

RESPOSTA À REGENERAÇÃO E CRESCIMENTO DE BROTOS *IN VITRO* DE *Kielmeyera coriacea* QUANDO INFLUENCIADO POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS SAIS E DE SACAROSE

IN VITRO REGENERATION AND GROWTH RESPONSE OF *Kielmeyera coriacea* SHOOTS WHEN AFFECTED BY SALTS AND SUCROSE CONCENTRATIONS

José Eduardo Brasil Pereira Pinto¹ Eduardo Fonseca Arelló² César Augusto Brasil Pereira Pinto³
Márcio Henrique Pereira Barbosa⁴

RESUMO

Avaliaram-se diferentes concentrações de sacarose e sais do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) na regeneração e crescimento de brotos de *Kielmeyera coriacea in vitro*. A redução e o aumento da quantidade de sacarose partindo de 30 e 45g/L, respectivamente, causou um decréscimo no número total de brotos. O uso integral ou da metade das concentrações dos sais do MS proporcionou maiores taxas de multiplicação. A maior porcentagem de brotos com mais de 1,0cm de comprimento pôde ser obtida empregando-se 30 g/l de sacarose associado a concentração 1/1 do MS. A porcentagem média de brotos decresceu linearmente com a diluição salina.

Palavras-chave: *Kielmeyera coriacea*, micropropagação, sacarose, sais, meio MS.

SUMMARY

Trials were carried out to test sucrose and salt concentrations added to growth medium on regeneration and growth response of *Kielmeyera coriacea* shoots. The reduction and increase of sucrose of 30 and 45g/l, respectively, caused a decrease in total number of shoots. A higher shoots percentage of with more than 1.0cm, occurred on media with 30g/L of sucrose.

The use of total force (1/1) and half strength (1/2) of MS salt proportioned a higher shoot ratio and growth.

Key words: *Kielmeyera coriacea*, micropropagation, sucrose, salts, MS medium.

INTRODUÇÃO

Kielmeyera coriacea Martius é uma espécie vegetal típica do cerrado. Apresenta grande interesse econômico para produção de madeira, carvão, celulose, tanino para indústria de couros e placas para revestimento acústico (SOUZA, 1947; SADDI, 1982). É considerada também como planta medicinal pelas suas propriedades cercaricidas (LOPES et al., 1977). Com a expansão agrícola dos cerrados, *K. coriacea* vem sendo vítima de uma exploração predatória tornando-se extinta em muitas regiões.

A propagação via semente tem sido o método predominantemente usado nesta espécie; entretanto, isto concorre para o desenvolvimento lento e para a grande desuniformidade genética das plantas. Por

¹ Professor Titular, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Bolsista do CNPq. Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, MG. Autor para correspondência.

² Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Departamento de Agricultura, UFLA.

³ Professor Titular, Departamento de Biologia, UFLA. Bolsista do CNPq.

⁴ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., doutorando no Curso de Fitotecnia da UFLA. Bolsista do CNPq.

outro lado, a alternativa de propagação vegetativa de indivíduos superiores via cultura de tecidos parece ser uma ferramenta de grande potencial para se obter elevadas taxas de multiplicação (THORPE & BIONDI, 1984).

De um modo geral, a propagação *in vitro* de espécies florestais tem sido empregada com muito sucesso (BAJAJ, 1986; ABDULLAH et al., 1989; DUSTAN & THORPE, 1986; DEBERGH & ZIMMERMANN, 1991). Contudo, poucos trabalhos vem sendo feitos em cultura de tecidos com *K. coriacea*. ARELLO & PINTO (1993) citam o primeiro trabalho sobre o estabelecimento e multiplicação de brotos de *K. coriacea in vitro* utilizando combinações de citocininas e auxina.

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), com as quais, através das investigações experimentais, conduzem para a determinação de protocolos ideais de micropropagação. Entretanto, na ausência de informações prévias do cultivo *in vitro* de espécies vegetais, GEORGE & SHERRINGTON (1984), sugerem, inicialmente, para a escolha do meio de cultura, avaliar experimentalmente a utilização do meio MS completo e modificado com as concentrações salinas reduzidas a 1/2 e 1/4.

Outra variável importante para o crescimento e o desenvolvimento organizado dos explantes é a fonte de energia na forma de carboidrato. Sabe-se que a atividade fotossintética *in vitro* é limitada devido a baixa luminosidade (LAKSO et al., 1986) e pequena troca de gás (ZIV, 1986). Uma fonte suplementar de carboidrato tal como a sacarose, é importante para suportar o crescimento e diferenciação *in vitro*, embora outros compostos (pentoses e hexoses) possam ser utilizados. MUKHERJEE et al. (1991), utilizando glicose ou frutose no meio de cultura, observaram melhor indução na regeneração de brotos do que pela utilização da sacarose. Além disso, também relatam que a concentração de carboidrato afeta marcadamente a regeneração de brotos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta morfogênica do tecido cultivado *in vitro* de *K. coriacea* em meio suplementado com diferentes concentrações de sais e sacarose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os explantes constituíram-se de segmentos nodais provenientes de brotações de plantas obtidas *in vitro*, sendo que eles foram seccionados de modo que o comprimento ficasse em torno de 1,0cm.

Utilizou-se meio de cultura (MS) descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962). As concentrações dos sais inorgânicos foram 1/1, 1/2 e 1/3, representando o MS completo, MS com as concentrações salinas reduzidas a metade e a um terço respectivamente. As concentrações de sacarose empregadas foram 15, 30, 45, 60 e 75g/l, respectivamente para cada nível de concentração de sais inorgânicos, resultando num delineamento fatorial 3x5. Os demais componentes do meio permaneceram constantes. O meio de cultura foi ainda enriquecido de 0,5mg/l de benzilaminopurina (BAP), conforme sugere ARELLO & PINTO (1993).

As brotações foram colocadas para desenvolver em tubos de ensaio (25 x 150mm) com 10ml de meio de cultura. Os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob condições ambientais controladas, tais como, fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e intensidade de $50\mu\text{mol/s/m}^2$.

Empregou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo 3 tubos de ensaio por repetição. Os dados coletados foram submetidos a análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1% e 5% para o teste de F. Quando o modelo empregado na análise de regressão não explicou a variação dos dados, considerou-se para efeito de apresentação dos resultados que $\hat{Y} = Y$, ou seja, as estimativas são as próprias médias das variáveis quantitativas. Para atender às pressuposições para realização da análise estatística, os dados para a variável porcentagem de brotos foram transformados para $\text{arc. sen}(x + 0,5)^{0,5}$.

A avaliação foi feita aos 45 dias de cultura após a inoculação dos explantes. As características avaliadas foram o número total médio de brotações produzidas e a porcentagem média de brotações com mais de 1,0cm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações testadas de sacarose e sais mostraram interação significativa para a produção total de brotações. Já para a porcentagem de brotos com mais de 1,0cm, apenas os fatores considerados separadamente apresentaram efeitos significativos.

Observa-se pela Figura 1 o comportamento do número médio de brotos para os níveis de sacarose e sais empregados. De modo geral o maior número médio de brotos pôde ser obtido com o emprego de 30 a 45g/l de sacarose associado ao uso das concentrações salinas integrais ou reduzidas à metade. Nota-se também pela Figura 1 que o uso de 1/3 das concentrações normais de sais no meio proporcionou acentuada redu-

ção no número de brotos na faixa de 30 a 45g/l de sacarose.

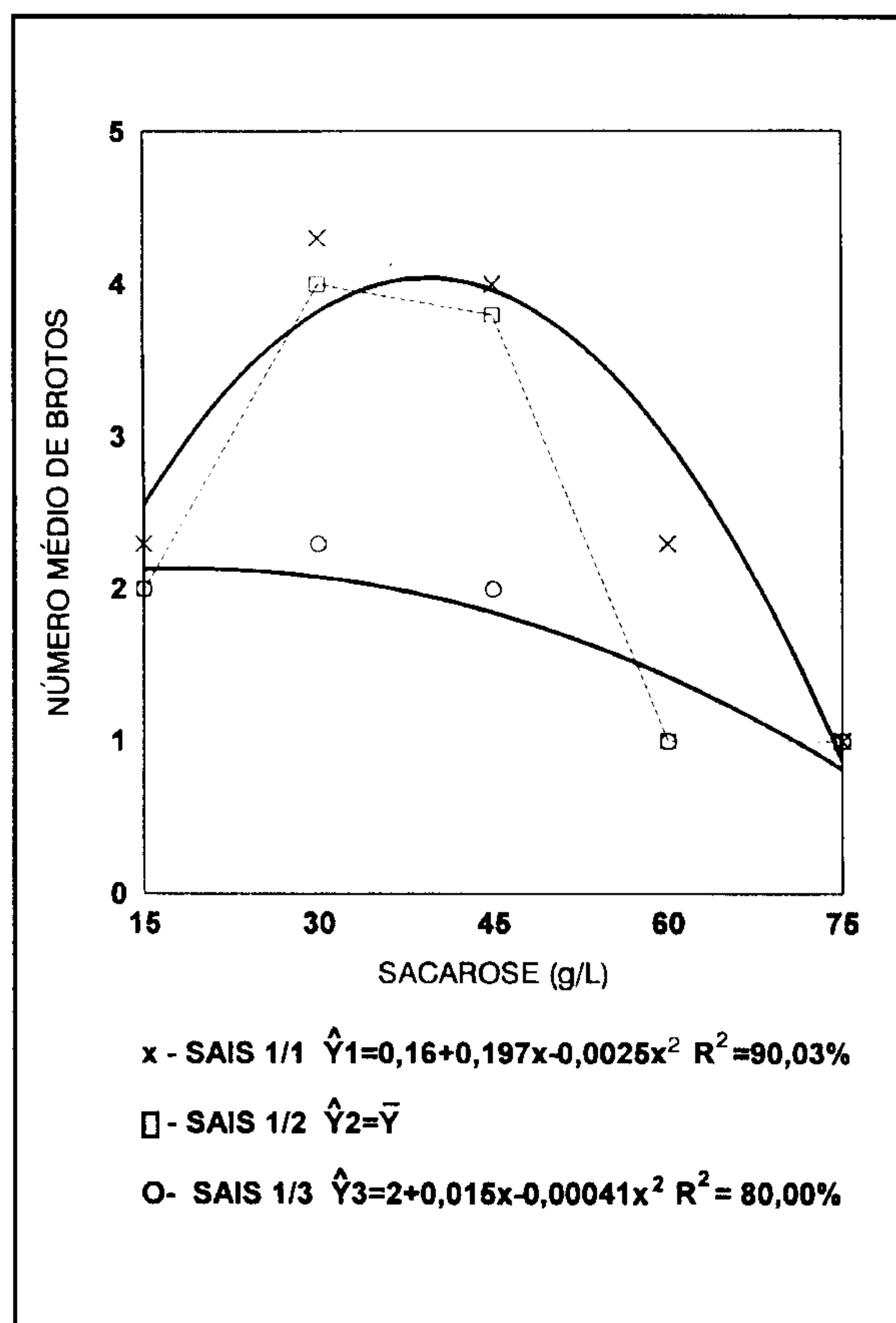


Figura 1. Número médio de brotações produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio MS modificado, acrescido de 0,5mg/l de BAP e em diferentes concentrações de sais e sacarose.

Os dois níveis de sacarose que se salientaram (30 e 45g/l), quanto a regeneração de brotos, mostram suprir as necessidades dos explantes em termos de energia e carbono, principalmente quando os sais do meio aparecem em concentrações não inferiores à metade daquela original, proposta por MURASHIGE & SKOOG (19620). Pela Figura 1 observa-se que a resposta ao açúcar aumenta em termos de organogênese até o nível de máxima eficiência técnica de 39,4 e o nível de 30g/l de sacarose, respectivamente para as concentrações de sais 1/1 e 1/2, após os quais há uma redução no número de brotações. Confrontando-se os níveis de 15g/l de sacarose com os de 30 e 45g/l de sacarose observa-se que reduziu-se praticamente à me-

tade o número médio de brotos. Este resultado é semelhante àquele apresentado por MORINI et al. (1992) para *Prunus cerasifera*, onde mostra que houve uma redução na proliferação de brotações, quando a sacarose passou de 30g/l para 15g/l. De outra forma há possibilidades inclusive de obter crescimento *in vitro* mesmo quando a fonte de energia é reduzida ou omitida. LANGFORD & WAINWRIGHT (1987) mostraram crescimento *in vitro* de rosas quando aumentou-se o nível de CO₂ e luz com o intuito de substituir o carbono fornecido através da sacarose no meio de cultura.

As concentrações mais elevadas de sacarose (60 e 75g/l) apresentaram efeitos negativos no número e porcentagem média de brotos (Figuras 1 e 2). Além disso, provocaram necrose nos explantes com posterior morte dos mesmos antes que houvesse qualquer tentativa de se desenvolverem e proliferarem. As altas concentrações de sacarose poderiam estar provocando um forte gradiente osmótico entre o explante inoculado e o meio que o contém, fazendo com que o material vegetal se desidratasse.

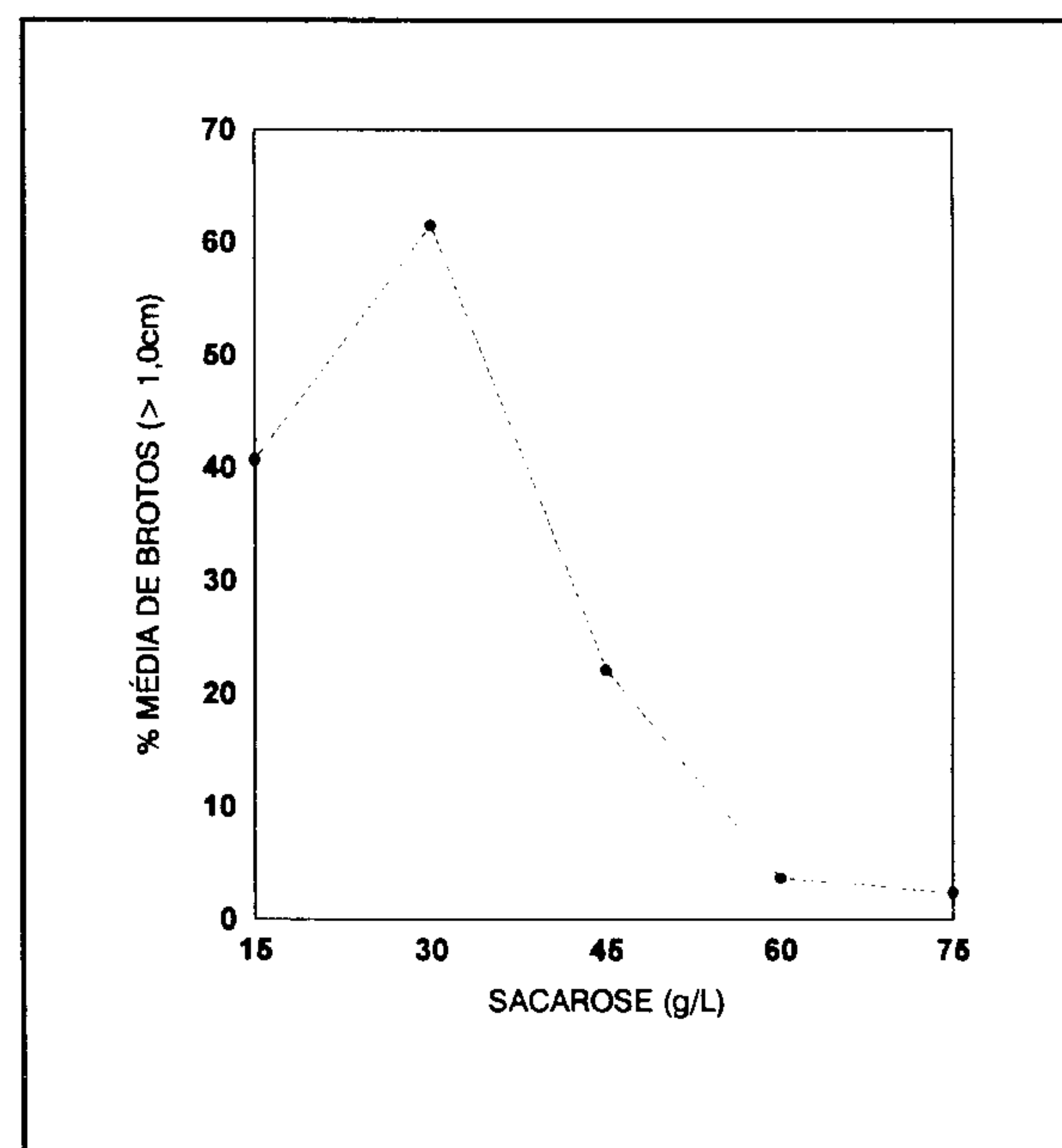


Figura 2. Porcentagem média de brotações com mais de 1,0cm produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio MS modificado, acrescido de 0,5mg/l de BAP e em diferentes concentrações de sacarose.

O crescimento das brotações foi negativamente influenciado pela redução ou aumento concentração de sacarose no meio (Figura 2). Nota-se pela Figura 2 que a maior porcentagem média de brotos, 61,5% foi obtida com 30g/l de sacarose. De modo se-

melhante, MORINI et al. (1992) mostram que a redução de sacarose de 30g/l para 22,5g/l, 15g/l e 7,5g/l causou uma inibição progressiva e remarcável no crescimento das brotações. Com 15g/l o peso fresco e peso seco foram reduzidos pela metade.

A porcentagem média de brotos maiores que 1,0cm foi significativamente afetada pela salinidade do meio. O meio MS, somente quando usado em sua plenitude em termos de sais, possibilitou obter um maior percentual de brotações, decrescendo linearmente com as diluições empregadas (Figura 3). Sabe-se que o meio MS é um dos mais completos não só em qualidade como, também, em quantidade de sais. É por isso considerado um meio rico e mais concentrado que os já conhecidos meios de DE FOSSARD (1974), de SCHENK & HILDEBRANDT (1972) e o "Woody Plant Medium" de SMITH & McCOWN (1983), largamente utilizados na micropropagação de várias espécies florestais.

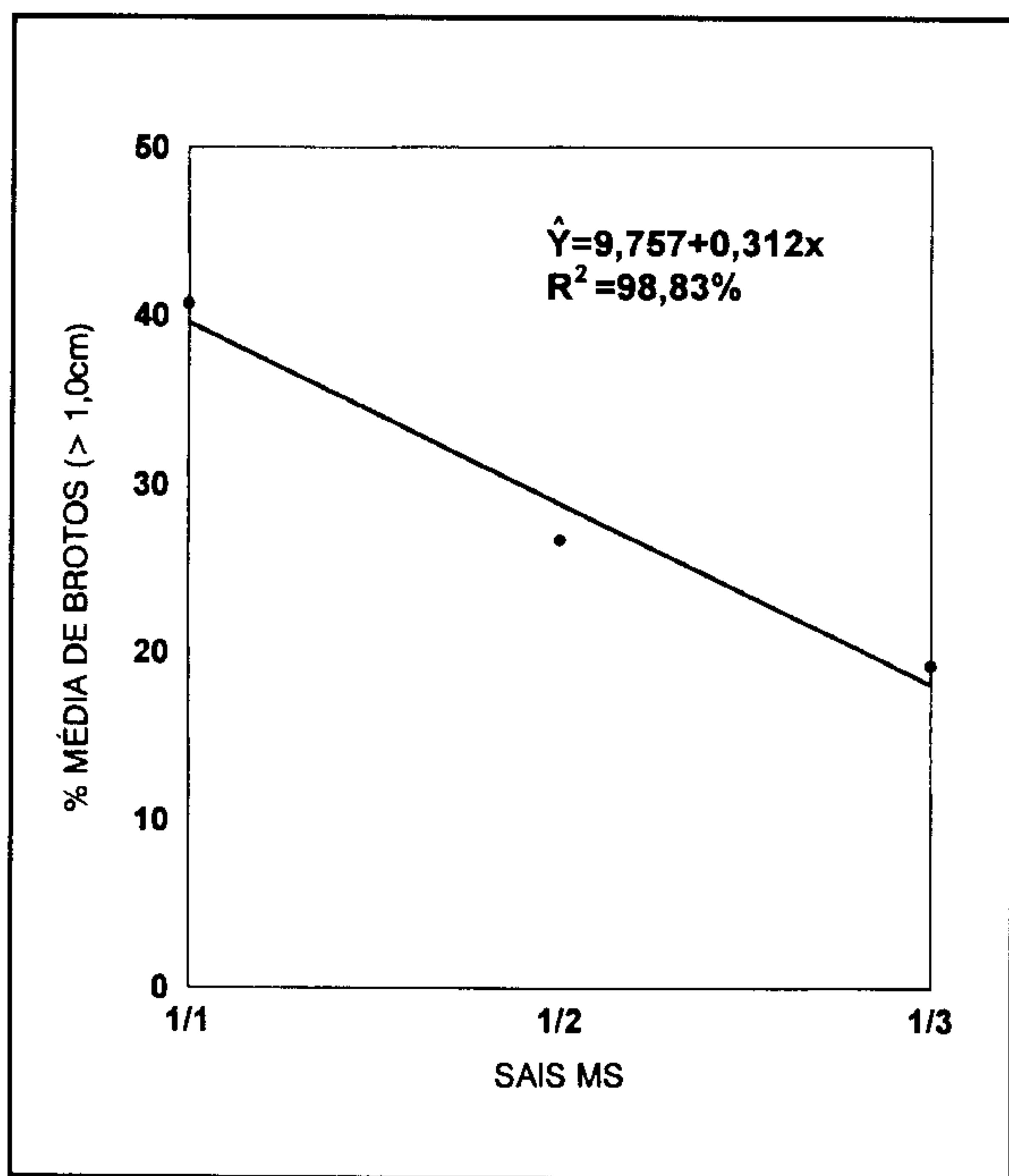


Figura 3 - Porcentagem média de brotações com mais de 1,0cm produzidas através da cultura *in vitro* de segmentos nodais de plântulas de *Kielmeyera coriacea* Martius, em meio MS modificado, acrescido de 0,5mg/l de BAP e em diferentes concentrações de sais.

CONCLUSÕES

- A utilização de 30g/l de sacarose apresenta efeito benéfico à proliferação e crescimento de brotos de *Kielmeyera coriacea*.

- O uso integral ou da metade das concentrações dos sais do MS proporciona resultados ótimos na proliferação *in vitro* de *K. coriacea*, ao passo que para maior porcentagem média de brotos a utilização das concentrações salinas originais do MS deve ser preferida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F., PINTO, J.E.B.P. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 1, p. 25-31, 1993.
- ABDULLAH, A.A., YEOMAN, M.M., GRACE, J. Calabrian pine (*Pinus brutia* Tenore). In: BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry - Tree II*, v. 5. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 1989. p. 507-525.
- BAJAJ, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry - Tree I*, v. 1. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 1986. 514 p.
- DEBERGH, P.C., ZIMMERMANN, R.H. *Micropropagation - Technology and Application*. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 1991. 484 p.
- DE FOSSARD, R.A. Tissue and organ culture of *Eucalyptus ficifolia*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, New Zealand, v. 4, n. 2, p. 267-278, 1974.
- DUSTAN, D.I., THORPE, T.A. Regeneration in forest trees. In: VASIL, I.K. (Ed.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics in Plants*. Vol. 3, New York: Academic Press, 1986. p. 223-241.
- GEORGE, E.F., SHERRINGTON, P.D. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Basingstoke: Eastern Press, 1984. p. 184-283.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*, Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433 p.
- LAKSO, A.N., REISCH, B.I., MORTENSEN, J., et al. Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer culture. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 111, p. 634-638, 1986.
- LANGFORD, P.J., WAINWRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, New York, v. 60, p. 633-640, 1987.
- LOPES, J.L.C., LOPES, J.N.C., GILBERT, B. et al. Osajanthrone from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, Elmsford, v. 16, n. 7, p. 1101-1110, 1977.
- MORINI, S., SCIUTTI, R., FORTUNA, P. *In vitro* growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 28, p. 245-248, 1992.
- MUKHERJEE, S.K., RATHINASABAPATHI, B., GUPTA, N. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 25, p. 13-16, 1991.

- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- SADDI, M. A new combination in *Kielmeyera (Guttiferae)*. U. Kingdom, University of Reading, 1982, 105 p., PhD. Thesis.
- SCHENK, R.V., HILDEBRANDT, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dycotyledonous plant all cultures. **Canadian Journal of Botany** Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.
- SMITH, M.A.L., McCOWN, B.H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. **Plant Science Letters**, Limerik, v. 28, n. 2, p. 149-156, 1983.
- SOUZA, F.P. **Tecnologia de Produtos Florestais**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1947. 409 p.
- THORPE, T.A., BIONDI, S. Conifers. In: SHARP, W.R., EVANS, D.A., AMMIRATO, P.V. et al., (Eds.) **Handbook of Plant Cell Culture**. Vol. 2, New York: MacMillan, 1984. p. 435-470.
- ZIV, M. *In vitro* handling and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A., ALDERSON, P.G. (Eds.). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications**. London: Butterworths, 1986. p. 187-196.

Ciência Rural, v. 26, n. 1, 1996.