

Indução de organogênese em *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) – uma espécie ornamental ameaçada da Chapada Diamantina, Bahia.

Lima-Brito, Alone¹; Vitória, Angela Pierre²; Alvim, Bruno Freitas Matos³; Nepomuceno, Cristina Ferreira⁴; Resende, Sheila Vitória⁵, Santana, José Raniere Ferreira de⁶.

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Caixa Postal 252-294, CEP 44031-460, Feira de Santana, Bahia, fone (75) 3625-2300, email: lima_brito@yahoo.com.br; ²Professora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-600, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, fone (22) 2726-1475, email: apvitoria@uenf.br; ³Bolsista IC/FAPESB - UEFS, email: brunoalvim@hotmail.com; ⁴Bolsista DTI/CNPq/M - UEFS, nepomucenocf@yahoo.com.br ; ⁵Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UEFS, email: svresende@yahoo.com.br; ⁶ Professor da UEFS, email: raniere@uefs.br.

INTRODUÇÃO

A Chapada Diamantina possui uma flora diversificada, com espécies de grande potencial para exploração econômica com fim ornamental. Muitas destas espécies são endêmicas e exploradas de forma extrativista, o que vem causando uma perda genética significativa.

O gênero *Syngonanthus* com cerca de 200 espécies inclui o maior número de sempre-vivas comercializadas como ornamental (Giullietti et al., 1996; Parra, 2000). *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae), com distribuição restrita aos municípios de Mucugê, Abaíra e Rio de Contas, destaca-se pelo grande potencial como alternativa econômica para a região da Chapada Diamantina, BA (Giullietti et al., 1996). É uma espécie herbácea, com cerca de 30cm de altura, apresenta folhas reunidas em rosetas e inflorescências monóicas do tipo capítulo que mantém o aspecto *in natura* mesmo depois de destacadas e secas, razão de serem muito utilizadas para decoração de interiores (Parra, 2000; Ramos, 2005). O alto grau de endemismo associado à coleta extrativista antes do lançamento das sementes no ambiente tem levado essa espécie ao risco de extinção. Apesar da importância econômica, do endemismo restrito e da ameaça de extinção há poucas informações sobre métodos de propagação que possibilitem a utilização comercial, o que torna necessário o desenvolvimento de técnicas que promovam a propagação em larga escala e a sua preservação.

A cultura de tecidos, muito empregada pela indústria ornamental, possibilita a produção de um grande número de plantas a partir de um único indivíduo, podendo ser utilizada como uma alternativa para a multiplicação de *S. mucugensis*.

O processo de multiplicação *in vitro* depende principalmente da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular as auxinas e citocininas, e da habilidade do explante em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (George, 1993; Sugiyama, 1999; Araújo et al., 2005). Os reguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftleno acético (ANA) são mais utilizados na cultura de tecidos pela eficiência dos resultados e baixo custo (Brum et al., 2002).

A germinação *in vitro* de sementes de *S. mucugensis* pode ser obtida em agar (Paixão-Santos et al., 2003) e o seu cultivo, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de sais (MS $\frac{1}{2}$), acrescido de 15g.L⁻¹ de sacarose (Silva et al., 2005; Paixão-Santos et al., 2006). Não foram encontrados na literatura informações sobre a sua multiplicação *in vitro*.

O objetivo deste trabalho é comparar a capacidade organogênica de diferentes tipos explantes de *S. mucugensis* submetidos a tratamentos com os reguladores de crescimento BAP e ANA.

METODOLOGIA

Os explantes foram retirados de plantas estabelecidas *in vitro* com 180 dias de idade. A capacidade organogênica de folha, rizoma e raiz foi testada pela inoculação em tubo de ensaio (150x15mm) contendo 15mL de MS $\frac{1}{2}$, suplementado com 15g.L⁻¹ de sacarose, 6g.L⁻¹ de agar e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e ANA (0,0; 0,5; 1,0mg.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5.7 antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h a 25 ± 2°C e radiação fotossinteticamente ativa de 40 $\mu\text{mol m}^2.\text{s}^{-1}$.

Agradecimentos: FAPESB e Projeto Sempre-viva

Aos 60 dias da inoculação avaliou-se a porcentagem de explantes responsivos e a massa fresca e seca dos calos e calos+brotos. Os brotos obtidos por organogênese direta foram individualizados, medidos e transferidos para MS½; após 60 dias da transferência foi avaliada a porcentagem de sobrevivência dos brotos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x3x3 (explante x BAP x ANA), com dez repetições de 4 amostras por tratamento. A análise dos dados foi feita com o programa software SISVAR v. 4.3 (UFLA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a multiplicação *in vitro* de *S. mucugensis* é influenciada pelo explante e pode ser manipulada pelo balanço auxina/citocinina no meio de cultura.

Tabela 1. Indução de organogênese em *S. mucugensis* a partir dos explantes rizoma e folha em meio suplementado com BAP e ANA.

Reguladores (g.L ⁻¹)		Rizoma			Folha		
BAP	ANA	% de brotos	% de calos	% de brotos+calos	% de brotos	% de calos	% de brotos+calos
0,0	0,0	66	—	—	—	—	—
	0,5	—	—	—	—	—	—
	1,0	—	6	—	—	26	—
0,5	0,0	—	—	90	—	—	—
	0,5	—	—	—	—	—	—
	1,0	—	—	—	—	—	—
1,0	0,0	—	20	20	—	12	—
	0,5	—	—	—	—	—	—
	1,0	—	—	—	—	—	—

A organogênese direta foi obtida em meio de cultura sem regulador de crescimento utilizando como fonte de explante o rizoma (Figura 1A). Para este tratamento, 66% dos explantes foram responsivos (Tabela 1) com uma média de 22 brotos por explantes, os quais apresentaram 1,1cm de comprimento da parte aérea (Figura 1B) e uma taxa de sobrevivência de 44% após a transferência para novo meio de cultura (Figura 1C).

A regeneração de brotos na ausência de reguladores é benéfica em termos da estabilidade genética, favorecendo a produção de plantas adequadas para a preservação *in vitro* e para o mercado florístico, além de constituir um método economicamente viável para o comércio das mudas micropropagadas (Pence, 1999; Arrabal et al., 2002).

Sistemas de micropropagação de espécies herbáceas em meios suplementados com auxinas e citocininas têm sido relatados na literatura com respostas que variam em função do balanço hormonal de cada espécie (Arrabal et al., 2002; Cerqueira et al., 2002; Dhar & Joshi, 2005; Rech Filho et al., 2005). Em *S. mucugensis* a adição de BAP nas duas concentrações utilizadas induziu a formação de calos com posterior regeneração de brotos a partir do explante rizoma. Foram obtidos 90% e 20% de indução de brotos por organogênese indireta na presença de 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ de BAP, respectivamente, indicando que o aumento na concentração de BAP pode inibir a multiplicação dessa espécie (Tabela 1). Os calos surgiram na terceira semana da inoculação e apresentaram consistência compacta ou friável com coloração esverdeada ou amarelada (Figura 1D). A regeneração dos brotos iniciou-se na quarta semana de observação, concomitante com o crescimento dos calos (Figura 1E).

Quando o rizoma foi inoculado em meio contendo 1,0g.L⁻¹ de BAP foram observados 20% de formação de calos compactos sem a regeneração de brotos, o que sugere que o aumento na concentração de BAP pode causar efeito inibitório na multiplicação de *S. mucugensis* (Tabela 1).

Para folha foram obtidos 12% de calogênese em meio com 1,0g.L⁻¹ de BAP, não sendo observada a produção de brotos a partir desse explante em nenhum dos tratamentos utilizados. (Tabela 1). Os calos formados foram do tipo compacto com coloração amarelada ou esverdeada (Figura 1F).

Nos tratamentos com ANA, sem adição de BAP, as respostas dos explantes rizoma e folha limitaram-se à formação de calo com coloração branca de aspecto esponjoso e não friável, sem a regeneração de brotos (Figura 1G e 1H).

Os maiores valores para matéria fresca e seca dos calos ocorreram na presença de BAP e ausência de ANA (Tabela 2). Pode-se observar também que calos originados de rizoma

apresentaram pesos superiores aos formados por folha, independente do regulador utilizado (Tabela 2).

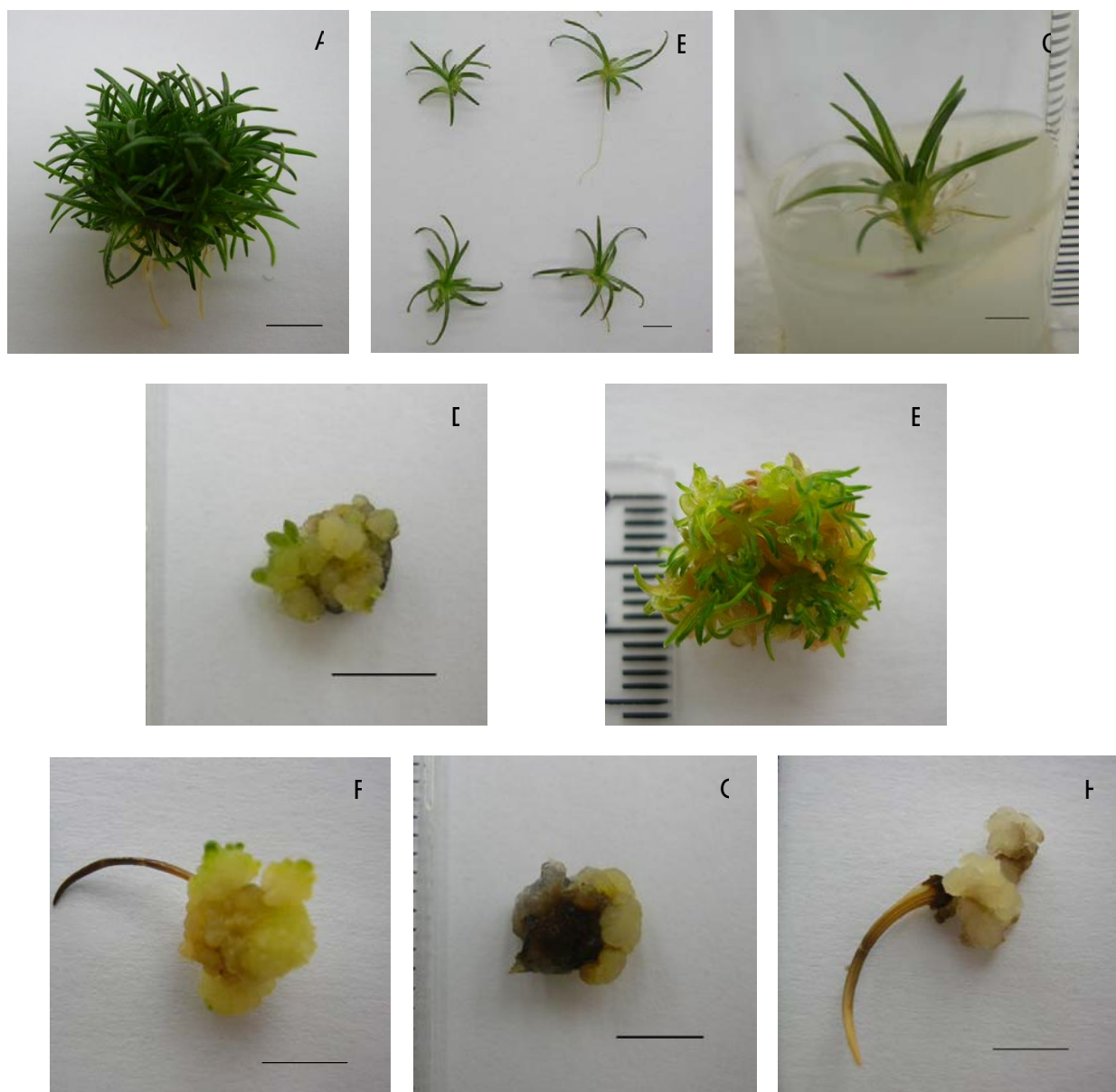


Figura 2. Organogênese em *Syngonanthus mucugensis*: organogênese direta (A, B e C), organogênese indireta (D e E), calogênese (F, G e H). (Barra = 0,5cm)

Tabela 2. Massa fresca e seca (g) dos calos de *S. mucugensis* obtidos a partir dos explantes rizoma e folha em meio suplementado com BAP e ANA.

Reguladores (g.L ⁻¹)		Massa fresca (g)		Massa seca (g)	
BAP	ANA	Rizoma	Folha	Rizoma	Folha
0,0	0,0	—	—	—	—
	0,5	—	—	—	—
	1,0	0,189 Ba	0,091 Bb	0,020 Ba	0,007 Bb
0,5	0,0	—	—	—	—
	0,5	—	—	—	—
	1,0	—	—	—	—
1,0	0,0	0,486 Aa	0,117 Ab	0,055 Aa	0,012 Ab
	0,5	—	—	—	—
	1,0	—	—	—	—

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

A utilização simultânea de BAP e ANA não induziu resposta morfogênica nos explantes utilizados, indicando a ação inibitória do regulador ANA na organogênese de *S. mucugensis* (Tabela 1). Resultados similares foram encontrados por Miachir et al., 2004 com a espécie *Curcuma zedoaria* Roscoe. Entretanto, para *Fragaria* x ananassa (morangueiro) e *Baccharis trimera* L. (carqueja) a presença de auxina em combinação com citocinina é essencial para a formação de calos (Flores et al., 1998; Silva et al., 2003).

Não houve organogênese quando a raiz foi utilizada como fonte de explante. Estes resultados sugerem que as raízes de *S. mucugensis* possuem elevada determinação, pois quanto maior a determinação de um explante para uma via de desenvolvimento, menor será a competência para formar outro tipo de órgão (Peres, 2002).

CONCLUSÃO

A multiplicação de brotos de *S. mucugensis* pode ser obtida por organogênese indireta ou direta com a utilização do explante rizoma inoculado em meio de cultura com e sem regulador de crescimento, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, J. S. de; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; LUZ, J. M. Q.; PEREIRA, R. A.; FERREIRA, A. L. & MYIADA, L. Y. Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calos em anteras de *Coffea arábica* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 1, n. 2, 2005.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J. & MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, n. 11, p. 1081-1089, 2002.

BRUM, G. R.; SILVA, A. B. & PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia** Edição especial, p.1403-1409, 2002.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R. de; CASTRO, N. E. A. de; CARDOSO, M. das G. & LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.

DHAR, U. & JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, v. 24, p. 195-200, 2005.

FLORES, R.; GOMES, P. R.; FARIA, J. T. C.; CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L. & PETERS, J. A. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria* x ananassa) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 1, p. 9-14, 1998.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics. Pt. 1: The technology, 1993. 574 p.

GIULIETTI, A. M.; WANDERLEY, G. L.; WAGNER, H. M.; PIRANI, J. R. & PARRA, L. R. Estudos em sempre vivas: Taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 10, n. 2, p. 329-377, 1996.

MIACHIR, J. I.; ROMANI, V. L. M.; AMARAL, A. F. de C.; MELLO, M. O.; CROCOMO, O. J. & MELO, M. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 427-432, 2004.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAIXÃO-SANTOS, J.; DORNELLES, A. L. C.; SILVA, J. R. S. & RIOS, A. P. Germinação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti. **Sitientibus**. Série ciências biológicas, v. 3, p. 120-124, 2003.

PAIXÃO-SANTOS, J.; SILVA, J. R. S.; SANTANA, J. R. F.; LIMA-BRITO, A. & DORNELLES, A. L. C. Ajuste do meio MS para o cultivo *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti, uma espécie ameaçada de extinção. **Sitientibus**. Série ciências biológicas v. 6, n. 1, p. 36-39, 2006.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; NOGUEIRA, R. C.; SANTOS, B. R. dos; MARTINOTTO; PAIVA, P. D. de O. & MENEGUCCI, J. L. P. Aspectos fisiológicos da produção de flores e plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 227, p. 12-18, 2005.

PARRA, L. R. **Redelimitação e revisão de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. Ex Koern)-Eriocaulaceae**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2000. 201 p.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 25, p. 44-48, 2002.

PENCE, V. C. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants. In: Benson E.E. (ed.). **Plant Conservation Biotechnology**. Taylor and Francis Ltd, London p. 227-250. 1999.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V. & GUERRA, M. P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 1799-1808, 2005.

RAMOS, C. O. C. **Fenologia e biologia reprodutiva de *Syngonanthus mucugensis* Giul. e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae) nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2005.

SILVA, F. G, PINTO, J. E. B. P; SALES, J. F.; DIVINO, S. P. & BERTOLUCCI, S. K. V. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 541-547, 2003.

SILVA, J. R. S.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J. R. F., DORNELLES, A. L. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus**. Série ciências biológicas v. 5, n. 2, p 56-59, 2005.

SUGINAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999.

PALAVRAS-CHAVE

Eriocaulaceae; *Syngonanthus mucugensis*; sempre-viva; organogênese.

AGRADECIMENTOS

Ao Projeto Sempre-viva e a FAPESB.