

Estabelecimento do cultivo *in vitro* de *Canavalia rosea* (Sw.) DC (Fabaceae)

Sato, Alice¹; Cordeiro, Sandra Zorat².

¹Professora da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Av. Pasteur, 458, sala 415, Urca, Rio de Janeiro, RJ – CEP: 22290-240, fone: (21) 2244-5760, e Professora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PBV-UFRJ), Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica, Bloco G, 2º andar - Sala 050 Cidade Universitária, Ilha do Fundão, RJ -CEP: 21941-590 fone (21) 2562-6643, e-mail: alissat@uol.com.br. ²Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PBV-UFRJ), Centro de Ciências da Saúde – Instituto de Biofísica, Bloco G, 2º andar - Sala 050, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, RJ - CEP: 21941-590, fone (21) 2562-6643, e-mail: sandrazorat@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

Canavalia rosea (Sw.) DC (Fabaceae), também conhecida como feijãozinho-da-praia, é uma espécie herbácea, estolonífera, com belas flores rosa-arroxeadas, que ocorre naturalmente ao longo do litoral brasileiro nas regiões de restinga, principalmente nas regiões de dunas, fazendo parte da comunidade psamófila reptante e contribuindo sobremaneira para o processo de fixação de dunas devido à sua alta capacidade adaptativa e grande poder de regeneração (Pereira, 1990).

As lectinas são encontradas em uma ampla variedade de espécies de plantas e animais, entretanto tais proteínas estão presentes em maior quantidade em grãos de leguminosas e gramíneas (Pusztai, 1989). Estudos revelaram a presença de concanavalina A (Con A), uma lectina e de canatoxina (CNTX), uma proteína tóxica, tanto em sementes, como em cultivos *in vitro* de *Canavalia ensiformis* DC (Carlini & Guimarães, 1981; Carlini & Guimarães, 1991 e Sato *et al*, 1993). Embora Con A e CNTX possuam alto grau de similaridade entre suas estruturas, a CNTX é capaz de induzir convulsões e morte em animais de laboratório (LD50 2,0 mg/kg, rato, intra-peritoneal) além de uma potente atividade secretória em vários tipos celulares, indicando outros possíveis efeitos farmacológicos (Barja-Fidalgo *et al*, 1991). O objetivo deste trabalho é estabelecer o cultivo “*in vitro*” de *C. rosea* e posterior verificação da presença de lectinas em cultura de tecidos desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biofísica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Desinfestação e inoculação de embriões - As sementes de *C. rosea* utilizadas foram coletadas na Praia da Restinga da Marambaia, município do Rio de Janeiro, RJ, em Outubro de 2006. As sementes foram colhidas ao acaso, de vagens maduras, oriundas de diferentes indivíduos encontrados no local da coleta. As sementes são feijões de aspecto circular com cerca de 1 cm de diâmetro, com cores que variam do marrom escuro ao marrom-amarelado. Apesar de possuírem o tegumento muito espesso e rígido, a micrópila e o hilo são muito visíveis, o que facilitou a manipulação da semente sem danificar o embrião. Das sementes coletadas, 14 foram selecionadas e então lavadas em água corrente e sabão neutro e submetidas à escarificação mecânica. As sementes então foram colocadas em água destilada a 50 °C por 10 minutos. Após a retirada do tegumento, os embriões foram isolados sob lupa com auxílio de pinça e estilete e, em câmara de fluxo laminar, submetidos à desinfestação através de lavagem por imersão em água destilada, álcool 70% por 3 minutos, água destilada, hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos e água destilada estéril. Após a desinfestação os embriões foram inoculados em meio salino básico MS (Murashige & Skooge, 1962), acrescido

de 87.3 μM de sacarose, 1.5 μM de tiamina.HCl, 0.6 mM de mio-inositol, 4.1 μM de ácido nicotínico e 2.4 μM de piridoxina. O pH do meio foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem e solidificado com ágar a 0,8%. Reguladores de crescimento não foram adicionados ao meio, assim denominado então MSØ. Os embriões foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 1 °C, com iluminação de 23.0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Segmentação das plântulas e inoculação de explantes - As plântulas desenvolvidas a partir dos embriões foram mantidas em sala de crescimento até adquirir comprimento maior que 10 cm (considerando-se da base do caule até o ápice), para que fossem excisados os explantes. Em câmara de fluxo laminar, foram segmentadas em ápice (A), segmentos nodais (SN), segmentos internodais (SIN), folhas (F), epicótilo (E) e hipocótilo (H). Esses explantes foram então inoculados em meio MSØ e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições anteriormente descritas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desinfestação - Dos 14 embriões isolados de *Canavalia rosea* inoculados em meio MSØ, apenas dois apresentaram contaminação, ocorrendo após 12 dias de cultivo, indicando que o processo de desinfestação foi eficiente.

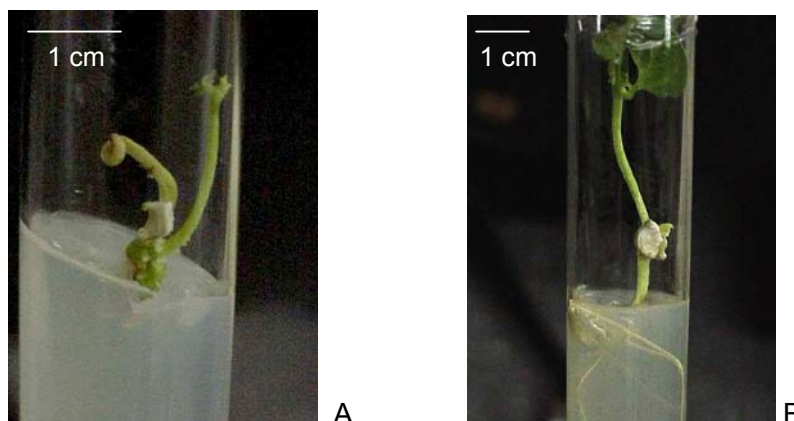


Figura 1 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *C. rosea* em Meio MSØ: A – Embrião apresentando crescimento de caule e raiz anômalos após 14 dias de cultivo; B – Plântula com desenvolvimento pleno de raiz, caule e folhas após 14 dias de cultivo.

Germinação e crescimento – Dos 12 embriões sem contaminação, 2 não germinaram e 10 se desenvolveram: 6 apresentaram rizogênese e caule anômalos (Figura 1A), formando calo após 18 dias de cultivo e 4 cresceram normalmente formando plântulas com pleno desenvolvimento de raízes, caule e folhas após 14 dias de cultivo (Figura 1B).

Desenvolvimento dos explantes - O potencial organogênico dos explantes é apresentado na Tabela 1.

As gemas dos ápices e pelo menos uma gema de cada segmento nodal apresentaram crescimento após 5 e 7 dias, respectivamente, em sala de crescimento, sendo que a partir do 7º. dia, todos os ápices já apresentavam folhas expandidas (Figura 2A) e a partir do 19º. dia, 2 enraizaram. A partir do 14º. dia, um dos segmentos nodais apresentou expansão foliar (Figura 2B), sendo que em 28 dias, 50% dos segmentos nodais apresentaram folhas expandidas. Segmentos internodais e folhas apresentaram organogênese de raízes adventícias: em 16,6% dos segmentos internodais (Figura 2C) a partir do 28º. dia e em 40% dos explantes foliares (Figura 2D) a partir do 19º. dia. Uma das folhas com enraizamento apresentou formação de calo na epiderme superior após o 19º. dia. Dos 4 epicótilos, em 14 dias de cultivo, um calejou e outro

apresentou crescimento de broto (Figura 2E); no mesmo período, 50% dos hipocótilos também calejaram no local de inserção com o meio (Figura 2E). Em 28 dias, outro entre os 3 epicótilos que não tinham sofrido alterações, apresentou brotamento.

Tabela 1 – Desenvolvimento dos explantes de *C. rosea* em função do tempo de cultivo. O número entre parênteses indica o percentual de explantes, de cada tipo, que apresentou o desenvolvimento citado. (-) indica que não houve alteração em relação ao período anterior.

Tipo de explante *	N	Tempo de crescimento			
		7º. Dia	14º. dia	19º. dia	28º. dia
A	4	alongamento de brotos (100%)	(-)	rizogênese 50%	(-)
SN	12	alongamento de gemas (100%)	expansão foliar (8,3%)	expansão foliar (33%)	expansão foliar (50%)
SIN	12	(-)	(-)	(-)	rizogênese (16,6%)
F	5	(-)	(-)	rizogênese (40%) calejamento (20%)	(-)
E	4	(-)	alongamento de broto (25%) calejamento (25%)	(-)	desenvolvimento de broto (50%)
H	4	(-)	calejamento (50%)	(-)	(-)

* - ápice (A), segmentos nodais (SN), segmentos internodais (SIN), folhas (F), epicótilo (E) e hipocótilo (H)

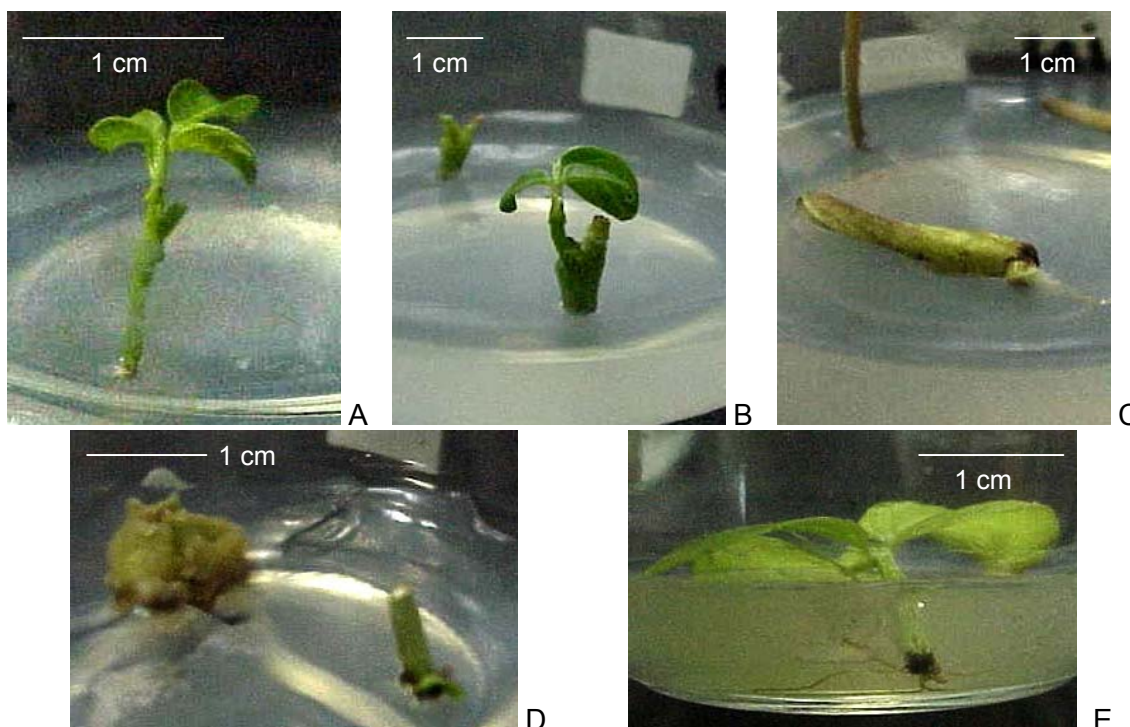


Figura 2 – Explantes desenvolvidos de *Canavalia rosea* em Meio MSØ após 33 dias em sala de crescimento: A – expansão foliar em ápice; B – expansão foliar em segmento nodal; C –

rizogênese em segmento internodal; D – à esquerda, calo desenvolvido no hipocótilo, à direita, organogênese de broto em epicótilo, E – rizogênese em explante foliar.

CONCLUSÃO

Os objetivos iniciais do trabalho foram atingidos: a desinfestação de *C. rosea* foi eficiente e o desenvolvimento dos embriões foi satisfatório, bem como a obtenção de explantes viáveis para introdução desta espécie ao cultivo *in vitro*. De acordo com os resultados preliminares obtidos foi observado desenvolvimento de brotos apicais com enraizamento a partir dos explantes apicais e calogênese em epicótilos e hipocótilos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A. & CARLINI, C.R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. **Toxicon**, n. 29, p. 453-459, 1991.

CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, n. 19, p. 667-676, 1981.

CARLINI, C.R. & GUIMARÃES, J.A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: Emphasis on canatoxin. **Toxicon**, n. 29, p. 791-806, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, O.J. Caracterização fito-fisionômica da restinga de Setiba, Guarapari, Espírito Santo. *In: Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira: Estrutura, Função e Manejo*, Águas de Lindóia: ACIESP. v. 3, p. 207-219, 1990.

PUSZTAI, A., Lectins. In: CHEEK, P.R., **Toxicants of plants origin, proteins and aminoacids**. Boca Raton: CRC Press, 1989 v.3, p. 29-71

SATO, A., BARCELLOS, G.B.S., RIEDEL, E.C., CARNEIRO, J.A., CARLINI, C.R. & ESQUIBEL, M.A. The presence of concanavalin A and canatoxin in *Canavalia ensiformis* DC tissue culture. **Plant Cell Reports**, n. 12, p. 233-236, 1993.

PALAVRAS-CHAVES:

Canavalia rosea; feijãozinho-da-praia; cultivo *in vitro*; sementes.