

## ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DO MEIO MS

Andressa Vasconcelos Flôres<sup>1</sup>, Lia Rejane Silveira Reiniger<sup>2</sup>, Aline Ritter Curti<sup>3</sup>, Aline Paim<sup>4</sup>,  
Josiana Scherer Bassan<sup>5</sup>, Ana Catarina Monteiro Carvalho Mori da Cunha<sup>6</sup>

(recebido: 5 de abril de 2010; aceito: 22 de agosto de 2011)

**RESUMO:** Neste trabalho, objetivou-se verificar a influência de diferentes concentrações do meio MS no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares (80-100 mm) de canafístula isolados, a partir de plântulas germinadas em condições assépticas. As concentrações de sais de 50, 75, 100, 125 e 150% do meio de cultivo MS, foram suplementadas com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH, ajustado para 5,7. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições, cada uma consistindo de um frasco contendo um explante. As culturas foram mantidas por 60 dias em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 25±2°C. Não houve efeito das diferentes concentrações do meio MS para a maioria das variáveis, sendo observadas elevadas médias gerais de sobrevivência (98%) e de estabelecimento (98%) *in vitro*. O maior número de folhas (2,8) ocorreu na diluição de 75%, com redução a partir dessa diluição. Nessa mesma concentração, houve a máxima calogênese, que foi diminuindo até não ser observada sob 125% da composição original; a 150% houve, novamente, presença de calos. Não ocorreu enraizamento de explantes durante o cultivo *in vitro*. Considerando-se o conjunto das variáveis avaliadas e, adicionalmente, que a presença de calos não é desejável, recomenda-se o emprego da concentração original de sais do meio de cultivo MS no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de canafístula.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, segmentos apicais caulinares, espécie florestal.

## *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Peltophorum dubium* ((Spreng.) Taub.) IN FUNCTION OF CONCENTRATIONS OF THE MS MEDIUM

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the influence of several concentrations of MS medium on *in vitro* establishment of *Peltophorum dubium* shoot apical segments (80-100 mm) isolated from seedlings germinated under aseptic conditions. The salts concentrations 50, 75, 100, 125 and 150% of MS medium, were supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> of myo-inositol, 7 g L<sup>-1</sup> agar and pH adjusted to 5.7. The experimental design was completely randomized, with 20 replications, each consisting of a vial containing one explant. The cultures were maintained for 60 days in culture room under 16-hour photoperiod, light intensity of 20 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and temperature of 25±2°C. There was no effect of different concentrations of MS medium for most variables. High average of *in vitro* survival (98%) and establishment (98%) were observed. The largest number of leaves (2.8) occurred at a dilution of 75%, decreasing from this point. At the same concentration the highest callus induction was observed, which was decreasing until not be observed under 125% of original composition; at 150% there was, again, the presence of calli. It was not observed rooting of explants during *in vitro* cultivation. Considering the set of variables and, additionally, that the presence of calli is not desirable, it is recommended the use of the original concentration of salts from the MS nutrient medium for the *in vitro* establishment of *P. dubium* shoot apical segments.

Key words: Tissue culture, shoot apical segments, forestry species.

<sup>1</sup>Engenheira Florestal, Pós-doutoranda em Ciência Florestal – Departamento de Ciência Florestal – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Viçosa/UFV – 36570-000 – Viçosa, MG – andressaflorssm@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Professora Doutora em Ciência e Tecnologia de Sementes – Departamento de Fitotecnia – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria/UFSM – Avenida Roraima, n° 1000, Cidade Universitária – Bairro Camobi – 97105-900 – Santa Maria, RS – liarejanesilveirareiniger@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Engenheira Florestal, Doutoranda em Engenharia Florestal – Departamento de Fitotecnia – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria/UFSM – Avenida Roraima, n° 1000, Cidade Universitária – Bairro Camobi – 97105-900 – Santa Maria, RS – alinerittercurti@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Engenheira Florestal, Mestranda em Engenharia Florestal – Departamento de Fitotecnia – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria/UFSM – Avenida Roraima, n° 1000, Cidade Universitária – Bairro Camobi – 97105-900 – Santa Maria, RS – alinepaimal@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Bióloga, Professora Mestre em Ciências – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Farroupilha – Rua Vinte de Setembro – 97420-000 – São Vicente do Sul, RS – josianabassan@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Engenheira Florestal, Professora Doutora em Ciência Florestal – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba – Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n – Bairro Lindo Vale – 36180-000 – Rio Pomba, MG – catarina\_mori@yahoo.com.br

## 1 INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul, ainda existem muitas espécies florestais nativas com potencial para a utilização em plantios comerciais e que poderiam substituir as espécies exóticas na indústria moveleira, celulósica e na produção de lenha e carvão, entre outras finalidades (LORENZI, 1992; REITZ et al., 1988). A canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) é uma espécie florestal nativa com ampla dispersão geográfica, desempenhando um papel pioneiro nas áreas abertas, em capoeiras e matas degradadas (CARVALHO, 2003; MARCHIORI, 1997). *P. dubium* desenvolve-se, naturalmente, em vários tipos de solo, sendo pouco exigente em relação à fertilização química e apresentando um rápido crescimento e fácil adaptação (CARVALHO, 2003).

A propagação vegetativa *in vitro* ou clonagem *in vitro*, também denominada micropropagação é a técnica de cultura de tecidos de maior impacto e tem mostrado enorme importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal e hortícola (BORGATTO; HAYASHI, 2002; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta (SOUZA; JUNGHANS, 2006) cultivados em meio de cultivo, sob condições ambientais controladas, por períodos indefinidos, até a formação da nova planta para posterior aclimatização.

Na cultura de tecidos a escolha do meio de cultivo mais adequado ao objetivo que se busca constitui-se em etapa indispensável. Os meios de cultivo fornecem substâncias essenciais para o crescimento, como macro e micronutrientes em diferentes proporções, carboidratos como fonte de carbono (sacarose, glucose, maltose), vitaminas (tiamina, piridoxina e ácido ascórbico), além de outros nutrientes como inositol e sorbitol, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (DAMIÃO FILHO, 1995; HU; FERREIRA, 1998; SILVA et al., 2006).

Embora não exista uma formulação padrão, o meio Murashige e Skoog - MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), desenvolvido para a cultura de células de *Nicotiana tabacum*, apresenta resultados satisfatórios para diversas espécies em sua formulação original ou em diluições e modificações. Entretanto, em espécies lenhosas, o meio MS não tem mostrado resultados satisfatórios em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes proporcionaram melhor desempenho (MELO et al., 1999). Em explantes de *Kielmeyera*

*coriacea*, Pinto et al. (1996) observaram que o meio MS na concentração de sais integral ou reduzida à metade proporcionou taxas elevadas de multiplicação. Disarz e Corder (2009) verificaram que o meio MS na concentração original promoveu maior formação de gemas e folhas em explantes de *Acacia mearnsii* e, na concentração de 25% dos sais de MS combinado com 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, promoveu maiores taxas de multiplicação e enraizamento. Para a espécie *Cabralea canjerana*, Rocha et al. (2007) verificaram que, durante a multiplicação de explantes do tipo segmentos nodais em presença de 2,5 µM de BAP, o meio MS na concentração original propiciou um bom resultado.

Diante do exposto e considerando-se a carência de informações a respeito do cultivo *in vitro* de canafístula, neste trabalho, objetivou-se verificar a influência de diferentes concentrações do meio de cultivo MS no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares da espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes utilizados no ensaio foram oriundos da germinação de sementes coletadas e armazenadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO/Florestas, em Santa Maria, RS provenientes da colheita de 2006.

Para a obtenção dos explantes, as sementes foram escarificadas mecanicamente (com lixa) na ponta oposta ao hilo e desinfestadas por meio de imersão em solução de etanol a 70% (v/v) por 30 segundos e, posteriormente, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 10 minutos. Na sequência, sofreram tríplice enxágue com água destilada e autoclavada e foram, imediatamente, inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio ágar-água a 7% (p/v) em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, foram transferidas para a sala de cultivo (25 ± 2°C, 16 h de luz e 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) onde permaneceram por 30 dias, quando, então, os segmentos apicais caulinares com, aproximadamente 80-100 mm, contendo de um a dois nós, foram excisados e inoculados nos diferentes tratamentos, sob condições assépticas.

Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de sais (50, 75, 100, 125 e 150%) do meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). O meio de cultura foi suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH, ajustado para 5,7. Posteriormente, alíquotas de 30 mL do meio de cultivo foram transferidas para frascos de vidro com capacidade

para 150 mL, os quais foram vedados com papel alumínio e autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão.

Neste ensaio, empregou-se delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de vidro contendo um explante. Os frascos foram dispostos em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtida a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias, do tipo luz do dia e temperatura de 25±2°C.

Efetuarão-se as avaliações aos 60 dias de cultivo *in vitro*, observando-se: sobrevivência (%) e estabelecimento *in vitro* (%), número de folhas, presença de calo (%) e enraizamento (%). Consideraram-se sobreviventes os explantes que apresentaram coloração verde e estabelecidos, aqueles que desenvolveram novos primórdios foliares e/ou radiculares.

Realizaram-se, inicialmente, os testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett, sendo, após, efetuadas análises de variância e de regressão polinomial. Utilizou-se o programa estatístico 'Statistica' versão 7.0 (STATSOFT, 2006).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações do meio de cultivo MS não afetaram a maioria das variáveis-resposta avaliadas na fase de estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de canafistula, conforme se pode observar na Tabela 1. Observaram-se elevadas médias gerais de sobrevivência (98%) e de estabelecimento (98%) *in vitro*. Resultados semelhantes foram verificados por Rodrigues et al. (2003), que, também, não observaram diferenças significativas no estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos

de *Prunus* sp. no meio MS nas concentrações de 75% e de 100%. Igualmente, Rocha et al. (2007) relataram que a concentração original e diluições (50 e 75%) do meio de cultivo MS não influenciaram o estabelecimento de porta-enxertos de *Prunus* cv. Tsukuba, obtendo médias elevadas para essa variável (96,67 a 99,33%), da mesma maneira como observado no presente trabalho.

Houve efeito significativo da concentração de sais do meio MS somente para número de folhas e presença de calos (Tabela 1). Não foi observado nenhum explante enraizado durante o cultivo *in vitro*, demonstrando não haver influência das diferentes concentrações de sais do meio MS sobre o enraizamento *in vitro* em segmentos apicais caulinares de canafistula.

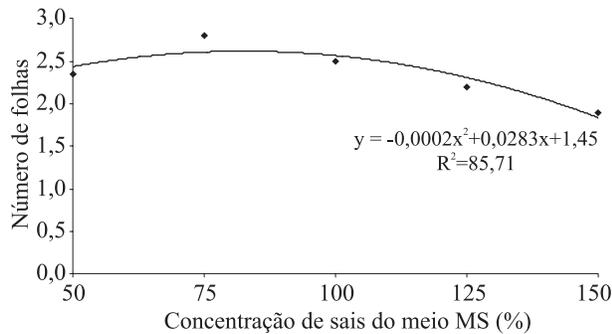
Para o número de folhas, houve o ajuste de modelo quadrático de equação de regressão para as diferentes concentrações de sais do meio MS (Figura 1). O maior número de folhas (2,8) foi observado na diluição de 75%, decrescendo com o aumento de sais no meio de cultivo. Esse resultado possibilitaria relativa economia na etapa de estabelecimento *in vitro* em culturas de canafistula, em nítido contraste ao relatado com *Ocimum basilicum* L. e *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. em que o maior número de folhas por explante foi registrado quando o cultivo ocorreu na concentração original do meio MS (RIBEIRO et al., 2007, 2008). Comportamento quadrático para o número de folhas foi igualmente observado em *Vitis vinifera*, porém a maior média (2,51) foi observada no meio de cultivo diluído à metade dos sais de MS (VILLA et al., 2006). A similaridade dos resultados citados demonstra que a concentração de sais do meio MS influencia na formação de folhas, porém, a direção da resposta é intrínseca da espécie.

**Tabela 1** – Análise de variância para sobrevivência (%) e estabelecimento (%) *in vitro*, número de folhas e presença de calo (%) em segmentos apicais caulinares de canafistula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) cultivados em diferentes concentrações de sais do meio de cultivo MS, após 60 dias de cultivo. Santa Maria, RS, 2008.

**Table 1** – Analysis of variance for *in vitro* survival (%) and establishment (%), number of leaves and presence of callus (%) in shoot apical segments of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. grown in different salts concentrations of the MS nutritive medium, after 60 days of culture. Santa Maria, RS, 2008.

Causa da variação	GL	Quadrado Médio			
		Sobrevivência (%)	Estabelecimento (%)	Nº de folhas	Presença de calo (%)
Concentração de MS	4	400,00	400,00	2,25*	20250,00*
Resíduo	95	184,97	189,47	0,71	1357,89
Média geral		98,00	98,00	2,35	30,00
CV(%)		14,05	14,05	35,94	122,83

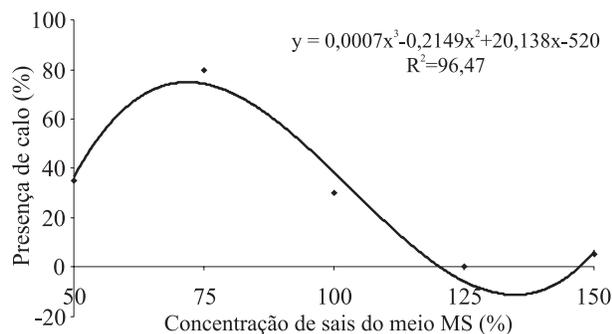
\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.



**Figura 1** – Número de folhas produzidas a partir de segmentos apicais caulinares de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) cultivados em diferentes concentrações de sais do meio de cultivo MS, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, 2008.

**Figure 1** – Number of leaves produced from shoot apical segments of *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. grown in different salts concentrations of the MS nutritive medium, after 60 days of *in vitro* culture. Santa Maria, RS, 2008.

Em relação à presença de calo, obteve-se um ajuste de regressão a um polinômio de terceiro grau para as concentrações de sais do meio MS (Figura 2). A maior formação de calos (80%) foi verificada na diluição de 75% e ausência de calogênese, na concentração de 125% de sais do meio MS; a 150% observou-se, novamente a presença de calos. Considerando-se que a formação de calos pode desperdiçar energia que poderia ser direcionada à organogênese, esse processo é indesejável no estabelecimento *in vitro*.



**Figura 2** – Presença de calo (%) nos segmentos apicais caulinares de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) cultivados em diferentes concentrações de sais do meio de cultivo MS, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria, RS, 2008.

**Figure 2** – Presence of callus (%) in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. shoot apical segments grown in different salts concentrations of the MS nutritive medium, after 60 days of *in vitro* culture. Santa Maria, RS, 2008.

## 4 CONCLUSÕES

A sobrevivência e o estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de canafístula não são influenciados pelas diferentes concentrações do meio de cultivo MS, observando-se elevadas médias independentemente da concentração empregada.

O número de folhas e a calogênese em segmentos apicais caulinares de canafístula são favorecidos pelo uso da diluição de 75% dos sais do meio MS.

Considerando-se o conjunto das variáveis avaliadas e, adicionalmente, que a presença de calos não é desejável, recomenda-se o emprego da concentração original de sais do meio de cultivo MS no estabelecimento *in vitro* de segmentos apicais caulinares de canafístula.

## 5 REFERÊNCIAS

- BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A. de; KLUGE, R. A. (Org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.
- DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: Funep, 1995. 25 p.
- DISARZ, R.; CORDER, M. P. M. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* de Wild. sob diferentes meios de cultura. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 183-260.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 533-568.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1, 161 p.
- MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das angiospermas: leguminosas**. Santa Maria: UFSM, 1997. 200 p.

MELO, N. F. de; OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, jan./fev. 1999.

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

PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; PINTO, C. A. B. P.; BARBOSA, M. H. P. Resposta à regeneração e crescimento de brotos *in vitro* de *Kielmeyera coriácea* quando influenciado por diferentes concentrações de sais e de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 57-61, 1996.

REITZ, R.; KLEIN, M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas, 1988. 525 p.

RIBEIRO, M. de F.; DONINI, L. P.; SOUZA, J. A. de; GUISSO, A. P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWSKI, V. L.; VIÉGAS, J. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de majericão roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 57-59, 2007. Suplemento.

RIBEIRO, M. de N. O.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B. da; RODRIGUES, V. A. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite). **Revista**

**Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 101-106, 2008.

ROCHA, P. S. G. da; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; MISTURA, C. C. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de pessegueiros em diluições do meio MS acrescido de concentrações de BAP. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 83-87, 2007.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. da. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

SILVA, L. C. da; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) Cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 404-408, 2006.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

STATSOFT. **Statistica for Windows**: computer program manual. Tulsa, 2006. Software.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 345-349, 2006.

