



Concentrações de benzylaminopurina e agentes gelificantes no cultivo *in vitro* de pau-ferro

Loriene de Oliveira Silvério¹, Elaine Martins Barbosa², Priscila Wolski Lucas Marques³,
Jaqueline Lima da Conceição Souza⁴, Kerly Cristina Pereira⁵, Muza do Carmo Vieira⁶, Eli
Regina Barboza de Souza⁷

Resumo

Objetivou-se estabelecer uma metodologia de micropropagação de pau-ferro utilizando concentrações de benzylaminopurina (BAP) e agentes gelificantes. As sementes foram coletadas e beneficiadas no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Federal Goiano-Campus Urutaí. Por meio de avaliação visual foram divididas em três tamanhos: pequeno, médio e grande e obtiveram-se dados de massa e diâmetro. Para o cultivo *in vitro* as sementes passaram por pré-lavagem com detergente e água, e foram submetidas à quebra de dormência tegumentar, utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄). Realizou-se a desinfestação com detergente e posterior imersão em álcool etílico 70% por 5 minutos. Em sequência foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% por 30 minutos, seguidas por 3 lavagens com água. A inoculação das sementes foi realizada em meio MS 50,0% suplementado acrescidos de BAP nas concentrações (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; e 1,2 mg L⁻¹) associados à diferentes agentes gelificantes (ágar ou phytigel). Após inoculação, as sementes foram colocadas em ambiente de meia luz por 24 horas para indução de germinação, em T° de 29°C + 2°C, e logo após em sala de crescimento e luminosidade com fotoperíodo de 16 horas de 40 μmol m⁻² s⁻¹. Foram analisados: porcentagem de germinação; índice de contaminação e oxidação, número de par de folhas; altura da planta; comprimento da raiz principal; massa fresca e seca da planta. Constatou diferenças entre os tamanhos das sementes de pau-ferro e não houve efeito significativo entre ágar e phytigel para o número de par de folhas; altura; comprimento da raiz principal e massa seca.

Palavras-Chave: *Caesalpinia paraguariensis*, micropropagação, meio de cultura.

Concentrations of benzylaminopurine, and gelling agents *in vitro* culture of pau-ferro. The objective was to establish a methodology for micropropagation of ironwood using concentrations of benzylaminopurine (BAP) and gelling agents. The seeds were collected and processed at the Biotechnology Laboratory of the Instituto Federal Goiano-Campus Urutaí. Through visual evaluation, they were divided into three sizes: small, medium and large, and mass and diameter data were obtained. For *in vitro* cultivation, the seeds were pre-washed with detergent and water, and were subjected to break of integumentary dormancy, using sulfuric acid (H₂SO₄). Disinfestation with detergent and subsequent immersion in 70% ethyl alcohol was carried out for 5 minutes. Then, they were immersed in

¹ Tecnóloga Gestão Ambiental, Instituto Federal Goiano, Urutaí, lorienesilverio28@gmail.com

² Tecnóloga Gestão Ambiental, Instituto Federal Goiano, Urutaí, elaine.pdr@hotmail.com

³ Bióloga, Instituto Federal Goiano Campus Trindade, priscila_wolski@hotmail.com

⁴ Pós-doutoranda em Produção Vegetal, Escola de Agronomia, UFG, jaquelinelima.745@gmail.com

⁵ Doutora em Agronomia, Instituto Federal Goiano, Urutaí, kerlycp2000@yahoo.com.br

⁶ Téc. Instituto Federal Goiano, Urutaí e Pós doutoranda Agronomia UFG, mcvmuza@gmail.co

⁷ Professora Adjunta, UFG, eliregina1@gmail.com



sodium hypochlorite (NaClO) at 2.5% for 30 minutes, followed by 3 washes with water. Seed inoculation was performed in 50.0% supplemented MS medium plus BAP in concentrations (0.0; 0.3; 0.6; 0.9; and 1.2 mg L⁻¹) associated with different gelling agents (agar or phytigel). After inoculation, the seeds were placed in a half-light environment for 24 hours for germination induction, in T° of 29°C + 2°C, and immediately afterwards in a growth and light room with a 16-hour photoperiod of 40 µmol m⁻² s⁻¹. The following were analyzed: percentage of germination; contamination and oxidation index, number of leaves pair; plant height; main root length; fresh and dry mass of the plant. It found differences between the sizes of ironwood seeds and there was no significant effect between agar and phytigel for the number of leaves; height; main root length and dry mass.

Keywords: *Caesalpinia paraguariensis*, micropropagation, culture medium.

1. Introdução

A cultura de tecidos apresenta o objetivo de fornecer uma alternativa de manipulação de plantas em nível molecular. Esta possui uma importância prática às áreas agrícolas, florestais e científicas básicas, como a biologia de plantas, sendo, portanto, umas das técnicas mais polivalentes (QUISEN; ANGELO, 2008).

Dentre as várias aplicações da cultura de tecidos está a micropropagação que é considerada a mais utilizada e de maior impacto. No setor florestal, tem sido empregada devido à possibilidade de propagar genótipos-elite os quais são selecionados sem a perda da árvore matriz, rejuvenescimento e apoio a programas de melhoramento genético (WENDLING; DUTRA, 2017). Na micropropagação segmentos de plantas (gemas, ápices caulinares, meristemas, fragmentos de folhas e raízes) são cultivados em ambiente asséptico (laboratório) em frascos específicos contendo meio nutritivo adequado proporcionando à obtenção de milhares de plantas idênticas a planta mãe (ULISSES et al., 2010).

O sucesso da micropropagação de plantas é influenciado por diversos fatores, como por exemplo, o meio nutritivo. O meio nutritivo é composto por

diversas substâncias, dentre elas os reguladores de crescimento, como as citocininas que apresentam função de indução da divisão celular em tecidos vegetais. Portanto, estas são relevantes para formação de órgãos, especialmente, os aéreos. A benzylaminopurina (BAP) corresponde a uma citocinina sintética utilizada na multiplicação *in vitro* (LUCAS et al., 2007).

Os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos. Os meios sólidos e semi-sólidos, são solidificados com ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. Altas concentrações de ágar, ou meios mais consistentes podem limitar a difusão de nutrientes até o explante. As gomas do tipo 'gelan', produzidas por certas bactérias e comercializadas com o nome de phytigel, também solidificam o meio. Estas são mais transparentes, atóxicas e resistem à degradação enzimática (CALDAS et al., 1998).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de obter um meio nutritivo que apresente as substâncias com concentrações ideais que favoreçam a germinação e o desenvolvimento em plantas cultivadas *in vitro*. Sabe-se que cada espécie responde de um modo diferente a um meio. Assim, torna-se necessário a avaliação destes na espécie de interesse. Nesse contexto, objetivou-se estabelecer um protocolo



de micropropagação de pau-ferro (*Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burkart) por meio da germinação e desenvolvimento de plântulas *in vitro*, observando a resposta desta espécie submetida a diferentes concentrações de benzylaminopurina e agentes gelificantes (ágar ou phytigel).

2. Material e Métodos

2.1 Coleta das sementes

As sementes foram coletadas de plantas matrizes com bom aspecto fitossanitário e de ocorrência natural localizadas no município de Ipameri-GO. Após a coleta dos frutos foi realizada a extração das sementes e selecionaram-se as que estivessem livres de impurezas e que não apresentassem ataques de pragas e doenças. Posteriormente, foram armazenadas em sacos de papel Kraft pelo período de doze meses.

2.2 Caracterização física das sementes

O levantamento da caracterização física foi realizado obtendo a massa (g), por meio de balança semianalítica de precisão (0,001 g), e os diâmetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital. As sementes foram divididas em três tamanhos: pequeno, médio e grande por meio de avaliação visual, realizado por três avaliadoras treinadas. Desta forma, obteve-se a massa média em gramas de 50 sementes pequenas, médias e grandes. Essa padronização é interessante, pois assim é possível avaliar se os tamanhos das sementes influenciam no seu processo germinativo. Além disso, ao verificar diferenças significativas entre os tamanhos é possível definir índices e protocolos para cada tamanho.

2.3 Inoculação, geminação e desenvolvimento *in vitro*

As sementes passaram por pré-lavagem com detergente e água,

realizadas na sala de preparo. Em sala de fluxo laminar, foram submetidas à quebra de dormência tegumentar, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) por 11 minutos. Após a quebra de dormência estas passaram por desinfestação com detergente com posterior imersão em álcool etílico 70% por 5 minutos. Logo após foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% por 30 minutos sob constante agitação, seguidas por 3 lavagens com água destilada e autoclavada.

A inoculação das sementes foi realizada em tubos de ensaio de 15 mm x 25 mm, contendo 8 mL de meio básico (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, acrescidos de ácido naftalenoacético (ANA) a 0,25 mg L⁻¹; Inositol a 0,1 g L⁻¹; Thiamina a 1 mg L⁻¹; Ácido málico a 1 mg L⁻¹; Carvão ativado a 1 g L⁻¹; e Sacarose a 15 g L⁻¹. Ainda, foram acrescidas diferentes concentrações de BAP associados à ágar a 3,5 g L⁻¹ ou phytigel a 1,8 g L⁻¹ (Tabela 1).

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, sendo dois gelificantes (ágar e phytigel) e cinco concentrações de BAP (Tabela 1). Inoculou-se uma semente de pau-ferro em cada tubo de ensaio, repetido 15 vezes por tratamento, totalizando 150 tubos inoculados.

O ensaio foi conduzido no laboratório em ambiente com utilização de luz indireta por 24 horas para indução de germinação, em temperatura de 25°C + 2°C. Em seguida, as sementes germinadas foram estabelecidas em temperatura de 29°C + 2°C e luminosidade de 40 micro Mols, de 40 W, fornecidas por lâmpadas fluorescentes, luz do dia, com fotoperíodo de 16 horas. O pH foi ajustado para 5,6 + 2 antes da esterilização a 1,5 atm, a 120°C por 20 minutos.



Tabela 1 - Tratamentos avaliados, Urutá-GO, 2020

Gelificantes	Conc. de BAP (mg L ⁻¹)
Ágar	0,0
	0,3
	0,6
	0,9
	1,2
Phytigel	0,0
	0,3
	0,6
	0,9
	1,2

2.4 Variáveis analisadas

As avaliações foram realizadas diariamente com intuito de verificar a taxa de entumescimento das sementes; germinação; contaminação; e oxidação. Aos 47 dias após a inoculação foi realizada leitura para obtenção dos dados finais: porcentagem de germinação; índice de contaminação e oxidação; número de par de folhas; altura da planta (cm); comprimento da raiz principal (cm); massa fresca e seca (g) da planta incluindo parte aérea mais a raiz.

Os dados obtidos das variáveis analisadas foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e, quando significativos, foram feitos o teste de comparação de médias Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software SISVAR (FERREIRA, 2010).

3. Resultados e Discussão

Houve diferenças significativas entre os tamanhos das sementes de pau-ferro. As sementes grandes distinguiram-se do tamanho médio e pequeno apresentando maior diâmetro longitudinal e transversal. Isso demonstra que foi encontrado heterogeneidade nas sementes de pau-ferro coletadas de plantas localizadas no mesmo local de

ocorrência. Contudo, este efeito não foi observado para a variável massa das sementes (Tabela 2).

A avaliação do tamanho das sementes é importante, já que segundo Carvalho e Nakagawa (2000) sementes que apresentam tamanhos e densidade maiores normalmente apresentam embriões bem formados e com quantidades de reservas superiores, sendo, portanto, mais vigorosas.

Tabela 2 - Valores médios de diâmetro longitudinal (DL), diâmetro transversal (DT), massa de sementes (M), referentes à caracterização física de 50 sementes de tamanhos, pequeno, médio e grande, provenientes de *Caesalpinia paraguariensis*, coletadas na região de Ipameri-GO. Urutá-GO, 2020.

Tamanho	DL	DT	M
Pequeno	7,23 c	5,57 c	0,09 a
Médio	7,65 b	5,58 b	0,09 a
Grande	7,71 a	5,63 a	0,09 a
Média Geral	7,53	5,59	0,09

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos cinco dias após a inoculação constata-se que nenhum dos tratamentos apresentava contaminação por fungo ou bactéria, assim como não demonstrava oxidação no meio de cultura. Nesse mesmo período, todas as sementes demonstravam entumescimento. O entumescimento da semente até a emissão da radícula consiste-se nas primeiras manifestações da germinação (ROSA et al., 2005).

Neste período, o valor médio de germinação (10,80%) dos tratamentos em que se utilizou o ágar diferiu-se do phytigel (1,40%). O ágar constitui-se como o agente gelificante mais utilizado em meios de cultura para tecidos vegetais desde que foi introduzido, há mais de 100 anos. Dentre suas vantagens estão a sua alta estabilidade, clareza e

resistência ao metabolismo durante o período de cultivo (JAIN; BABBAR, 2002).

Apesar disso, essa diferença entre os agentes gelificantes não foi verificada no décimo dia para a germinação. Este resultado é interessante já que demonstra que independente do gelificante os índices de germinação não se distinguem. Desta forma, o ágar pode ser suprido pelo phytigel no cultivo *in vitro* de pau-ferro. Segundo Babbar et al. (2005) a substituição do ágar por outros polissacarídeos como o phytigel melhoram a produção de brotos e reduz os custos da micropropagação em até 90%.

Averiguou-se que após os 10 dias da inoculação (Figura 1), os índices de oxidação e contaminação permaneceram os mesmos que nas primeiras leituras (0,0%). Este resultado é importante, levando em conta que quando há contaminação os microrganismos competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura. Ainda, elimina no meio metabólitos tóxicos, o que pode ocasionar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2003).

O índice de entumescimento foi de 100% em todos os tratamentos avaliados no 10º dia e a germinação (Figura 1) iniciou-se no 4º dia após a inoculação se estendendo até o 25º com pico aos 10 dias.

As concentrações de benzylaminopurina aos 10 dias da inoculação demonstraram efeito significativo quando se utilizou o ágar, sendo que ao derivar a equação ($y = 31,746x^2 - 29,429x + 21,714$) obteve-se maior germinação com o uso de 0,46 mg L⁻¹ de BAP (Figura 2).

A contaminação por microrganismos (fungos; e bactérias) (Figura 3) foi observada aos 12 dias após a inoculação havendo somente um tubo contaminado por fungo com o

tratamento ágar+0,9 mg L⁻¹ de BAP e um tubo contaminado por bactéria (phytagel+0,6 mg L⁻¹). Esses índices de contaminação permaneceram os mesmos até o final do experimento.

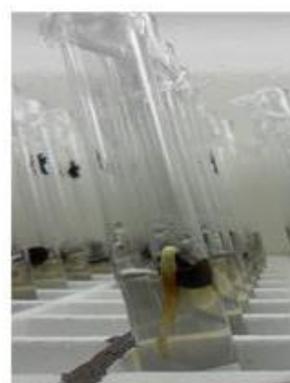
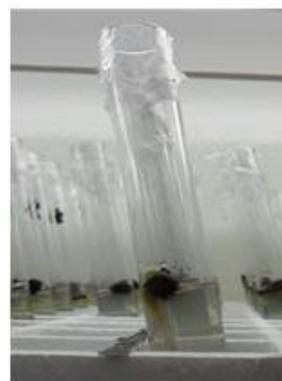


Figura 1 - Início da germinação das sementes de pau-ferro (*Caesalpinia paraguariensis*). Urutaí-GO, 2020.

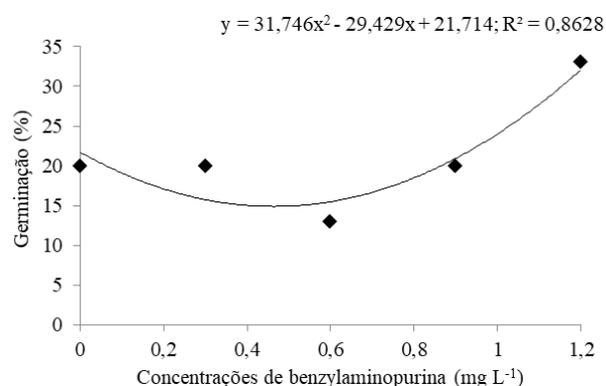


Figura 2 - Germinação de sementes de *Caesalpinia paraguariensis* com o uso do gelificante ágar no meio nutritivo. Urutaí-GO, 2020.



(A)

Figura 3 - Sementes de *Caesalpinia paraguariensis* inoculadas *in vitro* com contaminação por fungo (A); e contaminação por bactéria (B).

A formação de gemas apicais foi independente da utilização de benzylaminopurina. Com a utilização do ágar não houve distinção entre as concentrações de BAP para número de par de folhas que apresentou valor médio igual a 4,0. Em contrapartida, o uso de phytigel associado às concentrações de BAP demonstrou que a utilização de 0,39 mg L⁻¹ de BAP garante maior número de par de folhas (Figura 4). De acordo com Carvalho et al. (2006) o tipo de citocinina, bem como sua concentração é importante para que haja um bom desenvolvimento da multiplicação *in vitro*.

Além disso, quando a maior quantidade de folhas é importante, principalmente porque esta é considerada um órgão fonte, sendo responsável pela produção de assimilados a partir da fotossíntese. Os

assimilados podem ser usados como fonte energética da planta por meio da respiração e podem ser transportados e armazenados temporariamente em órgãos de reserva ou nos drenos, representados pelas raízes, meristemas e frutos das plantas (DUARTE; PEIL, 2010).

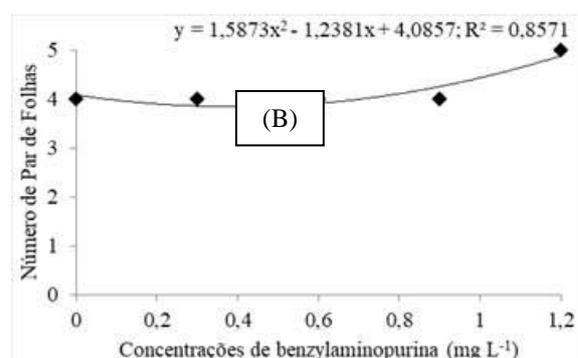


Figura 4. Número de par de folhas de *Caesalpinia paraguariensis* com o uso do gelificante phytigel no meio nutritivo. Urutaí-GO, 2020.

O número de par de folhas, altura, comprimento da raiz principal e massa seca não apresentaram efeito significativo entre os dois gelificantes utilizados. Já para massa fresca o phytigel evidenciou média superior (0,49 g) ao ágar (0,35 g).

A altura não diferiu entre as concentrações de BAP tanto com o uso de ágar que obteve valor médio de 6,94 cm quanto para phytigel (7,52 cm). O mesmo foi obtido para comprimento da raiz principal cujos valores foram 6,7 cm (ágar) e 6,58 cm (phytagel).

O uso das concentrações de BAP combinado ao ágar não exibiu efeito significativo para massa fresca. As médias apresentadas pelos tratamentos foram: 0,47 g (0,0 mg L⁻¹); 0,24 g (0,3 mg L⁻¹); 0,43 g (0,6 mg L⁻¹); 0,25 g (0,9 mg L⁻¹) e 0,38 g (1,2 mg L⁻¹). A equação ($y = -0,1984x^2 + 0,1681x + 0,4963$) indicou que o uso de phytigel com a concentração 0,42 mg L⁻¹ favoreceu maior massa fresca.



4. Conclusão

Houve heterogeneidade entre as sementes de pau-ferro coletadas de plantas matrizes de Ipameri-GO. Não foram constatadas diferenças entre o uso de ágar e phytigel para germinação, número de par de folhas, altura, comprimento da raiz principal e massa seca total da planta. A concentração de 0,39 mg L⁻¹ de BAP mais o phytigel proporcionam maior número de par de folhas. A concentração de 0,42 mg L⁻¹ associado ao uso de phytigel favorece maior número de massa fresca.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal Goiano Campus Urutaí por toda infraestrutura necessária à realização desta pesquisa.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

BABBAR, SB; JAIN, R.; WALIA, N. Goma guar como agente gelificante para meios de cultura de tecidos vegetais. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.41, p.258-261, 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / EmbrapaCNPq, p. 87-130, 1998.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. **Considerações**

Gerais sobre Organogênese. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 26 p. (Embrapa Algodão; Documentos, 150).

DUARTE, T. S.; PEIL, R. M. Relações fonte: dreno e crescimento vegetativo do meloeiro. **Horticultura brasileira**, v. 28, n. 3, 2010.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3**. Lavras-MG: UFLA, 2010.

JAIN, N.; BABBAR, S. H. Gum katira - a cheap gelling agent for plant tissue culture media. **Plant Cell Organ Cult.**, v. 71, p. 223-229, 2002.

LUCAS, M. A. K.; FAGUNDES, J. D.; PEREIRA, D. D.; SARMENTO, M. B. Micropropagation of African-Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): Effect of Benzylaminopurine on multiplication. **Ciênc. Agrotec.**, v. 31, n. 5, p. 11380-1385, 2007.

MURASHIGE, T, SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n. 7, p. 827-834, 2003.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos de Laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 61).

ROSA, L, S.; FELIPPI, M.; NOGUEIRA, A. C.; GROSSI, F. Avaliação da germinação sob diferentes potenciais osmóticos e caracterização morfológica da semente e plântula de *Ateleia glazioviana* Baill (Timbó). **Cerne**, v. 11, n. 3, p. 306-314, 2005.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 7, p. 86-91, 2010.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. **Produção de mudas de eucalipto**. Brasília: Embrapa Florestas, 2017. 192 p.