Florestal Dr. Nilton Mantovani, pelas contribuições na execução e condução do trabalho e a professora Dileta Cecchetti pelo auxílio nas análises estatísticas.

## REFERÊNCIAS

BALZ JP; COURTOIS D; DRIEU J.; DRIEU K; REYNORD JP; SOHIER C; TENG BP; TOUCHÉ A; PÉTIARD V. 1999. Production of ginkgolides and bilobalides by *Ginkgo biloba* plants and tissue culture. **Planta Medica**, 65: 20-626.

BIRKS J; GRIMLEY EJ; VAN DONGEN M. 2002. *Ginkgo biloba* for cognitive impairment and dementia. Oxford: **Update Software** (4). 30: 1-53. Disponível em: [http:// www.updateusa.com/abs/titlelist.htm](http://www.updateusa.com/abs/titlelist.htm). Acessado em: 22 de dezembro de 2010.

CHU M; SKIRVIN R; JOUNG H. 1987. Micropropagation of shoots of *Ginkgo biloba*. **Hortscience**, United States, 22, p. 93.

CURTIS-PRIOR P; VERE D; FRAY P. 1999. Therapeutic value of *Ginkgo biloba* in reducing symptoms of decline in mental function. **J Pharm Pharmacol** 51:535-541.

GRANDO MF; FRANKLIN CI; SHATTERS RG. 2002. Optimizing embryogenic callus production and plant regeneration from 'Tifton 9' bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) seed explant for genetic manipulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, [S.I.], 17, 3, p. 213-222.

HAO G; DU X; YOU Y; et al. 2000. Effects of various factors on the growth and development of cultured axillary buds of *Ginkgo biloba in vitro*. **Forest Research**, England, 13, 2, p. 217-221.

HUETTEMAN CA; PREECE JE. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, 33, 2, p. 105-119.

LLOYD G; MCCOWN B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined proceedings of international plant propagators society**. Seattle, 30: 21-427.

MANTOVANI NC. 1997. **Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.)**. Santa Maria: UFSM. 106 p (Tese mestrado em Engenharia Florestal).

MANTOVANI NC; GRANDO MF; OTONI WC; GRISON TP; REGINATO FH; AUGUSTIN L; SUZIN M. 2006. Morfogênese e regeneração *in vitro* de *Ginkgo biloba* L. **Horticultura Brasileira** 24: 231.

MANTOVANI NC. **Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** Viçosa, MG. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, 2007.

MANTOVANI NC; GRANDO MF. Padrões de desenvolvimento de gemas caulinares *in vitro* X *in vivo* de *Ginkgo biloba* L. 2007a. **Revista Brasileira de Biociências** 5: 594-596.

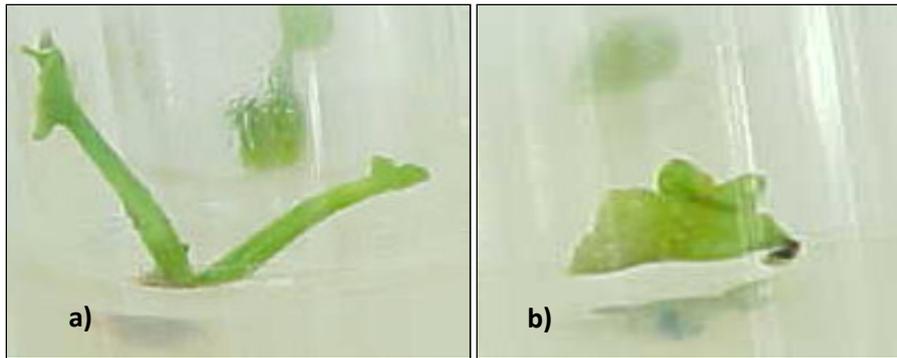
MANTOVANI NC; GRANDO MF; OTONI WC; REGINATO FH; AUGUSTIN L; SUZIN M; GRISON TP; COSTA GM. 2007b. Avaliação da Produção de Metabólitos Secundários em Calos de *Ginkgo biloba* L. In: **Anais... 47º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA E IV SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CUCURBITÁCEAS**, Porto Seguro. Horticultura Brasileira 25: p. 5-6.

MARTINS L.O; AUGUSTIN L; SUZIN M; NOLLA D. 2001. Micropropagação em *Ginkgo biloba*. In: **Anais... MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**. Passo Fundo. Resumos... p. 236.

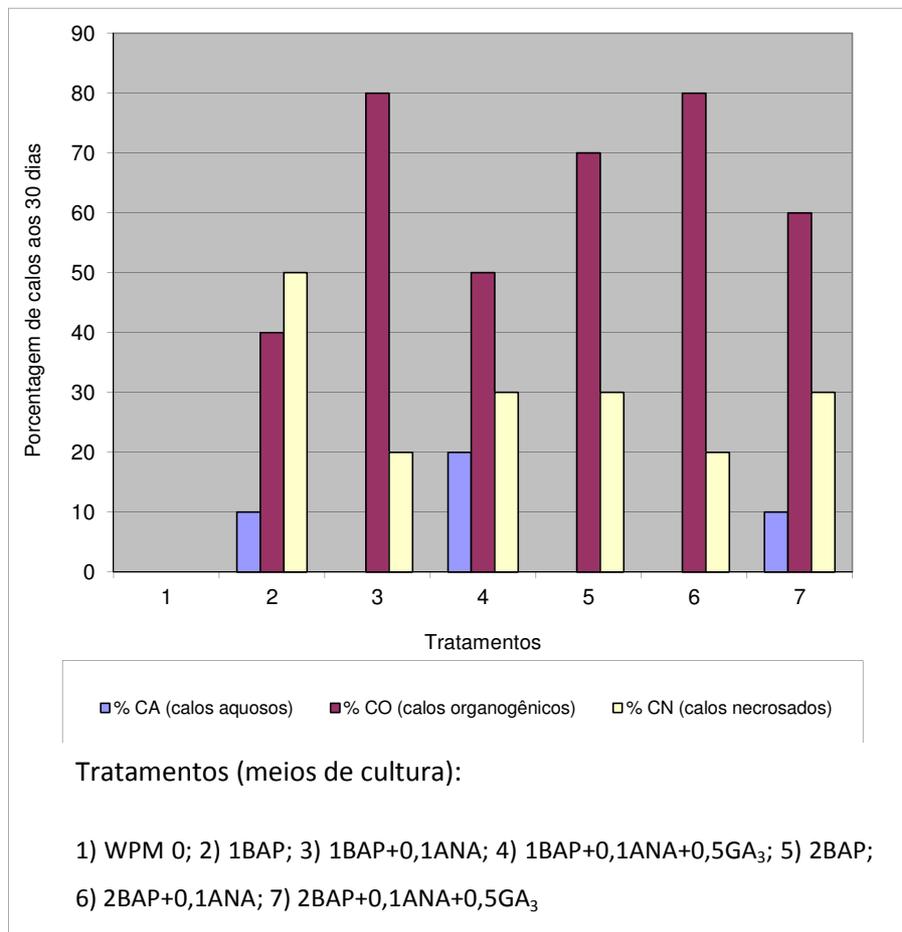
MONTÉZ-LÓPEZ J.J; RODRÍGUEZ DE LA O. 2001. Establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de *Ginkgo* (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Chapingo Série Horticultura**, 7: 49-59.

SEXTO P. A. DA S. 2005. **Cultivo *in vitro* e estaquia de *Ginkgo biloba* L.** Passo Fundo: UPF. 210 p (Dissertação mestrado em Agronomia).

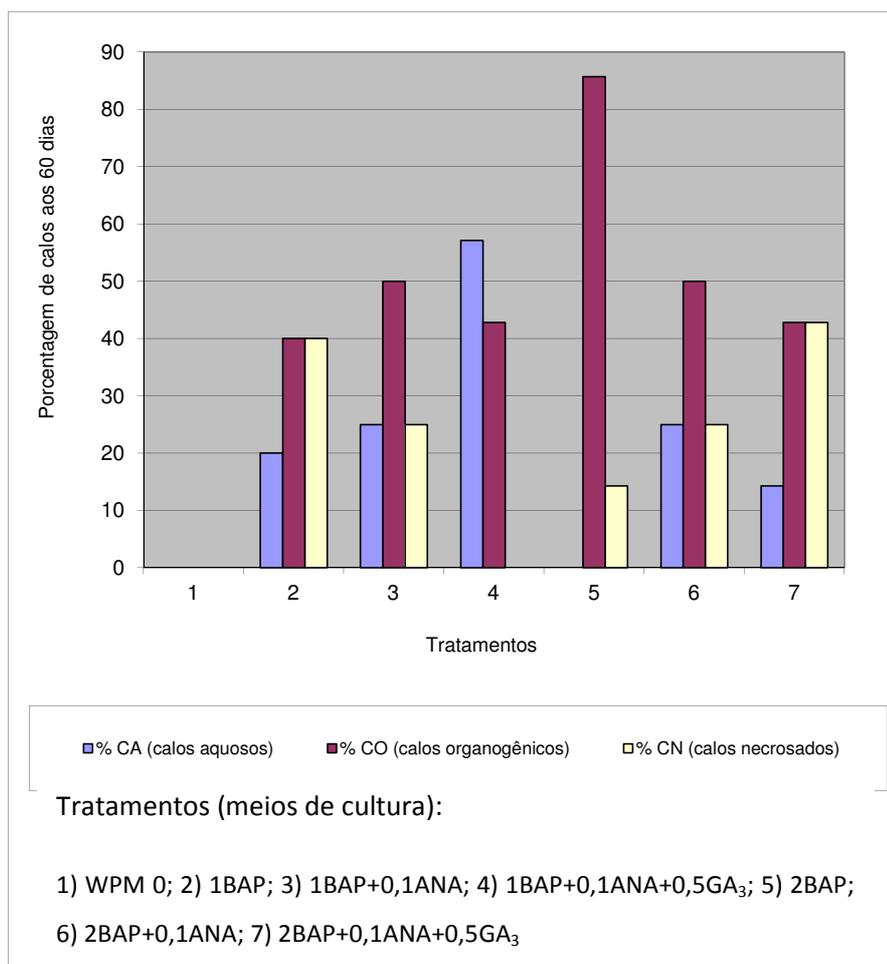
TOMMASI F; SCARAMUZZI F. 2004. *In vitro* propagation of *Ginkgo biloba* by using various bud cultures. **Biology Plantarum**, 48, 2: 297-300.



**Figura 1.** Brotação e calogênese em ápices caulinares de *Ginkgo biloba* cultivados *in vitro*. a) brotação em meio WPM sem reguladores de crescimento; b) calo organogênico observado aos 30 dias de cultivo. (Development of the explants and callus formation on shoot-tips of *Ginkgo biloba* cultivated *in vitro*. a) development on WPM medium without growth regulators; b) organogenesis callus observed to the 30 days of *in vitro* culture) (FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003).



**Figura 2.** Porcentagem de calos organogênicos, aquosos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. (Percentage of organogenesis callus, water and necrosed formage by shoot-tips of *Ginkgo biloba* to the 30 days of *in vitro* culture on differents trataments of WPM medium) (FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003).



**Figura 3.** Porcentagem de calos organogênicos, aquosos e necrosados formados a partir de ápices caulinares de *Ginkgo biloba* aos 60 dias de cultivo *in vitro* em diferentes tratamentos do meio WPM. (Percentage of organogenesis callus, water and necrosed formage by shoot-tips of *Ginkgo biloba* to the 60 days of *in vitro* culture on differents trataments of WPM medium). (FAMV/UPF, Passo Fundo-RS, 2003).