

Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP

Janilza da Paixão Santos*, Ana Lúcia Cunha Dornelles, Flávia Dionísio Pereira e Lenaldo Muniz Oliveira

Laboratório de Cultura de Tecidos da Unidade Experimental Horto Florestal, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Universitária, s/n, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: spjanil@hotmail.com

RESUMO. A sempre-viva-de-mucugê [*Syngonanthus mucugensis* – Eriocaulaceae] é uma planta com grande valor ornamental e caracteriza-se pela durabilidade de suas inflorescências que se mantêm mesmo depois de coletadas e secas. A propagação sexuada dessa espécie resulta em plantas desuniformes por ser geneticamente segregante e, aliada a este fato, existe a ameaça de extinção da espécie, sendo por isso restrita a coleta na sua região de origem. Desta forma, a cultura de tecidos torna-se uma alternativa viável para a formação de novas mudas e, por isso, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a indução de calos *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis*, utilizando diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminapurina). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada tratamento continha quatro repetições e cada repetição era formada por quatro explantes. Os explantes utilizados foram plantas cultivadas *in vitro* e segmentos nodais delas. O meio de cultivo utilizado foi o MS (metade dos sais), suplementado com (0,0; 0,89; 1,78; 3,55; 7,10; 14,21 e 28,42 μM) de BAP. Aos 60 dias, avaliaram-se a sobrevivência dos explantes e a porcentagem de formação de calos. Verificou-se que plantas inteiras e segmentos nodais de *Syngonanthus mucugensis* são explantes responsíveis à formação de calos friáveis, sendo que a produção significativa é obtida utilizando-se as concentrações de 1,78 e 3,55 μM de BAP.

Palavras-chave: *Syngonanthus mucugensis*, Eriocaulaceae, cultura de tecidos, regulador de crescimento, planta ornamental.

ABSTRACT. Callus induction in sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti) using different types of explants and BAP concentrations. Sempre-viva-de-mucugê [*Syngonanthus mucugensis* – Eriocaulaceae] is a plant with great ornamental value characterized by the durability of its inflorescences, which remains even after collected and dried. The sexual propagation of this species results in disuniform plants, as it is genetically segregating; in addition, this species is currently endangered, with collection therefore restricted to its region of origin. Thus, tissue culture becomes a viable alternative for the formation of new plants. This study aimed to evaluate the *in vitro* induction of callus in *Syngonanthus mucugensis* using different BAP (6-benzylaminopurine) concentrations. The experimental design was completely randomized, with each treatment containing 4 replications and each replications formed by 4 explants. The explants used were seedlings cultivated *in vitro* and their nodal segments. The culture medium used was MS (half-strength concentrations) supplemented with 0.0; 0.89; 1.78; 3.55; 7.10; 14.21 and 28.42 μM of BAP. At 60 days, the survival of the explants and the percentage of formation of callus were evaluated. It was verified that seedlings and nodal segments of *Syngonanthus mucugensis* are responsive explants to the formation of friable callus, with significant production obtained using the 1.78 and 3.55 μM BAP concentrations.

Key words: *Syngonanthus mucugensis*, Eriocaulaceae, tissue culture, growth regulator, ornamental plants.

Introdução

Syngonanthus mucugensis Giulietti é uma espécie ornamental, da família Eriocaulaceae, popularmente conhecida por sempre-viva-de-mucugê. A espécie é perene e existe no município de Mucugê (BA), em altitudes variando entre 800 e 1.600 m (Giulietti *et al.*, 1996). Em condições naturais, *S. mucugensis* possui de

20 a 58 cm de altura. Suas inflorescências são vistosas, com brácteas involucrais que mudam de cor das séries mais externas para as séries mais internas (Scatena *et al.*, 2004).

Por apresentar escapos e inflorescências que conservam a aparência de estruturas vivas, mesmo depois de coletadas e secas, é comercializada e

exportada para decoração de interiores. Por se tratar de uma espécie com risco de extinção, sua coleta está proibida (Giulietti, 1996; Giulietti *et al.*, 1996; Giulietti *et al.*, 1998). O extrativismo dos escapos florais ocorre antes do completo desenvolvimento dos frutos e da maturação das sementes, impossibilitando a manutenção das populações pela ressemeadura natural. Além disso, a propagação sexuada dessa espécie resulta em plantas desuniformes por ser geneticamente segregante, o que justifica a elaboração de planos de manejo ou projetos de cultivo (Paixão-Santos *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, a cultura de tecidos tornou-se um importante procedimento, tanto para a ciência como em aplicações tecnológicas. Para a micropropagação em plantas, duas estratégias têm sido utilizadas: a regeneração de calos (organogênese indireta) e a multiplicação de brotos (organogênese direta). A regeneração de calos pode ser considerada um método potencial de propagação, caso as variações genéticas (variação somaclonal) não atinjam valores percentuais elevados (Pierik, 1985; Einset, 1986).

Variação somaclonal é um termo que descreve a aparição aleatória de modificações em um determinado material genético cultivado *in vitro*, sendo vista como fonte adicional de variedade de grande importância para plantas propagadas vegetativamente. Os variantes somaclonais podem ser expostos a condições especiais que permitam a seleção de variantes ou mutantes espontâneos, por isso a definição de uma metodologia pode ser ferramenta valiosa para o melhoramento tradicional de cultivares e para o surgimento de novas espécies (Larkin e Scowcroft, 1981).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a indução de calos *in vitro*, de *Syngonanthus mucugensis*, utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina).

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS – Estado da Bahia.

Os explantes primários utilizados foram obtidos de plantas preestabelecidas *in vitro*, provenientes do banco de germoplasma da unidade. Utilizaram-se plantas (inteiras) e segmentos nodais como fonte de explante. As plantas utilizadas tinham 60 dias de cultivo *in vitro* e possuíam 2,0 cm de comprimento.

Os segmentos nodais utilizados também foram provenientes de plantas com 60 dias, porém com 0,5 cm de tamanho.

Em estudos preliminares, foram realizados ensaios, testando diferentes concentrações de BAP dos quais se elegeram as concentrações utilizadas neste experimento. Os explantes foram, então, inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), utilizando 50% dos sais ($\frac{1}{2}$ MS) suplementados com 0,0; 0,89; 1,78; 3,55; 7,14; 14,21 e 28,42 μM de BAP (6-benzilaminapurina). Utilizaram-se 50 mL desse meio em frascos de 8,5 cm de altura por 6,0 cm de diâmetro (volume interno = 296 mL). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, utilizando soluções de NaOH e/ou HCL (0,1%), antes da autoclavagem. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, durante 60 dias.

Avaliou-se a porcentagem de sobrevivência dos explantes e de formação de calos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada tratamento constituído por quatro repetições e cada repetição era formada por quatro explantes.

Na avaliação das porcentagens, utilizou-se escala de valores de 0 a 10, que correspondia às porcentagens de 0 a 100% para sobrevivência e formação de calos. As médias dos frascos foram analisadas mediante a análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey. Os dados de porcentagens foram transformados em arco-seno \sqrt{x} , e os números de contagem, em $\sqrt{x+1}$. O programa utilizado, para análise dos dados, foi o *software* Sisvar (Ferreira, 2003).

Resultados e discussão

Observou-se que houve efeito significativo ($p < 0,01$) do meio de cultura sobre as variáveis porcentagens de sobreviventes e de calos, quando utilizou, como explantes, a planta toda ou os segmentos nodais.

Quando foram inoculadas plantas como explante, utilizando as concentrações 1,78 e 3,55 μM de BAP no meio de cultura, a porcentagem de sobrevivência foi de 3,56 e 3,68%. As concentrações intermediárias de 7,14 e 14,21 μM obtiveram índice de 2,37 e 2,43% de sobreviventes. O tratamento, sem regulador de crescimento, não diferiu estatisticamente dos tratamentos com concentrações intermediárias, em que se obtiveram 2,25% de sobreviventes. Já, o tratamento com maior concentração de BAP 28,42 μM obteve o menor índice de sobrevivência, 0,75% (Figura 1A). O mesmo comportamento foi observado na formação de

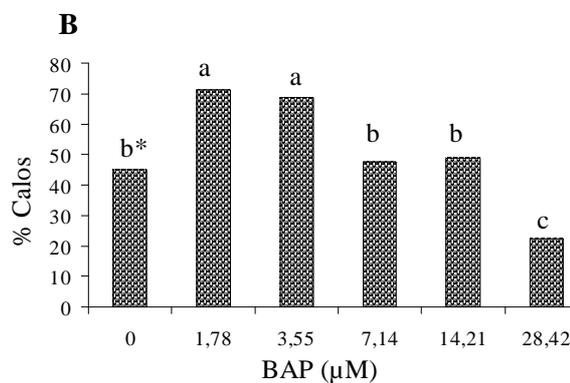
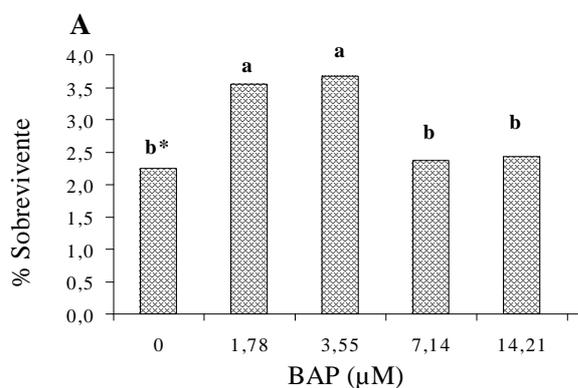
calos. As concentrações de 1,78 e 3,55 μM promoveram maiores porcentagens de calos 71,25 e 68,75%, respectivamente. As concentrações de 7,14 e 14,21 μM induziram 47,50 e 48,75%, e o tratamento sem regulador de crescimento, 45%. O tratamento com 28,42 μM também foi o que induziu à menor porcentagem de formação de calos (28,42%) (Figura 1B).

Com relação à utilização dos segmentos nodais, verificou-se que as porcentagens de sobreviventes, bem como as de indução de calos foram menores que aqueles alcançados, quando utilizada a planta toda como fonte de explante. No tratamento cujas concentrações de BAP foram de 1,78 e 3,55 μM no meio de cultura, obtiveram-se as maiores porcentagens de sobrevivência, que foram de 2,25% em ambos os tratamentos. O tratamento, sem adição de regulador de crescimento, obteve 2,0% de sobreviventes, e os tratamentos com as concentrações de 7,14; 14,21 e 28,42 μM obtiveram 1,62; 1,00 e 0,75% de sobreviventes, respectivamente (Figura 1C). Na formação de calos, as concentrações de 1,78 e 3,55 μM também foram superiores aos demais tratamentos, promoveram 52,50 e 49,96% de

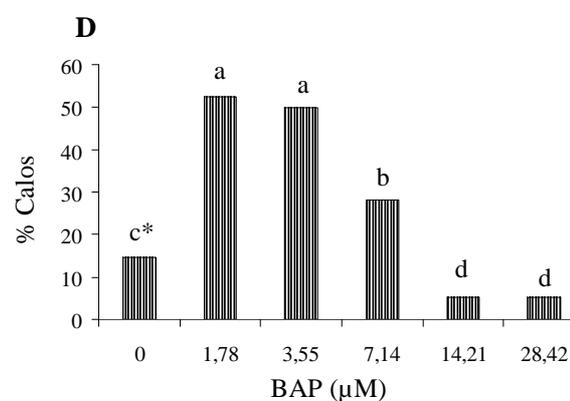
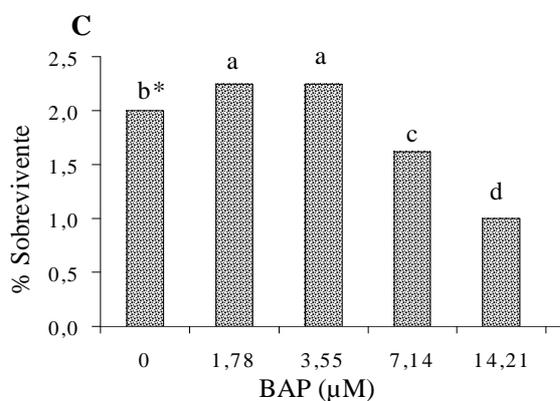
calos. O tratamento com a concentração 7,14 μM de BAP promoveu 28,19%, o sem regulador de crescimento, 14,61%. Nos tratamentos com as concentrações de 14,21 e 28,42 μM , obtiveram-se os menores e os mesmos valores de porcentagem de calos 5,17% (Figura 1D).

A presença de calos foi detectada 15 dias após a inoculação dos explantes. Em nenhum dos explantes utilizados ocorreu formação de brotos, sendo, no entanto, alta a formação de calos. Os calos, formados a partir da planta toda, eram maiores que os formados pelos segmentos nodais, porém estes estavam em maior número nos segmentos nodais. Eles eram friáveis, possuíam coloração que variavam entre o verde e o branco, com raras necroses. Verificou-se, também, que, em ambos os explantes, as concentrações mais elevadas de BAP acarretaram menor porcentagem de sobrevivência dos explantes e conseqüentemente menor formação de calos, que, com o passar dos dias, ficavam escuros e amarronzados e morriam. Tal fato ocorreu com maior amplitude quando se utilizaram os segmentos nodais como fonte de explantes.

Planta



Segmento Nodal



*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Figura 1. Indução de calos em *Syngonanthus mucugensis*. (A) Porcentagem de sobreviventes em plantas; (B) porcentagem de calos em plantas; (C) porcentagem de sobreviventes em segmento nodal e (D) porcentagem de calos em segmento nodal.

Vários trabalhos têm demonstrado que certos grupos de plantas respondem mais facilmente em culturas *in vitro* que outros, e estas diferenças mostram que as condições ideais variam com o genótipo em estudo (Flores *et al.*, 1998). Neste trabalho, verificou-se que tanto para a porcentagem de sobrevivência como para a formação de calos, em ambos os explantes utilizados, as melhores concentrações de BAP foram as com 1,7 e 3,1 μM (Figura 2). Segundo Pierik *et al.* (1982), o uso de até 44,39 μM de BAP e ausência total de auxina são ideais para otimizar a produção de calos em gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). Estudos realizados por Landa *et al.* (2000) certificam que segmentos foliares de pequi (*Caryocar brasilienses* Camb.), inoculados em meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com 2,22 e 4,44 μM de BAP, é capaz de induzir a formação de calos. Já, Pasqual e Hoshika (1992), estudando a proliferação *in vitro* de cactos (*Cactus gymnocalicium* L. e *Mammillaria Bocassana* L.), verificaram que a presença de calos foi menos frequente na ausência de BAP.

Outro fato interessante ocorrido, embora não muito convencional, foi a formação de calos na ausência de regulador de crescimento, que, em termos econômicos, é extremamente interessante, porém a não-utilização de reguladores de crescimento necessita de ensaios específicos, imprescindíveis para induzir a resposta esperada onde se devem testar diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento. Segundo Pinto e Pasqual (1990), certos tecidos sintetizam as quantidades de reguladores de que necessitam, enquanto outros são totalmente dependentes da adição exógena. Lima *et al.* (2002) também comprovaram isso por meio de estudos com mandioca (*Maniot esculenta* Crantz cv. MCOL 22), conseguindo a formação de calos a partir de 14 dias, em meio sem adição de regulador de crescimento. Resultados opostos foram evidenciados por Cerqueira *et al.* (2002) que não conseguiram a indução de calos em erva de touro (*Tridax procumbens* L.), na ausência de regulador de crescimento. Já, Silva *et al.* (2003) verificaram que a iniciação de calos, em carqueja (*Baccharis trimera* Less), é dependente de reguladores de crescimento e da concentração do meio. A melhor indução de calo ocorreu em meio MS, contendo 50% da concentração de sais, suplementado com 15,0 μM de ANA.

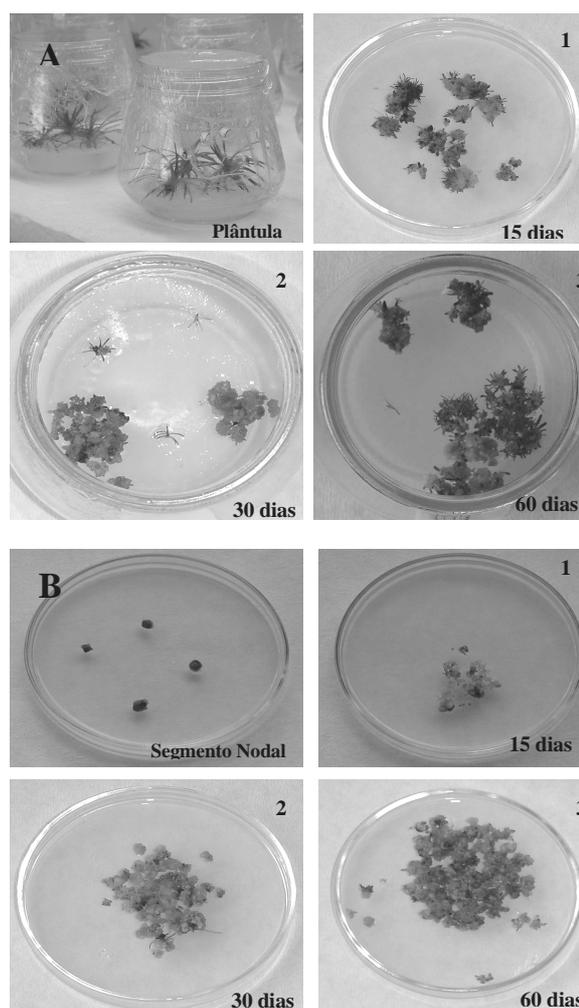


Figura 2. Indução de calos em *Syngonanthus mucugensis*. (A) utilizando planta toda como explante inoculado em $\frac{1}{2}$ MS adicionado a 3,55 μM (1) aos 15 dias, (2) aos 30 dias, (3) 60 dias, (B) utilizando segmento nodal como explante inoculado em $\frac{1}{2}$ MS, adicionado a 3,55 μM .

Desse modo, o comportamento observado no desenvolvimento de *Syngonanthus mucugensis*, nas condições testadas, sugere que a metodologia apresentada pode ser considerada eficiente para estudos do desenvolvimento vegetal e que, a partir dos resultados obtidos, novos estudos poderão ser inicializados como a obtenção de organogênese indireta, embriões somáticos e demais trabalhos relacionados ao melhoramento de planta.

Conclusão

Plantas e segmentos nodais de *Syngonanthus mucugensis* são explantes responsíves ao BAP, levando à formação de calos friáveis, sendo que produção significativa é obtida, utilizando-se as concentrações de 1,78 e 3,55 μM .

Referências

- CERQUEIRA, E.S. *et al.* Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. *Cienc. Agrotec.*, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.
- EINSET, J.W.A. practical guide to woody plant micropropagation. *Arnoldia*, Jamaica Plain, v. 46, p. 36-44, 1986.
- FERREIRA, D.F. *Sisvar*: versão 4.3. Lavras: DEX/UFLA, 2003.
- FLORES, R. *et al.* Calogênese in vitro de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. *Rev. Bras. Agrocienc.*, Pelotas, v. 4, n. 1, p. 9-14, 1998.
- GIULIETTI, A.M. Novas espécies no gênero *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). *Bol. Bot.*, São Paulo, v. 15, p. 63-71, 1996.
- GIULIETTI, A.M. *et al.* Estudos em sempre vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, Porto Alegre, v. 10, p. 329-377, 1996.
- GIULIETTI, N. *et al.* Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, Porto Alegre, v. 1, p. 179-193, 1998.
- LANDA, F.S.L. *et al.* Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.). *Cienc. Agrotec.*, Lavras, v. 24, edição especial, p. 56-63, 2000.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.
- LIMA, G.P.P. *et al.* Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* crantz cv mcol 22) cultivada in vitro. *Rev. Bras. Agrocienc.*, Pelotas, v. 8, p. 107-110, 2002.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society Proceedings*, New Jersey, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação in vitro de cactos *Gymnocalycium buldianum* L. e *Mammillaria bocassana* L. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 589-593, 1992.
- PAIXÃO-SANTOS, J. *et al.* Ajuste do meio MS para o cultivo in vitro de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti, espécie ameaçada de extinção. *Sitientibus. Ser. Cienc. Biol.*, Feira de Santana, v. 6, p. 36-39, 2006.
- PIERIK, R.L.M. *Plantenteelt in kweekbuizen*. 2. herz druk. Wageningen: Ponsen & Looijen, 1985.
- PIERIK, R.L.M. *et al.* Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* in vitro. *Neth. J. Agric. Sci.*, Wageningen, v. 30, p. 341-346, 1982.
- PINTO, J.E.B.P.; PASQUAL, M. *Introdução a cultura de tecidos*. Lavras: ESAL, 1990. (Apostila).
- SCATENA, V.L. *et al.* Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (Eriocaulaceae). *Acta Bot. Bras.*, Porto Alegre, v.18, n. 4, p. 825-837, 2004.
- SILVA, F.G. *et al.* Efeito da concentração de fitorreguladores na indução de calos em carqueja. *Cienc. Agrotec.*, Lavras, v. 27, p. 541-547, 2003.

Received on May 21, 2007.

Accepted on October 31, 2007.