



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

ESTRESSE COMO INDUTOR DA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Comanthera mucugensis*

**Fernanda de Jesus Oliveira Bastos¹; Andressa Priscila Piancó Santos Lima²
Alone Lima-Brito³**

1. Bolsista FAPESB, Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nandahhbastos@hotmail.com
2. Doutora em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: andressapianco@gmail.com
3. Orientadora, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lima_brito@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo *in vitro*; sempre- viva; manitol

INTRODUÇÃO

Comanthera mucugensis (Giul.) L.R. Parra & Giul. é considerada como uma das mais importantes sempre-vivas do país, esse encontra na Lista Vermelha de espécies em perigo de extinção. Diante disso, é necessária a realização de estudos que visem à propagação dessa espécie, que podem ser realizados através da cultura de tecidos vegetais, por meio da micropropagação.

Esta técnica possibilita a indução de brotos *in vitro*, que pode ser realizada, dentre outras maneiras, por meio do estresse, como o osmótico ou salino, através da adição de diferentes substâncias ao meio de cultura, sendo uma alternativa de baixo custo em relação à utilização de reguladores vegetais. Dentre os agentes osmóticos está o manitol que é responsável por modificar o potencial da água no meio de cultura (Silva *et al.*; 2016). Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos de estresse salino *in vitro* com a utilização de sais, a exemplo do Cloreto de Sódio-NaCl, testado por Brandão *et al.* (2016) e Melo *et al.* (2011) na indução de brotos.

Diante da ausência de relatos na literatura de trabalhos com a utilização do estresse como indutor da multiplicação *in vitro* de *Comanthera mucugensis*, e tendo em vista a redução de custos de produção das microplantas, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de *C. mucugensis* pela multiplicação *in vitro* por estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

As sementes de *C. mucugensis* foram coletadas no Parque Nacional de Mucugê, em Mucugê-Ba, e estabelecidas *in vitro*. As plântulas germinadas *in vitro* com dois meses de idade foram utilizadas como explantes.

Efeito do Cloreto de Sódio- NaCl na indução de brotos de *C. mucugensis*

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura WPM (Lloyd & Mc Cown, 1981) com 17,5 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e 1 g.L⁻¹ de carvão ativado acrescido de diferentes concentrações de Cloreto de Sódio-NaCl (0,00; 5; 10; 20; 40mM). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cinco tratamentos com cinco repetições, e cinco amostras por repetição. Cada amostra com um explante. Após 60 dias foram avaliadas a porcentagem de

sobrevivência (%S) e de explantes responsivos (%ER), e o número de brotos por explante (NB).

Efeito dos agentes osmóticos sacarose e manitol na indução de brotos de *C. mucugensis*

As plântulas foram inseridas em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade das concentrações salinas (MS ½), acrescido de 7 g.L⁻¹ de ágar, com diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 g.L⁻¹) e manitol (0,00; 7,8; 15,6; 23,4; 31,2 g.L⁻¹). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3 x 5 (três concentrações de sacarose e cinco de manitol) totalizando 15 tratamentos, com cinco repetições por tratamento e quatro amostras por repetição com um explante cada. Decorrido 100 dias da montagem do experimento foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência (%S), porcentagem de explantes responsivos (%ER), número de brotos por explante (NB) e comprimento do maior broto (CMB).

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sobre temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16h e radiação fotossintética ativa de 60 μmol.m⁻².s⁻¹. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 Ferreira (2003) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Em geral, após 60 dias, as plantas apresentaram coloração verde escuro até a concentração de 10 mM, no entanto a partir da concentração 20 mM as folhas entraram em senescência. A análise de variância demonstrou efeito significativo (p ≤ 0,05) para as variáveis porcentagem de sobrevivência (%S), de explantes responsivos (%ER), e o número de brotos por explante (NB).

Para a %S a análise de regressão apresentou modelo linear decrescente como o mais representativo demonstrando que na medida em que as concentrações de NaCl foram aumentando ocorreu um decréscimo nas taxas, atingindo 12% de sobrevivência (Figura 1). Com relação à %ER a análise de regressão apresentou modelo polinomial quadrático como o mais adequado, indicando que a adição do NaCl ao meio de cultura promoveu um aumento na taxa de explantes responsivos atingindo o ponto máximo na concentração 20,78 mM, desse ponto em diante o aumento da concentração de NaCl promoveu a redução da taxa de explantes responsivos (Figura 2).

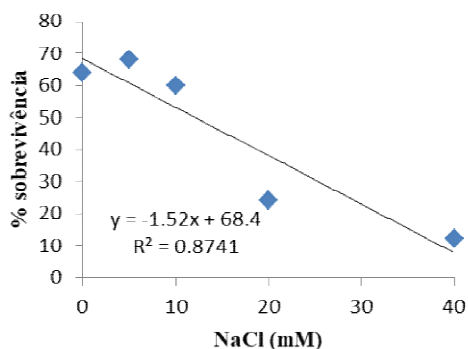


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de NaCl na porcentagem de sobrevivência (%S) de plantas de *Comanthera mucugensis* após 60 dias de cultivo *in vitro*.

*Significativo a 5% de probabilidade.

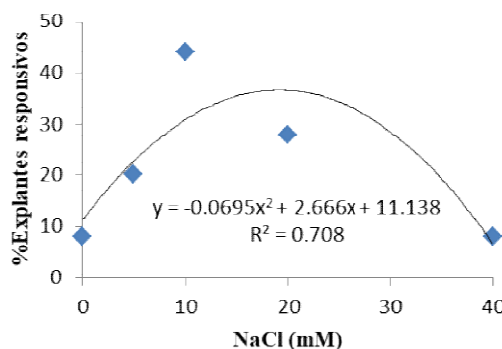


Figura 2. Porcentagem de explantes responsivos (%ER) com brotos de *C. mucugensis* em função de diferentes concentrações de NaCl.

*Significativo a 5% de probabilidade

Já para o NB as maiores médias foram nas concentrações de 5mM, 10 mM e 20mM que tiveram 1,12; 2,60 e 0,72 brotos respectivamente por organogênese direta,

não diferindo estatisticamente entre si, contudo diferiram do controle que apresentou 0,08 para NB (Tabela 1). Verifica-se que o uso do NaCl é vantajoso uma vez que reduz os custos de produção comparado com uso de reguladores vegetais.

Tabela 1. Efeito do NaCl no número de brotos (NB) de *Comanthera mucugensis* após 60 de cultivo *in vitro*.

NaCl (mM)	NB
0	0,08 b
5	1,12 ab
10	2,6 a
20	0,72 ab
40	0,24 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação asplântulas submetidas ao efeito de sacarose e manitol, após 100 de cultivo *in vitro* foi observado o surgimento de brotos via organogênese direta nos diferentes tratamentos, e a presença de folhas senescentes a partir da concentração de 15,6 g.L⁻¹ de manitol.

Para as variáveis porcentagem de sobrevivência (%S) e número de brotos (NB) a análise de variância apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) da interação sacarose x manitol. Já para a porcentagem de explantes responsivos (%ER) e comprimento do maior broto (CMB) a análise de variância apresentou efeito significativo isolado do manitol ($p \leq 0,05$).

Observou-se que para a variável %S as concentrações de 15g.L⁻¹ e 30 g.L⁻¹ de sacarose combinadas com as diferentes concentrações de manitol, obtiveram altas taxas de sobrevivência e não apresentaram diferença estatística entre si. Já na concentração de 45 g.L⁻¹, nota-se a interação dupla representada pela taxa de 25%, quando em associação com 31,2g.L⁻¹ de manitol (Tabela 2).

Quanto ao NB, verificou-se que houve interação dupla para as concentrações de 30 g.L⁻¹ de sacarose associado com 7,8 g.L⁻¹ de manitol, com média de 3,15. (Tabela 2).

Para a %ER a maior média foi de 71,6% , obtida foi na concentração de 7,8 g.L⁻¹ de manitol, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 3).

Já para o CMB a média encontrada na concentração de 7,8 g.L⁻¹ de manitol não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle, contudo diferiu dos demais tratamentos que apresentaram redução para o CMB com o aumento da concentração desse agente osmótico (Tabela 3). Os agentes osmóticos quando adicionados ao meio reduzem a absorção de água e minerais pelas células, e conseqüentemente limita o crescimento das plantas (Souza *et al.*; 2009).

Tabela 2. Efeito das concentrações de sacarose e manitol na porcentagem de sobrevivência (%S) e número de brotos (NB) de *Comanthera mucugensis* após 100 dias de cultivo *in vitro*.

Manitol (g.L ⁻¹)	%S		
	Sacarose (g.L ⁻¹)		
	15	30	45
0,0	100 Aa	100 Aa	70 Bab
7,8	100 Aa	95 Aa	100 Aa
15,6	95 Aa	85 Aa	70 Aab
23,4	90 Aa	75 Aa	40 Bbc
31,2	95 Aa	80 Aa	25 Bc

NB			
Sacarose (g.L ⁻¹)			
Manitol (g.L ⁻¹)	15	30	45
0,0	0,45 Aa	0,75 Ab	0,62 Ab
7,8	0,92 Ca	3,15 Ba	5,95 Ab
15,6	0,15 Aa	0,20 Ab	0,30 Ab
23,4	0,00 Aa	0,30 Ab	0,25 Ab
31,2	0,35 Aa	0,70 Ab	0,25 Ab

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3. Efeito do manitol nas variáveis porcentagem de explantes responsivos (%ER) e comprimento do maior broto (CMB) de *Comanthera mucugensis* após 100 dias de cultivo *in vitro*.

Manitol (g.L ⁻¹)	%ER
0,0	34,6 b
7,8	71,6 a
15,6	11,6 c
23,4	6,6 c
31,2	18,3 bc

Manitol (g.L ⁻¹)	CMB (cm)
0,0	0,34 a
7,8	0,30 a
15,6	0,13 b
23,4	0,05 b
31,2	0,08 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

CONCLUSÃO

O estresse salino com NaCl e o estresse osmótico obtido com a combinação de 30 g.L⁻¹ de sacarose com 7,8 g.L⁻¹ de manitol são indicados para a indução de brotos *in vitro* de *C. mucugensis*.

REFERÊNCIAS

- BRANDÃO, I. R. et al. Micropropagação e estresse salino no aumento de compostos bioativos em plantas de *Alternanthera brasiliana*. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa- Congrega Urcamp**, p. 815-828, 2016.
- LODY, G.; MC COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416
- MELO, Y. L. et al. Indicadores de estresse salino em abacaxizeiro cultivado na ausência e presença de fitorreguladores. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 698-705, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- SILVA, Natália Dias Gomes et al. Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016
- SOUZA, A da S. et al. Preservação de Germoplasma Vegetal, com Ênfase na Conservação *in vitro* de Variedades de Mandioca. **Circular Técnica**. Cruz das Almas, Ba, 2009.