



CONCENTRAÇÕES DE BAP E TDZ NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE CURAUÁ (*ANANA ERECTIFOLIUS* L. B. SMITH)

A Influência das Citocininas Sintéticas na Cultura de Tecido

As ilustrações (Figuras e Tabelas) presentes no texto são de autoria de Adriana Sartori de Almeida Santos

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a influência de diferentes concentrações de BAP e TDZ no desenvolvimento e na multiplicação em *in vitro* de duas variedades de curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith), uma bromélia nativa da Amazônia. As gemas apicais e axilares foram cultivadas em meio MS contendo BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L) e TDZ (0,0; 0,025; 0,250 e 0,500 mg/L). Para um incremento na produção de brotos, foram feitos 3 subcultivos a partir do estabelecimento das gemas, num espaçamento de 45 dias. Após este período, os brotos foram coletados e determinados seus parâmetros anatomo-fisiológicos: C (comprimento dos brotos) e produção de MF (matéria fresca) e MS (matéria seca). Entre os tratamentos administrados, o meio MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP apresentou, ao final de cada um dos 3 subcultivos, a maior taxa de multiplicação de brotos/explante, comprimento dos brotos e produção de matéria fresca e seca, para as variedades branca e roxa. Contudo, o TDZ em meio MS, mostrou-se um potente indutor da calogênese *in vitro*.

Palavras-chave: *Ananas erectifolius*, curauá, micropropagação, 6-benzylaminopurina, thidiazuron.

INTRODUÇÃO

O Curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) é um bromeliácea da flora Amazônica de grande interesse comercial devido sua multiplicidade de aplicação, principalmente como produtora de fibra de excelente qualidade, podendo ser usada na indústria automobilística devido sua resistência, maciez e peso reduzido, na extração de fármacos e de aditivos alimentares e na floricultura de corte e paisagismo. Do ponto de vista tecnológico, o emprego da fibra de curauá para a produção de compósitos poliméricos e de

mantas não-tecido visa um melhor aproveitamento desta fibra natural lignocelulósica, além de fornecer novas alternativas de grande importância tecnológica na utilização da biomassa vegetal na produção de materiais mais compatíveis com o ambiente (Caraschi & Leão, 2000).

A propagação vegetativa utilizando técnicas de cultura de tecido pode ser um valioso instrumento na propagação clonal rápida de mudas de curauá, em larga escala. Este método vêm extensamente sendo usado para a propagação clonal e limpeza de vírus em grande número de espécies, além da introdução de novas variedades, previsão de novos genótipos, formação de bancos de germoplasma, previsão de estoque de plantas sadias e atendimento de outras áreas da pesquisa (Hartmann & Kester, 1983).

Os meios nutritivos específicos para a micropropagação *in vitro* são formulados baseando-se nas exigências das plantas quanto a composição dos nutrientes minerais, com algumas modificações afim de fornecer às necessida-



FIGURA 1 - Aspectos dos calos apresentando início de diferenciação de tecidos em explante de curauá roxo, submetidos ao meio MS suplementado com 0,250 mg/L de TDZ

Adriana Sartori de Almeida Santos
Doutoranda em Genética - Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular - Departamento de Genética - Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Botucatu / SP - CEP: 18.618-000 - asas@fca.unesp.br

Isaac Stringueta Machado
Professor Dr. - Laboratório de Biotecnologia de Plantas - Departamento de Recursos Naturais - Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP - Botucatu / SP - CEP: 18.603-970 - issac@fca.unesp.br

Alcides Lopes Leão
Professor Assistente Dr. em Energia na Agricultura - Laboratório de Biotecnologia de Plantas - Departamento de Recursos Naturais - Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP - Botucatu / SP - CEP: 18.603-970 - alcidesleao@fca.unesp.br

Alcides de Amorim Ramos
Professor Titular em Genética - Departamento de Produção e Exploração Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu / SP - CEP: 18.603-970 - aaramos@fca.unesp.br

des específicas *in vitro*. (Caldas *et al.*, 1998). O meio de Murashige e Skoog (MS) representa o meio mais frequentemente usados em cultivo de plantas tropicais de caráter agrônomico, ambiental ou ornamental.

A composição e a concentração hormonal no meio nutritivo são fatores essenciais no crescimento e no padrão do desenvolvimento na maioria dos sistemas da cultura do tecido. Os citocininas, por exemplo, são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. A 6-Benzilaminopurina (BAP) têm sido muito eficazes para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de apresentar um custo acessível com relação a outras citocininas (Hasegawa, 1979; Hu & Wang, 1983; Zaerr & Mapes, 1985). De acordo com Barrueto Cid (2000), o uso do thidiazuron (TDZ) é suficientemente eficiente para o proliferação e diferenciação de gemas axilares, principalmente das plantas de madeira, mas ele pode causar a vitrificação do material regenerado.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas, do Departamento de Recursos Naturais, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu / SP. As plantas de curauá das variedades branco e roxo provenientes de Belém / PA, utilizadas como doadoras de explantes, foram cedidas pela Pematec Triangel do Brasil.

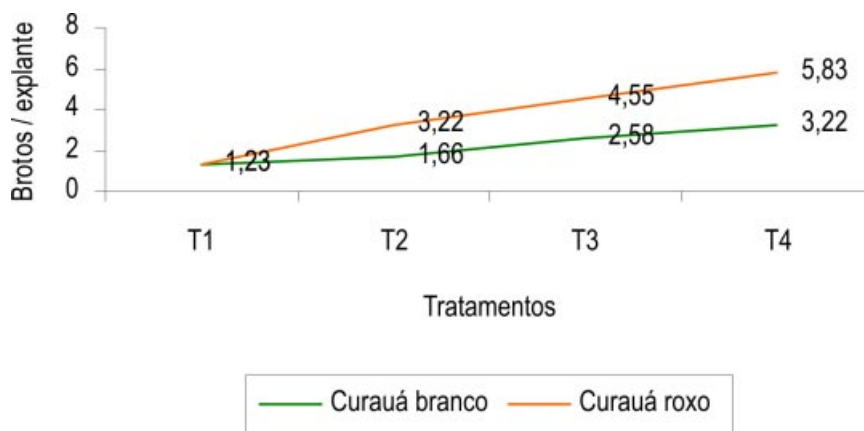


FIGURA 2 - Gráfico demonstrativo da interação entre as variedades e os tratamentos para as taxas médias de multiplicação *in vitro*

TABELA 1 - Análise de variância e regressão para as taxas de multiplicação *in vitro* (brotos/explante)¹, ao final de cada um dos 3 subcultivos, de duas variedades de curauá, cultivados em meio de cultura MS, suplementado com BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L)

Causas de Variação	GL	QM
Variedades (V)	1	84,7888**
Tratamentos (T)	3	73,0850**
V x T	3	11,0782**
Coefficiente de regressão linear do período (bP)	1	185,9100**
Resíduo	135	1,3924
± DS = 2,94 ± 0,98		
CV = 40,17%		

(**) = p<0,01

¹ = dados transformados $\sqrt{x + 0,5}$

As gemas axilares e apicais foram submetidas a desinfestação por imersão em álcool 70% (1 minuto), depois enxaguadas em água autoclavada deionizada, em seguida foram imersas em hipoclorito de sódio 2.5% (15 minutos) e enxaguadas com água autoclavada deionizada por três vezes. Durante a extração das gemas o material permaneceu imerso em solução de ácido ascórbico 0,001% por, no mínimo, 30 minutos.

As gemas axilares e apicais foram estabelecidas em meio MS. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento no período de 20 dias, em condições de escuro total e temperatura de 27 ± 3°C.

Na fase de indução de brotos, foi avaliado o efeito do BAP com concentrações variadas: 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L e TDZ: 0,0; 0,25; 0,250 e 0,500 mg/L. Para incremento da produção de brotos, foram feitos 3 subcultivos a partir

do estabelecimento das gemas, num espaçamento de 45 dias. Os brotos emitidos foram contados e, em seguida, individualizados a cada subcultivo para obtenção da taxa de multiplicação *in vitro*.

No final do período de indução de brotos (135 dias), as partes aéreas foram coletadas e obtidos seus parâmetros anatomo-fisiológicos: comprimento, produção de matéria fresca e seca. As culturas foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 1.000 lux e temperatura de 27 ± 3°C.

Os dados coletados foram submetidos à análise da regressão para avaliar a capacidade regenerativa dos brotos em função do tempo de cultivo. Os dados da análise estatística para a taxa da multiplicação *in vitro* (brotos/explante) ao final de cada um dos 3 subcultivos foram transformados pela expressão $\sqrt{x + 0,5}$ onde, x representa o número de brotos/explante. Após 135 dias, foram feitas as análises das características envolvidas com a indução de brotos: C (comprimento dos brotos) e produção de MF (matéria fresca) e MS (matéria seca).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fase de estabelecimento dos explantes em escuro total por um período de 20 dias, bem como os procedimentos precedentes da extração e da manipulação das gemas em solução de ácido ascórbico 0,001%, foram essenciais para a manutenção e viabilidade das gemas em todos os tratamentos administrados. O meio MS suplementado com TDZ em todas as concentrações administradas revelou-se um potente indutor da calogênese *in vitro* (Figura 1).



FIGURA 3 - Partes aéreas de curauá branco, ao final de um subcultivo em meio MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP



FIGURA 4 - Partes aéreas de curauá roxo, ao final de um subcultivo em meio MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP

A média geral da multiplicação *in vitro* foi de $2,94 \pm 0,98$ brotos/explante. A análise de variância (Tabela 1) do meio de cultura MS, suplementado com BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L) indica efeito significativo para as variedades, os tratamentos, interação entre as variedades e os tratamentos e para o coeficiente de regressão linear para o período.

A taxa média de multiplicação na variedade roxa foi significativamente maior em relação à variedade branca com uma média de 3,71 e 2,17 brotos/explante, respectivamente (Figura 2).

Observa-se também que ao nível de 2,0 mg/L de BAP obteve-se a maior taxa de multiplicação com 3,22 e 5,83 brotos/explante para as variedades branca

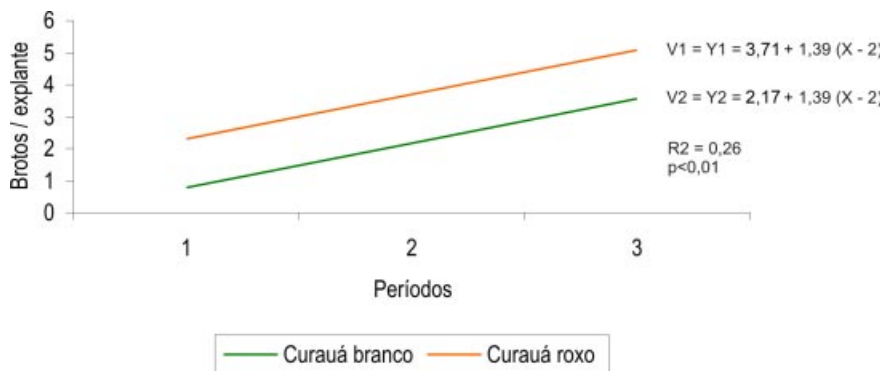


FIGURA 5 - Taxa média de multiplicação *in vitro* em função do tempo, para duas variedades (branco e roxo) de curauá

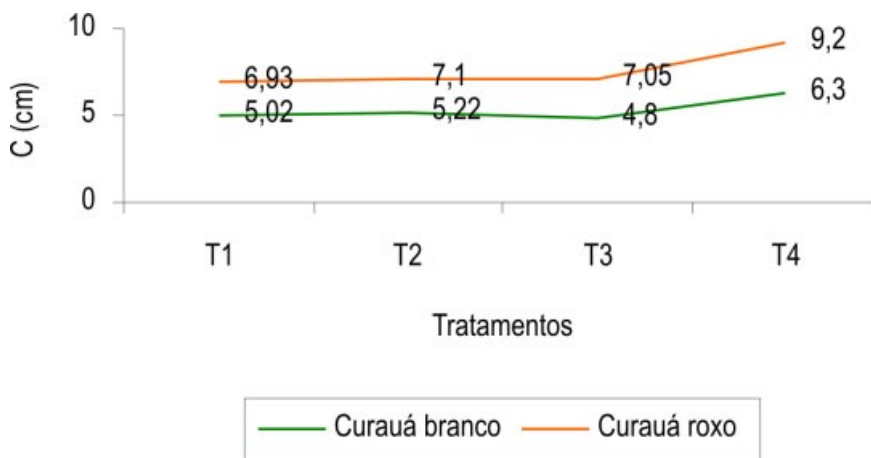


FIGURA 6 - Gráfico demonstrativo da interação entre as variedades e os tratamentos para o comprimento das partes aéreas

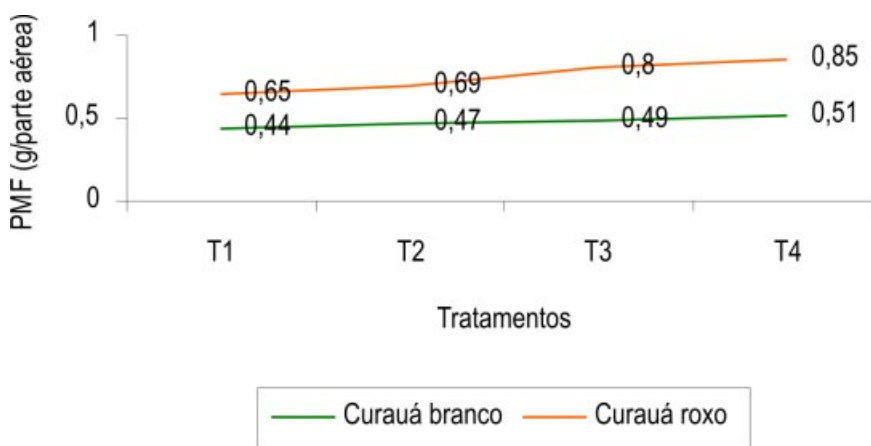


FIGURA 7 - Gráfico demonstrativo da interação entre as variedades e os tratamentos para a produção de matéria fresca

e roxa, respectivamente (Figuras 3 e 4). Estes resultados sugerem a existência de diferenças genotípicas na resposta à indução morfofogenética *in vitro*.

A reta de regressão (Figura 5) foi a mais adequada para explicar a evolução da taxa média de multiplicação para as duas variedades (branco e roxo) de curauá. A maior taxa de multiplicação

(5,10 brotos/explante) foi observada com a variedade roxa após um período de cultivo de 135 dias.

Segundo Guerra *et al.* (1999) na micropropagação de plantas há a necessidade de se compartilhar o tempo de cultivo, o número de repicagem e a taxa de proliferação. Esses aspectos, contudo, devem estar associados a uma

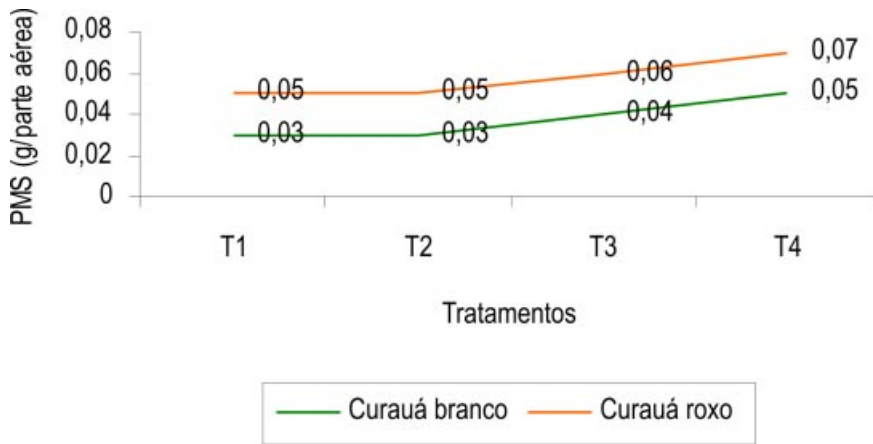


FIGURA 8 - Gráfico demonstrativo da interação entre variedades e tratamentos para a produção de matéria seca

estratégia visando à eliminação ou redução, em níveis aceitáveis, da ocorrência de variantes somaclonais. Embora não existam resultados conclusivos sobre a fidelidade genotípica de mudas de curauá, é conveniente lembrar que culturas de gemas apicais e axilares são consideradas como a técnica mais segura sob o aspecto da manutenção da conformidade clonal (George, 1993).

O comprimento das partes aéreas na variedade roxa foi superior em relação à variedade branca, com 7,57 e 5,33 cm, respectivamente. No entanto, apenas ao nível de 2,0 mg/L de BAP (T4) foi possível observar o efeito do tratamento independente das variedades (Figura 6).

Os resultados apresentados mostram que o melhor tratamento para a indução da multiplicação *in vitro* bem como o desenvolvimento fisiológico das plantas (comprimento das partes aéreas) é o constituído pelo meio de MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP seguido das concentrações decrescentes da citocinina (1,0 e 0,5 mg/L). Estes resultados sugerem uma fase inicial de resistência das plantas de curauá em assimilar este fitohormônio nas novas condições de cultivo *in vitro*.

A Figura 7 apresenta as médias de matéria fresca em função das variedades e dos tratamentos. Observa-se que os tratamentos exerceram diferenças significativas em relação à produção de matéria fresca. A média de peso fresco para a variedade roxa (0,75 g/parte aérea) foi superior a média para a variedade branca (0,48 g/parte aérea). Pode-se observar também que, tanto na variedade branca como na roxa, o maior peso fresco foi encontrado na con-

centração de 2,0 mg/L de BAP (T4) com 0,51 e 0,85 g/parte aérea para as variedades branca e roxa, respectivamente.

As médias da matéria seca em função das variedades e os tratamentos é apresentada na Figura 8. Observa-se que os tratamentos suplementados com os 0,0 e 0,5 mg/L de BAP não apresentaram diferenças estatísticas significativas, o mesmo não ocorrendo com concentrações ao nível de 1,0 e 2,0 mg/L de BAP. A variedade branca apresentou uma média de 0,04 g/parte aérea de peso seco, diferindo da variedade roxa que produziu uma média de 0,06 g/parte aérea. As duas variedades apresentaram uma maior produção de matéria seca no meio suplementado com 2,0 mg/L de BAP (T4).

Pode-se constatar que o fornecimento de BAP na fase de indução de brotos proporcionou um aumento na produção de matéria fresca e seca para as partes aéreas das duas variedades, sendo que a variedade roxa obteve uma média maior em relação à variedade branca.

CONCLUSÕES

Em todos os parâmetros analisados pode observar-se que, a variedade roxa é superior a branca com relação à adaptação às condições laboratoriais *in vitro*, na diferenciação celular, na multiplicação e demais eventos fisiológicos e de estruturação anatômica do curauá, em seu processo de desenvolvimento. O meio do MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP, após 135 dias de cultura, apresentou a maior taxa de multiplicação de brotos/explante, comprimento dos brotos e produção de matéria fresca e seca. Em todas as concentrações,

o TDZ mostrou-se um potente indutor da calogênese *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil) e a Pematec Triangel do Brasil pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 15-75, 2000.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A., Eds., **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CARASCHI, J. C.; LEÃO, A. L. Mechanical Properties of Curaua Fiber Reinforced Polypropylene Composites. In: MATTOSSO, L. H. C.; LEÃO, A. L. e FROLLINI, E. Eds., **Natural Polymers and Composites**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, p. 450-453, 2000.
- GEORGE, E. F. The components of culture media. In: _____. Eds., **Plant propagation by tissue culture**. 2 ed. Great Britain: Exegetics Limited, cap. 9, p. 273-343, 1993.
- GUERRA, M. P., *et al.* Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E. **Plant Propagation: Principles and Practices**. Englewood Cliffs: Prentice Hall Inc., 727 p., 1983.
- HASEGAWA, P. M. *In vitro* propagation of rose. **HortScience**, v.14, p. 610-612, 1979.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., Eds., **Handbook of Plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, p. 117-227, 1983.
- MURASHIGE, T. S.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. action of growth regulators. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J., Eds., **Tissue culture in forestry**. 2.ed. Dordrecht: Martinus Nijhoff, p. 231-255, 1985.