

CULTIVO *IN VITRO* DE GLOXÍNIA EM MEIO MS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FITORREGULADORES

IN VITRO MICROPROPAGATION OF GLOXINIA IN MS MEDIUM WITH DIFERENTS CONCENTRATIONS OF GROW REGULATORS

Luciana Nogueira LONDE¹; Elisângela Rodrigues FIGUEIRA²; Alcione da Silva ARRUDA³; Ana Maria BONNETI⁴; Denise Garcia SANTANA⁵

RESUMO: Foram analisadas as concentrações do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para o cultivo *in vitro* de *Sinningia speciosa* (gloxínia) em escala comercial, variando-se as proporções de ANA e BAP com a finalidade de obter o meio adequado. A micropropagação foi feita a partir de matrizes doadas pela Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, as quais foram submetidas a vários subcultivos e, posteriormente, aos tratamentos testando-se concentrações de 0,00; 0,40; 0,80; 1,60 mgL⁻¹ de BAP em combinação com ANA nas concentrações 0,00; 0,50; 0,75; 1,25 mgL⁻¹, para os meios MS 50% e 100%. O experimento foi conduzido em esquema fatorial, com delineamento inteiramente casualizado e 5 repetições. O meio MS 50% foi o mais eficiente para o enraizamento, enquanto que em meio MS 100% obteve-se maior número e comprimento das brotações. A adição de auxina aos meios promoveu a presença de calos e a perda de plântulas por contaminação ou por não diferenciação tissular não foi constatada.

UNITERMOS: *Sinningia speciosa*, Micropropagação, Planta ornamental

INTRODUÇÃO

A cultura de tecido vegetal pressupõe técnicas que visam obter plantas a partir de explantes, os quais podem ser meristemas, partes da folha, raízes, caules, anteras ou protoplastos (MANTELL et al., 1994). Dentro do cultivo *in vitro* a micropropagação, é uma técnica importante para os programas de melhoramento, já que possibilita a produção em massa de clones considerados superiores (BRAGA et al., 1997) e, em âmbito comercial, a sua importância deve-se ao fato de manter o material livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (TORRES et al., 1998).

Para o sucesso da propagação *in vitro*, é necessário controlar variáveis como a composição do meio de cultura, a origem dos explantes utilizados e, as condições físicas ambientais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Segundo esses autores há necessidade de se definir protocolos diferenciados, pois ocorre muita variabilidade na resposta morfogênica, não apenas entre espécies, mas também dentro de cada genótipos cultivados *in vitro*.

O meio de cultura onde se inoculam os explantes pode conter reguladores de crescimento ou fitohormônios, substâncias que, *in vitro*, regulam o comportamento da planta (RIBEIRO, 1999).

A regeneração de plantas de gloxínia pelo cultivo *in vitro* é realizada utilizando-se segmentos de tecidos foliares, inoculando-se em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado de fitorreguladores de crescimento (HERNANDÉZ; RUBIO, 2002).

No Brasil, com um mercado de flores em expansão, é desejável a maior produção em escala comercial, em função da crescente demanda para flores ornamentais. Nesse sentido, o cultivo *in vitro* poderá auxiliar na expansão de mercado, uma vez que se tem maior produção de plantas em menor tempo, quando comparado à produção convencional, com a vantagem de produzir plantas livres de patógenos (vírus, fungos ou bactérias).

O presente trabalho analisou o meio de cultura MS para o cultivo *in vitro* de *Sinningia speciosa* (Lood) Hiern em escala comercial, sob variadas concentrações de regula-

¹ Mestranda em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia.

² Mestranda em Fitotecnia pela Universidade Federal de Uberlândia.

³ Doutora em Genética e Bioquímica.

⁴ Professora Doutora em Genética, Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

⁵ Professora Doutora do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

dores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético).

MATERIAL E MÉTODOS

Plântulas de gloxínia, *in vitro*, doadas pela Universidade Federal de Lavras – MG, foram subcultivadas a partir de brotos apicais, em condições estéreis, por dois subcultivos em meio MS 100%, para a produção de matrizes doadoras de explantes, os quais foram utilizados nos tratamentos com reguladores de crescimento, após atingirem a altura de, aproximadamente, 1,5 cm.

O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem e, foram distribuídos 15 mL de solução em cada tubo de ensaio.

Após a esterilização dos meios de cultura em autoclave vertical à temperatura de 121°C , sob pressão de 1 atm por 20 minutos, realizou-se a transferência dos explantes, em câmara de fluxo laminar.

Decorridos 45 dias do segundo subcultivo, procedeu-se a seleção dos explantes, os quais foram submetidos aos tratamentos, com diferentes concentrações do meio MS: 50% (metade dos nutrientes) e 100% em combinação com reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético). O BAP foi testado cujas concentrações foram: 0,0; 0,4; 0,8 e $1,6 \text{ mgL}^{-1}$ em combinação com o ANA nas concentrações 0,0; 0,5; 0,75 e $1,25 \text{ mgL}^{-1}$, para ambos os meios de cultura.

Os explantes inoculados foram mantidos em sala de crescimento com temperatura $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 2500 lux, por 45 dias.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial, com delineamento inteiramente casualizado e 5 repetições por tratamento, sendo um tubo de ensaio com um explante por unidade experimental.

Na análise estatística foi utilizado o Teste de Tukey e Regressão Polinomial sendo que os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

As variáveis avaliadas foram: número de brotações e raízes, altura dos brotos, presença de calos e perda de plântulas, em cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após dois subcultivos sucessivos, as plântulas de gloxínia transplantadas produziram novos brotos em quantidades e tamanhos variáveis e em alguns tratamentos, houve a formação de raízes e calos. Não houve perda das plântulas por contaminação ou não diferenciação dos tecidos.

Avaliando-se o número de raízes formadas, observou-se que houve a interação da auxina e meio, como mostra a Tabela 1. O melhor meio para o formação de raízes foi o meio MS 50%, com maior número de raízes em presença de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, no entanto, na concentração de auxina $1,25 \text{ mgL}^{-1}$ o meio MS 100%, formou maior número de raízes.

Ainda, no meio MS 50%, à medida que as concentrações de ANA foram aumentadas de 0,00 até $0,75 \text{ mgL}^{-1}$, observou-se um aumento de, em média, de 22 raízes por explante inoculado. A partir desse limite houve queda no enraizamento nas concentrações avaliadas (Figura 1).

Tabela 1. Número de brotos e raízes de gloxínia produzidos, *in vitro*, em diferentes tratamentos. UFU, Uberlândia/MG, 2002.

ANA (mgL^{-1})	Meio MS	Número de	
		Brotações	Raízes
0,00	50%	1,6457 b	2,7747 a
	100%	7,5012 a	1,7793 a
0,50	50%	7,7473 a	19,5434 a
	100%	11,1134 a	1,6797 b
0,75	50%	13,0096 a	22,8048 a
	100%	9,0235 a	8,9140 a
1,25	50%	9,5234 a	9,5446 b
	100%	7,5429 a	38,9351 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna dentro de cada dose de ANA, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

ANA= Ácido naftaleno acético

BAP= 6- benzilaminopurina

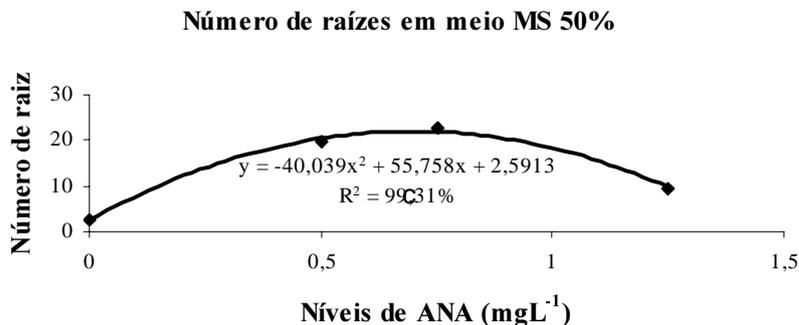


Figura 1. Número de raízes formadas em meio MS 50% com diferentes concentrações de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

Segundo Paiva e Silva (1997) há exigência de auxina no meio para que o enraizamento em plântulas de gloxínia seja induzido, no entanto, Muangkaewn e Chato (1992) enraizaram brotos de gloxínia, *in vitro*, em ausência de

fitorreguladores.

O número de brotações de gloxínia foi influenciado tanto pela concentração de BAP isolado (Figura 2) quanto pela adição de ANA aos meios (Tabela 1).

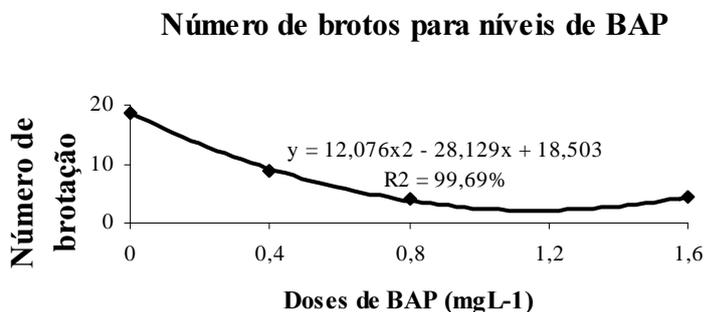


Figura 2. Número de brotos de gloxínia formados em diferentes concentrações de BAP (mgL⁻¹). UFU, Uberlândia/MG. 2002.

Quando analisadas as dosagens de auxina no meio MS 50% (Figura 3) verifica-se acréscimo no número de

brotações de 0,00 até o valor de 0,75 mgL⁻¹ de ANA, com média estimada de 11 brotos produzidos por explante.

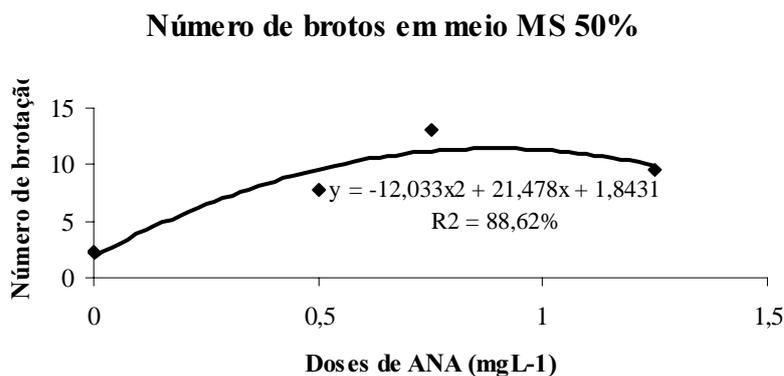


Figura 3. Número de brotações de gloxínia em meio MS 50% em concentrações diferenciadas de ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

Com relação à altura dos brotos verificou-se dependência dos três fatores em estudo, ou seja, houve interação da auxina, da citocinina e do meio. Em meio MS

50%, variando-se as doses de ANA em combinação com BAP, evidencia-se que na ausência desse último ocorre aumento na altura das brotações, em média de 0,57 cm, em

presença de ANA, de 0,00 até 0,75 mgL⁻¹; já para a concentração 0,80 mgL⁻¹ da citocinina, houve decréscimo na altura dos brotos, em média de 1,00 cm, à medida em que a concentração de auxina variava de 0,00 até à concentração de 1,50 mgL⁻¹ (Figura 4). Segundo Skoog e Miller (1957) a formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos

é regulada pela disponibilidade e interação de auxina e citocinina. A presença de auxina no meio isento de citocinina propicia a formação de brotos adventícios e axilares. No entanto, a interação dessas duas classes de reguladores de crescimento anulam os efeitos organogênicos uma da outra.

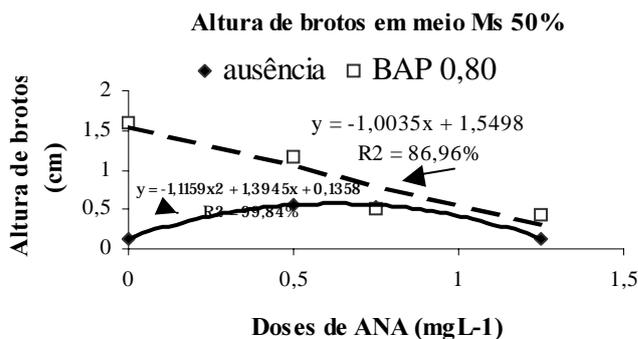


Figura 4. Altura de brotos em meio MS 50% variando as concentrações de BAP em combinação com ANA. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

A altura das brotações não variou para as combinações 0,00 – 0,40; 0,50 – 0,40; 0,50 – 1,60; 0,75 – 0,00; 0,75 – 0,80; 0,75 – 1,60 mgL⁻¹ de ANA e BAP respectivamente e, para todos os tratamentos envolvendo a dosagem de 1,25 mgL⁻¹ da auxina. No entanto, o meio de cultura 50% propor-

cionou maior altura nas seguintes combinações: 0,00 – 0,00 e 0,50 – 0,00, de ANA e BAP respectivamente, enquanto que para as combinações 0,00 – 0,80; 0,50 – 0,80 e 0,75 – 0,40 mgL⁻¹ ANA e BAP, respectivamente, em meio MS 100% proporcionou a melhor altura, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Altura de brotos *in vitro* em diferentes concentrações de meio de cultura variando quantidades de ANA e BAP. UFU. Uberlândia/MG. 2002.

ANA	BAP	MEIO MS	
		50%	100%
0.00	0.00	0.9962 a	0.1335 b
	0.40	0.5750 a	1.1807 a
	0.80	0.4382 b	1.6033 a
	1.60	0.1287 b	0.6762 a
0.50	0.00	1.4244 a	0.5656 b
	0.40	0.5975 a	0.4572 a
	0.80	0.0759 b	1.1583 a
	1.60	0.4394 a	0.3617 a
0.75	0.00	0.6645 a	0.5425 a
	0.40	0.6709 b	1.5259 a
	0.80	0.4758 a	0.4983 a
	1.60	0.4594 a	0.2219 a
1.25	0.00	0.6502 a	0.1377 a
	0.40	0.6083 a	0.4690 a
	0.80	0.1782 a	0.4307 a
	1.60	0.1335 a	0.2195 a

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

ANA= ácido naftaleno acético

BAP= 6-benzilaminopúria

A maior indução dos calos foi verificada em meio MS 100%, com ocorrência em todos os tratamentos independente da concentração do fitorregulador ANA

(Tabela 3). Segundo Paiva e Silva (1997) a presença de ANA, independente da concentração de BAP, induz a formação de calos.

Tabela 3. Número de calos, totais por tratamento, em explantes de gloxínia cultivados em meio MS 100% contendo ANA e BAP em diferentes concentrações (mgL⁻¹). UFU. Uberlândia/MG. 2002.

BAP mgL ⁻¹	0,00	0,40	0,80	1,60
ANA mgL ⁻¹				
0,00	0	0	0	0
0,50	5	5	5	5
0,75	5	5	5	5
1,25	5	5	5	5

ANA= ácido naftaleno acético

BAP= 6-benzilaminopúria

CONCLUSÕES

- O enraizamento, *in vitro*, foi melhor quando metade dos nutrientes do meio MS foi utilizada.
- A concentração de 1,25 mgL⁻¹ de ANA, em meio MS 100%, induziu o melhor enraizamento *in vitro*.
- O maior número de brotações ocorreu em ausência da citocinina, enquanto que a concentração de 0,75 mgL⁻¹ da auxina, em meio MS 50%, proporcionou acréscimo no número de brotos produzidos.
- A melhor altura das brotações foi observada com a concentração de 0,50 mgL⁻¹ de ANA em meio MS 50%, isento de BAP.
- A presença de ANA em todas as concentrações utilizadas, independente da concentração de BAP provocou a formação de calos, em meio MS 100%.
- Verificou-se maior formação de calos em meio MS 100%.
- Em escala comercial, o melhor meio para o cultivo *in vitro* de *Sinningia speciosa* (gloxínia) é o MS 50%, que proporciona maior formação de raízes, garantindo conseqüentemente, melhor aclimação, com gastos reduzidos.

ABSTRACT: To analyzed the adequate culture medium concentration MS for *in vitro* *Sinningia speciosa* (gloxínia) cultivation in commercial scale, varied the growth regulators concentrations BAP and ANA. The micropropagation was made from explants donated by Universidade Federal de Lavras, which ones were going submitted to replications and, afterwards, to the treatments testing the concentrations 0,00; 0,40; 0,80; 1,60 mgL⁻¹ of BAP in association with ANA in the concentrations 0,00; 0,50; 0,75; 1,25 mgL⁻¹, to the medium MS 50% and 100%. The experiment was going installed in factorial outline, with 5 replications. The rooting was better in MS medium 50%, while in MS medium 100% obtained larger shoots number and length. Calluses presence was going observed when it added auxin to the middles and any plants are loss for contamination or for not differentiation by tissues.

UNITERMS: *Sinningia speciosa*, Micropropagation, Ornamental plant

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, M. F.; CALDAS, L. S.; HABE, M. H. Estabelecimento da acerola (*Malpighia Glabra L*) *in vitro*: efeito do clone e do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 335-346. mar. 1997.

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. cap 6, p. 99-169.

HERNANDÉZ, H. J.; RUBIO, L. J. **Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad**. 2002. Disponível em: <<<http://www.uv.mx/iiesca/revista2/acerves2.html>>. Acesso em: 12 abr. 2002.

MANTEL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 333 p.

MUANGKAEWN, A., CHATO, S. *In vitro* micropropagation of gloxínia. **Kaen Kaset Agriculture Journal**, Berlin, v. 20, n. 6, p. 336-342, jan. 1992.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 473-497, apr. 1962.

PAIVA, P. D.; SILVA, A. C. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira Horticultutura Ornamental**, Brasília, v. 3, n. 2, p. 29-41, nov. 1997.

RIBEIRO, A. O. **Definição de meio de cultura para morfogênese indireta em alface variedades Verônica e Maioba**. 1999. 39f. Monografia (Conclusão do curso de graduação em Ciências biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium for society for experimental biology**, Canadian, v. 11, n. 5, p. 118-131, feb. 1957.

TORRES, C. A.; CALDAS, S. C.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 1998. 509p.