

**CULTIVO *in vitro* DE *Abarema cochliacarpus* SOB DIFERENTES
MEIOS DE CULTURA****Elisângela Knoblauch V. de Andrade, Marília Poton Arcobeli Cola, Nina C.B. Silva,**

Centro de Ciências Agrárias- UFES - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Depto. Produção Vegetal, Alto Universitário s/n Cx Postal 16, Guararema, Alegre-ES, 29500-000, fone (28) 35529014, e-mail: elisangelak_agronomia@hotmail.com; marilia_agronomia@yahoo.com.br; ninacbs@cca.ufes.br;

Resumo- *Abarema cochliacarpus* é uma leguminosa arbórea nativa da Mata Atlântica com propriedades medicinais e encontrando-se ameaçada de extinção. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento *in vitro* de brotos sob diferentes meios de cultura adicionados ou não de reguladores de crescimento. Segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm contendo uma gema (lateral ou apical) foram inoculados isoladamente em tubos de ensaio contendo meio básico de Murashige & Skoog (MS) solidificado (ágar 7%) acrescidos ou não de cinetina (2,5 μ M e 5 μ M) ou GA₃ (2,5 μ M e 5 μ M) e meio WPM solidificado sem reguladores. Avaliou-se quinzenalmente os explantes quanto: porcentagem, comprimento de brotos, formação de calos e de raízes. As culturas foram mantidas em sala de cultivo com temperatura de 25 \pm 2°C e fotoperíodo de 16h. Os resultados obtidos apontam que o meio MS0 e MS+2,5 μ M cinetina é o mais indicado para a multiplicação da cultura.

Palavras chave: *Abarema cochliacarpus*; micropropagação; Leguminosae; planta medicinal

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Abarema cochliacarpus (Leguminosae - mimosoideae) é uma planta medicinal nativa brasileira encontrada na Mata Atlântica que apresenta porte arbóreo, atingindo até 8 metros de altura. Devido sua vulnerabilidade, é necessário criar meios alternativos para obtenção matéria prima que não envolvem o extrativismo.

Popularmente conhecida como “barbatimão”, o chá preparado com a casca do caule é utilizada em diferentes regiões do Brasil como cicatrizante, antiinflamatório, no combate a leucorréias, blenorragias e processos infecciosos epidérmicos (SILVA et al., 2005). Em laboratório, diversas atividades biológicas foram comprovadas, dentre elas cicatrizante, antiulcerogênica e analgésica (SILVA et al, 2009).

A cultura de células vegetais pode ser definida como a indução e proliferação de células a partir de uma parte vegetal isolada (explante), cultivadas de maneira asséptica em um meio com composição definida contendo substâncias nutritivas e reguladoras do crescimento vegetal, e mantida sob condições ambientais controladas (Torres et al., 1998).

As técnicas de cultura *in vitro* possibilitam a seleção das linhagens vegetais mais aptas às condições locais de cultivo, podendo ainda contribuir para a diminuição do extrativismo e, conseqüentemente, para a preservação de determinadas espécies e ecossistemas (EVANS et al., 1983) . O objetivo deste trabalho foi avaliar o

desenvolvimento *in vitro* de brotos sob diferentes meios de cultura adicionados ou não de reguladores de crescimento.

Metodologia

Sementes de *A. cochliacarpus* foram coletadas em indivíduos previamente demarcados geograficamente e identificados com depósito de exsicata em herbário (RB 365914).

Após desinfestação superficial, as sementes foram introduzidas em tubos de ensaio contendo meio de Murashige e Skoog (1962), sem hormônios (MS) suplementado com 30 g/L sacarose e solidificado com 8 g/L agar, pH 5,8 \pm 1, esterilizados em autoclave a 120° C e 1.1 Kgf/cm². As plântulas desenvolvidas foram transferidas para frascos contendo meio nutritivo para espécies lenhosas (WPM), descrito por Lloyd e McCown (1980) sem adição de reguladores de crescimento.

Para a obtenção dos brotos, epicótilos de plântulas com aproximadamente 1,0 cm cultivadas em meio WPM sem hormônios, contendo ao menos uma gema (lateral ou apical) foram inoculados isoladamente em tubos de ensaio contendo meio sólido (ágar 7%) nas seguintes composições: MS+5 μ M GA₃ (T1), MS+5 μ M cinetina (T2), MS sem reguladores (tratamento controle) (T3), WPM sem reguladores (T4). O experimento foi inteiramente casualizado com fatorial 4 X1 (quatro meios de cultura X 1 tipo de explante), três repetições e unidade experimental constituída de 10 tubos/ 1 explante (n=30).

Avaliaram-se quinzenalmente os explantes quanto: porcentagem, comprimento de brotos, formação de calos e de raízes. Foi realizado um segundo experimento devido à grande porcentagem de calos formados, onde foi utilizada a mesma cultura inicial. Segundo Grattapaglia e Machado, (1990) é comum a formação de calos nesses explantes em meios com altas doses de reguladores de crescimento. Para tentar controlar a formação desses calos, todos os hormônios tiveram a concentração reduzida a metade da dose inicial: MS+2,5µMGA₃ (T1), MS+2,5µM cinetina (T2).

As culturas foram mantidas em sala de cultivo com temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16h. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada com teste de Tukey com nível de fidelidade de 5%.

Resultados

O primeiro experimento realizado foi obtido após 26 semanas de cultivo, no qual o tratamento contendo o meio MS+5µM cinetina (T2) induziu na produção de brotos com maior comprimento, sendo esta diferença estatisticamente significativa apenas quando comparada com aos tratamentos sem reguladores de crescimento (MS0 (T3) e WPM (T4)) (Tabela 1).

Tabela 1 - tamanho médio (cm) dos brotos submetidos aos diferentes tratamentos com reguladores de crescimento *in vitro*.

Tamanho médio dos brotos

Meios	Semanas					
	4º	8º	12º	16º	20º	26º
T1	0,83ab	0,84a	0,71ab	0,80a	0,85ab	0,71ab
T2	0,98a	0,85a	0,83a	0,85a	0,92a	0,73a
T3	0,75ab	0,73ab	0,76ab	0,76ab	0,77ab	0,60b
T4	0,55b	0,50b	0,49b	0,51b	0,56b	0,59b

As médias seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os diferentes tratamentos na mesma semana.

Com relação à formação de raízes, os explantes cultivados no meio MS+5µM GA₃ (T1) apresentaram a menor porcentagem de raízes desenvolvidas (3,45%) comparadas com os demais meios. Entretanto, os explantes mantidos no meio MS + 5µM cinetina (T2) apresentaram elevada porcentagem de formação de calos (86,21%). A formação de calos também foi observada nos demais tratamento, porém em

porcentagens menores (Tabela 2). Todos os calos formados localizavam-se na base do explante.

Tabela 2- Porcentagem de calos e raízes formados após 26 semanas de cultivo.

Tratamentos	% Calos	% Raiz	(n)
T1	55,17	3,45	29
T2	86,21	13,79	29
T3	53,33	13,33	30
T4	44,44	11,11	9

O segundo experimento realizado foi obtido após 14 semanas de cultivo, e também obteve um resultado semelhante ao primeiro experimento em relação ao maior comprimento dos brotos contendo o meio MS+2,5µM cinetina (T2), embora esta tenha apresentado diferença estatística significativa quando comparada com o meio MS+2,5µM GA₃ (T1) e WPM (T4) (Tabela 3).

Tabela 3 - Tamanho médio dos brotos (cm) submetidos aos tratamentos com concentrações reduzidas dos reguladores de crescimento.

Tratamentos	Tamanho médio dos brotos			
	Semanas			
	4º	8º	12º	18*
T1	0,62ab	0,63b	0,60b	0,56b
T2	0,76a	0,85a	0,88a	0,85a
T3	0,69ab	0,73ab	0,82ac	0,74ab
T4	0,53b	0,60b	0,62bc	0,73ab

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste Tukey entre os tratamentos na mesma semana.

Comparando os resultados de tamanho de brotos obtidos ao final de 16 semanas no tratamento com a maior concentração de reguladores (Tabela 1) com aqueles obtidos após 18 semanas de cultivo nos meios com a concentração reduzida (Tabela 3), pode-se observar que a redução da concentração não interferiu no desenvolvimento dos brotos. Já a redução da concentração de GA₃ ocasionou uma diminuição do crescimento dos mesmos com redução da média de comprimento de 0,80 para 0,56 cm.

Foi observada a formação de calos em todos os tratamentos avaliados, em ambos os experimentos. Os explantes cultivados no meio MS + 2,5µM cinetina também apresentaram uma redução da de formação de raízes e de calos em relação ao primeiro experimento embora a

formação de calos tenha continuado elevada (70,0%) (Tabela 4)

Tabela 4 - Porcentagem de calos e raízes formados após 18 semanas de cultivo em meios com concentração reduzida de reguladores de crescimento.

Tratamentos	% Calos	% Raiz	(n)
T1	55,00	5,00	20
T2	70,00	7,50	40
T3	42,86	14,29	35
T4	33,33	27,78	18

Em geral, tanto o primeiro experimento quanto o segundo experimento o meio contendo GA₃ apresentou uma menor porcentagem de raízes formadas em relação aos outros meios *in cultivo*.

Discussão

Kochba et al. (1974) citam que a presença de ácido giberélico no meio de cultura proporciona a iniciação de uma zona meristemática radicular e/ou estimula o desenvolvimento de uma zona radicular existente. Todavia, quando aplicado em concentrações elevadas, impede a formação de raízes. Como observado neste trabalho, o meio contendo GA₃ obteve uma menor formação de raízes, quando comparados aos outros meios. Decetti (2000) relatou o efeito prejudicial do GA₃ no desenvolvimento de brotações de *Annona glabra*, além da ocorrência de necrose apical e abscisão foliar. Possivelmente, as concentrações utilizadas foram elevadas para *A. cochliacarpus* o que prejudicou seu enraizamento, sendo o conteúdo endógeno do explante suficiente para promover o enraizamento.

Segundo Santos (1998), elevadas concentrações de citocininas parecem interagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos provocando certa inibição no surgimento dos brotos. Em concentrações acima de 3,1 µM pode aumentar a formação de calos e o rosetamento das brotações em algumas espécies vegetais *in vitro* (LASZLOFFY et al., 1992). As citocininas influenciaram significativamente os processos de controle da organogênese, preferencialmente na formação de raízes, porém estas respostas são reguladas mais pelo balanço entre citocinina/auxina endógena do que pela concentração destas substâncias no meio de cultura.

Conclusão

Os resultados obtidos apontam que os meios MS0 e MS + 2,5µM cinetina são os mais indicados para a multiplicação da cultura, pois apresenta os melhores resultados quanto ao tamanho médio dos brotos. No entanto, novos experimentos são necessários visando identificar a concentração ideal de citocininas e auxinas utilizadas para promover a micropropagação *in vitro*.

Referências

- EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture**. Vol. I. New York: MacMillan Publishing Co. 1983. 970 p.
- DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p.99-169.
- LASZLOFFY, K.; KADER, A.M.A.; MATHE, A. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. **Acta Horticulturae**, n. 300, p. 149-154, 1992.
- LOYD, G. e McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Intern. Plant Propag. Soc. Proceed.**, 30: 421-427, 1980.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHABA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acids and adenine sulphate. **Annals of Botany**, London, v. 38, p. 795-802, 1974.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 15: 473-497, 1962.
- SANTOS, M.R.A. Germinação, calogênese e caracterização e saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. 1998. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.
- SILVA, R. B. L. et al. **Asteraceae medicinais da Comunidade Quilombola de Curiaú, Macapá-AP**, Brasil. In: 56º Congresso Nacional de Botânica. Curitiba PR, 2005.
- SILVA, N.C.B. et al.. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby &

XIV INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

X EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

IV INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

J.W.Grimes (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(1A): 46-50, Jan./Mar. 2009;

- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.)
Cultura de tecidos e transformação de plantas.
Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH. 2v. 1998.