

## **Avaliação do potencial para a produção de brotos de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae) a partir de plantas germinadas e propagadas *in vitro*.**

Sá, Analu Fonseca<sup>1</sup>; Castro, Tatiana Carvalho<sup>2</sup>; Simões, Claudia<sup>3</sup>; De Castro, Carlos Nogueira<sup>1</sup>; Albarello, Norma<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Aluno de Graduação, <sup>2</sup>Técnico em Biotecnologia, <sup>3</sup>Biólogo, <sup>4</sup>Professor Adjunto - Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN) - Departamento de Biologia Vegetal - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rua São Francisco Xavier, 524, CEP.20.550-013, RJ, (21) 2587-7361, email: [labplan\\_uerj@yahoo.com.br](mailto:labplan_uerj@yahoo.com.br)

### **INTRODUÇÃO**

*Norantea brasiliensis* Choisy é uma espécie típica das regiões de restinga e de vegetação costeira, com ampla ocorrência desde o nordeste até o sul do Brasil, sendo bastante representativa no estado do Rio de Janeiro. É conhecida popularmente como rabo-de-arara, chinelo-de-anjo, pente-de-macaco e agarrapé. Suas flores possuem coloração vinácea e nectários são encontrados na base do pedúnculo floral, constituindo uma unidade de atração para polinizadores. A floração é anual e intensa, com frutificação de setembro a maio. O fruto é globoso, contendo sementes de forma semilunar e coloração negra (Ferreira, 1995; Pinheiro *et al.*, 1995; Zamith e Scarano, 2004).

Por apresentar inflorescências vistosas e coloridas, a espécie vem sofrendo extrativismo, principalmente com propósito paisagístico, encontrando-se na lista de espécies ameaçadas de extinção no município do Rio de Janeiro (Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000). Além disto, alguns aspectos de sua fenologia como floração anual e a baixa produção de sementes por fruto, nem sempre viáveis (Pinheiro *et al.*, 1995; Ferreira, 1995), também comprometem a manutenção da espécie em seu ambiente natural.

A cultura de tecidos vegetais tem sido amplamente utilizada como importante estratégia de conservação. Dessa forma, estudos sobre a micropropagação de *N. brasiliensis* são relevantes, viabilizando a produção de mudas homogêneas e de qualidade. Adicionalmente, estudos *in vitro* da espécie podem ser de interesse para investigar a produção de metabólitos secundários que tenham importância econômica e/ou terapêutica.

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial para a produção de brotos *in vitro* de *N. brasiliensis* considerando duas diferentes fontes de explantes, o balanço hormonal endógeno de cada material e a ausência de agentes gelificantes no meio de cultura.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Plantas (LABPLAN/UERJ).

Foram utilizadas plantas oriundas de propagação e germinação sob condições *in vitro*, mantidas como estoque há cerca de dois anos em meio básico B5 (Gamborg *et al.*, 1968), isento de reguladores de crescimento (B50) e solidificado com agar 0,8% (Merck). O material foi subcultivado a cada 60 dias para meio fresco de mesma composição e mantido em sala de crescimento a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16h.

As plantas subcultivadas tiveram suas raízes excisadas e apresentavam cerca de 2 cm de altura, 4-5 nós e até 2 folhas. A inoculação foi feita em 30 mL de meio líquido B50, sem agitação ou suportes para sustentação.

Após dois meses de cultura, foram selecionadas aleatoriamente 40 plantas de cada origem para análise da frequência de formação, número médio e o tamanho médio dos brotos neoformados. Foram utilizadas 20 repetições com 2 plantas para cada origem avaliada.

Raízes pigmentadas desenvolvidas a partir das plantas produtoras de brotos foram maceradas em metanol acidificado (HCl 1%) e deixadas a  $4^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após 24 horas, o

sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 1000 rpm (10 minutos) e submetido à varredura em espectrofotômetro (200-800 nm).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, sendo cada bloco representado por uma repetição. Foram considerados como tratamentos as diferentes origens (plantas germinadas e plantas propagadas *in vitro*). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). Utilizou-se o programa estatístico MSTATC.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas obtidas por germinação apresentaram desenvolvimento das gemas axilares em brotos (Figura 1) a partir do 15º dia de cultura. Eventualmente, estes brotos foram capazes de desenvolver novos brotos. Nas plantas micropropagadas, só foi observado o desenvolvimento de brotos axilares após 30 dias de cultivo.

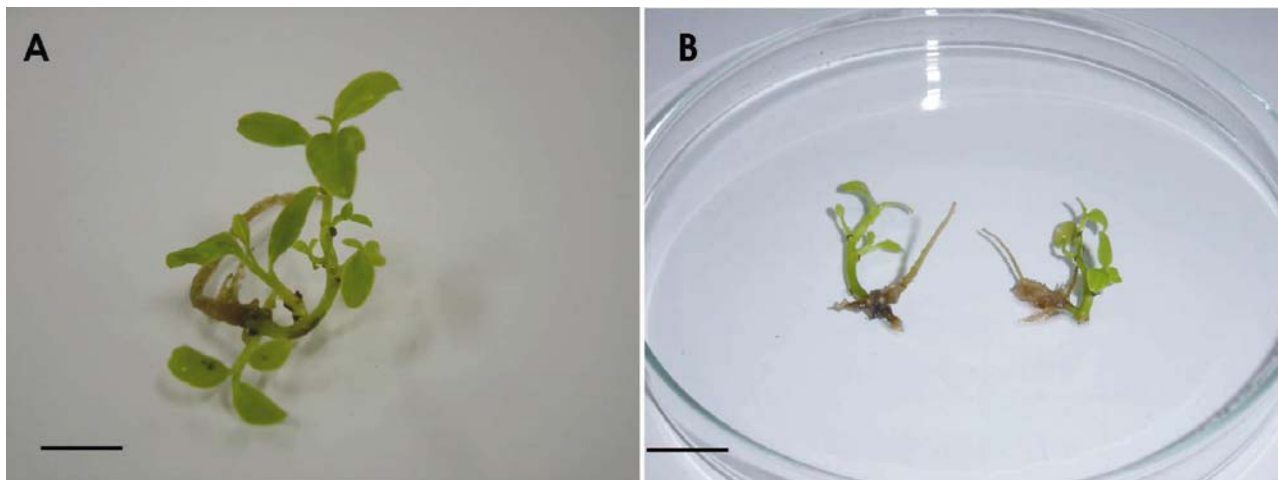


Figura 1. Brotos desenvolvidos em meio líquido B50 a partir de plantas oriundas de germinação *in vitro* (A) e micropropagação (B), após 60 dias. Barra: A = 2,0cm; B = 1,5cm.

Com relação à frequência de desenvolvimento dos brotos axilares, as plantas oriundas de germinação *in vitro* apresentaram valores numericamente maiores, apesar de não ter havido diferença significativa entre as médias das duas origens (Tabela 1). Estas plantas, além de produzirem maior número de brotos, apresentaram taxa de alongamento e rizogênese na metade do tempo (15 dias) quando comparadas àquelas propagadas *in vitro*. As melhores respostas para produção de brotos encontradas nas plantas germinadas podem ser decorrentes de características mantidas no material, devido à manutenção da integridade de mecanismos genéticos e fisiológicos, com reflexos no balanço hormonal endógeno dessas plantas. As plantas provenientes de cultivo *in vitro*, devido à via de regeneração que envolve a desdiferenciação, são mais suscetíveis a variações (Scowcroft, 1984). Tais resultados sugerem que o desenvolvimento de brotos a partir de plantas germinadas é um processo dependente das características genéticas preservadas e que também está relacionado à concentração dos hormônios endógenos. Estudos preliminares sobre a propagação *in vitro* da espécie (Borges *et al.*, 2005) mostraram a regeneração a partir de segmentos nodais de plantas micropropagadas com média de 1,0 broto por explante, após 60 dias de cultivo em meio B5 sólido suplementado com  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. Os autores obtiveram média de 3,5 brotos por explante após 210 dias de cultivo. No presente estudo, este valor foi alcançado a partir de plantas germinadas em meio livre de reguladores de crescimento e de agentes gelificantes, após 60 dias de cultivo, confirmando a hipótese de que as plantas micropropagadas não são a fonte com o melhor potencial para a produção de brotos da espécie.

Tabela 1. Freqüência de formação, número e tamanho médio dos brotos de *Norantea brasiliensis* produzidos a partir de plantas oriundas de germinação e de propagação *in vitro*.

Origem	Freqüência de formação (%)	Número médio de brotos	Tamanho médio dos brotos (cm)
Germinada	37,50 a	3,52±2,00 a	0,71±0,36
Micropropagada	27,50 a	2,45±0,93 b	1,02±0,66

Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

O cultivo de plantas de *N. brasiliensis* em meio líquido para avaliação do potencial de produção *in vitro* mostrou-se promissor. Segundo Torres *et al.* (1998), meios sem a adição de agentes gelificantes possuem vantagens em relação aos meios sólidos, como permitir uma maior homogeneidade dos nutrientes facilitando a absorção dos mesmos e preparo mais rápido e mais econômico. Contudo, para a utilização de meios líquidos, a presença de suportes e a agitação para oxigenação dos explantes são necessárias (Domingues *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1998). No presente estudo, a produção de brotos *in vitro* em meio líquido foi possível sem a necessidade de suportes ou de agitação.

Uma pequena porcentagem de plantas de ambas as origens não desenvolveu suas raízes rapidamente, ficando imersas no meio líquido e apresentando aspecto hiperhídrico. Tal característica pode estar relacionada a respostas fisiológicas alteradas que têm sido reportadas em culturas líquidas (Joyce *et al.*, 2003).

Raízes de plantas provenientes de germinação *in vitro* apresentaram pigmentação violácea nos órgãos de menor diâmetro, a partir de 60 dias de cultura (Figura 2). Os extratos deste material, analisados em espectrofotômetro, registraram pico em torno de 531 nm. Valores compreendidos na faixa de 475 e 560 nm são típicos das antocianinas (Hopkins, 1995), sugerindo ser esta a natureza do pigmento. O estímulo da síntese destas substâncias pode ter ocorrido em função dos estresses sofridos durante os subcultivos. A introdução de um tecido ou órgão vegetal no ambiente *in vitro* é acompanhada de uma série de situações que, em última análise, levam à formação e ao acúmulo de metabólitos secundários que auxiliam na superação da condição de estresse (Gaspar *et al.*, 2002; Sudha & Ravishankar, 2002).

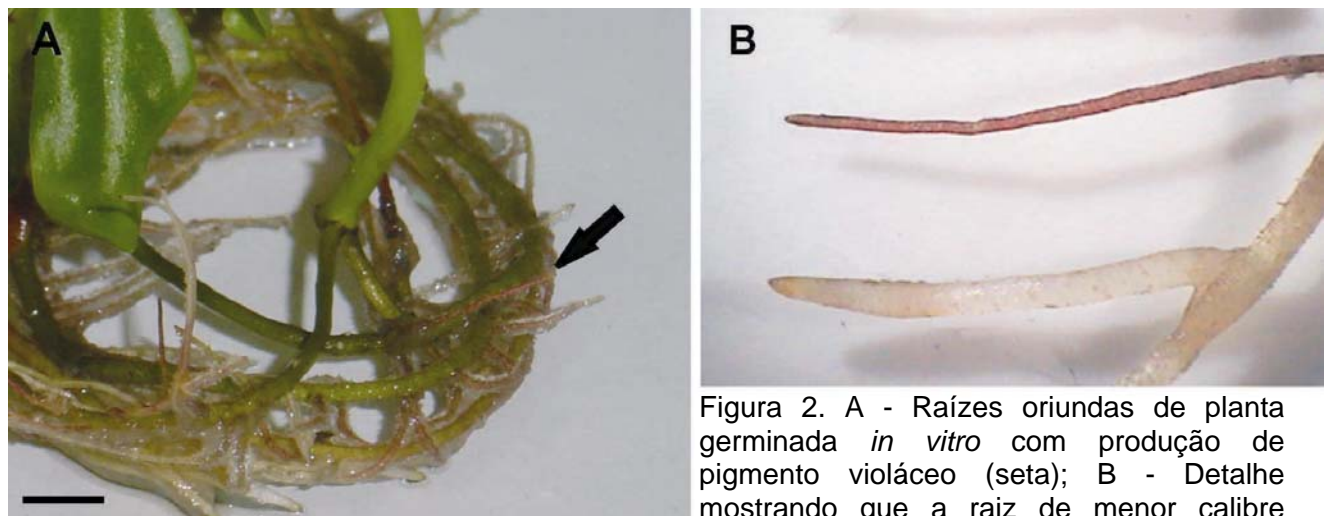


Figura 2. A - Raízes oriundas de planta germinada *in vitro* com produção de pigmento violáceo (seta); B - Detalhe mostrando que a raiz de menor calibre apresenta pigmentação. Barra: A - 0,5 cm; B - aumento 80X.

## CONCLUSÃO

No presente trabalho plantas germinadas *in vitro* mostraram-se como a melhor fonte de explantes para propagação de *N. brasiliensis* em meio líquido B50. A partir destes resultados, novos protocolos serão delineados visando à produção de brotos em meios com suplementação hormonal, sem a adição de agentes gelificantes, além da otimização da produção de pigmentos sob condições *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGES, D. M. B.; GOMES, D. C. S.; CASTRO, T. C.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. Efeito de BA e ANA sobre a morfogênese *in vitro* de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 2005, Fortaleza - CE. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**. 2005. v. 23, p. 627.
- DOMINGUES, E.T.; TULMANN, A .N.; MENDES B.M.J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp, var. maçã: estabelecimento, micropropagação enraizamento *in vitro*. **Revista da Sociedade de Agricultura**. Piracicaba. v. 52, n2, p.387-394, maio /agosto, 1995.
- FERREIRA, G.L. Estudo Taxonômico das Espécies Brasileiras do Gênero *Norantea* Aublet (Marcgraviaceae). **Arq. Jard. Bot. RJ**, v.33, no.2, p.9-53, 1995.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**, v 50, p.151-158, 1968.
- GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. G.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regul.**, v.37, p.263-285, 2002.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 2 ed. England: Exergetic Ltda. 690p, 1993.
- HOPKINS, W. G. Light and pigments: an introduction to photobiology. In: **Introduction to plant physiology**. New York, John Wiley & Sons. P. 125- 144, 1995.
- JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C.; JAIN, S.M. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.74, p.103-121. 2003.
- PINHEIRO, M.C.B.; ORMOND, W.T.; LIMA, H.A.; CORREIA, M.C.R. Biologia da Reprodução de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). **Rev. Brasil. Biol.**, v.55, Supl.1, p.79-88,1995.
- ROCHA, M.E.N. Potencialidades biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). Tese Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2002.
- Scowcroft, W. E. **Genetic variability in tissue culture: impact on germplasm conservation and utilization**. Technical Report. Roma: IBPGR, 1984. 41 p.
- Secretaria Municipal do Meio Ambiente. **Espécies ameaçadas de extinção no município do Rio de Janeiro: Flora e Fauna**, p.65, 2000.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistances to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.71, n.3, p.181-212, 2002.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. **Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Org.). *Cultura de tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: SPI, v.1, p.11-19,1998.

PALAVRAS-CHAVE: *Norantea brasiliensis*, micropropagação, cultura líquida, metabólitos secundários