

MICROPROPAGAÇÃO DE VIOLETA-AFRICANA: ESTABELECIMENTO E INICIAÇÃO DE CULTURAS COM A UTILIZAÇÃO DE BENZILAMINOPURINA E ÁCIDO INDOLACÉTICO

Micropropagation of African-Violet: establishment and initiation of cultures with use of Benzylaminopurine e Indolacetic Acid

Marco Antônio Karam Lucas^{1*}, Joelma Dutra Fagundes², Denise Dias Pereira¹, Marcelo Benevenga Sarmento³

RESUMO

A violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) é uma planta ornamental propagada vegetativamente através de cultura de tecidos e por estaquia. Poucas informações existem sobre o efeito conjunto da Benzilaminopurina (BAP) e do Ácido Indolacético (AIA) no estabelecimento e na iniciação de culturas de violeta-africana. Este trabalho teve como objetivo determinar o efeito destes reguladores de crescimento na referida etapa de estabelecimento e iniciação *in vitro* de violeta-africana. Como explantes foram utilizadas seções foliares triangulares selecionados da cultivar Optimara Miki. Os tratamentos foram organizados de modo a comparar diferentes combinações de BAP e AIA BAP (0,44 μ M) combinado com AIA (0,0; 2,86; 5,71; 8,57; 11,42 e 14,28 μ M); BAP (0,00; 0,22; 0,44; 0,89; 1,33; 1,78 e 2,22 μ M) combinado com AIA (11,42 μ M); BAP (0,11; 0,22; 0,33 e 0,44 μ M) combinado com AIA (2,86; 5,71; 8,57 e 11,42 μ M). O meio de cultura utilizado foi o MS suplementado com mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹) e ágar (7 g.L⁻¹). Durante o experimento os explantes permaneceram sete dias na ausência de luz seguidos de 38 dias sob densidade de fluxo luminoso de 40 μ mol.cm⁻².s⁻¹, 14 horas de fotoperíodo e temperatura de 24 \pm 2 °C. A adição de BAP e de AIA ao meio de cultura foi essencial para o estabelecimento das culturas. A utilização de BAP (0,44 μ M) juntamente com AIA (5,71 ou 8,57 μ M) resulta no maior número de brotações.

Palavras-chaves: *Saintpaulia ionantha*, reguladores de crescimento, propagação *in vitro*, BAP, AIA.

ABSTRACT

African-Violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) is an ornamental plant vegetative propagated by tissue culture and by cutting. Scientific literature doesn't supply information about effects of Benzylaminopurine (BAP) and Indolacetic Acid (IAA) on the establishment and initiation of cultures of this plant.. The aim of this work was evaluate the effect of these growth regulators on the *in vitro* culture. How explants were utilized triangular sections of leaves of cultivar Optimara Miki. The treatments consisted in combinations of BAP (0.44 μ M) and IAA (0.0, 2.86, 5.71, 8.57, 11.42 e 14.28 μ M); BAP (0.00, 0.22, 0.44, 0.89, 1.33, 1.78 e 2.22 μ M) and IAA (11.42 μ M); BAP (0.11, 0.22, 0.33 e 0.44 μ M) and IAA (2.86, 5.71, 8.57 e 11.42 μ M) and, finally, to compare the best treatments obtained in the others experiments. The culture medium utilized was MS, with half of concentration of mineral nutrients and vitamins, and supplemented with myo-inositol (100mg.L⁻¹), sucrose (30g.L⁻¹) and agar (7g.L⁻¹). During the experiment the explants stayed in the first seven days in the dark and after for more 38 days at 40 μ mol.cm⁻².s⁻¹ of light density flux, 14 hours of photoperiod and temperature of 24 \pm 2 °C. Addition of BAP and IAA to the culture medium was essential to the establishment of cultures. The use of BAP (0.44 μ M) combined with AIA (5.71 ou 8.57 μ M) result in higher shoot number.

Key-words: *Saintpaulia ionantha*, growth regulators, *in vitro* propagation, BAP, IAA.

¹ Eng. Agr., M.Sc., URCAMP/INTEC, Rua Conde de Porto Alegre, 199 esquerda, CEP 96400-281, Bagé, RS. marcoantoniolucas@yahoo.com.br

² Bióloga, Rua Paul Harris, 05 aptº 201, Centro CEP 97015-480, Santa Maria, RS. jdf_82@hotmail.com

³ Eng. Agr., M.Sc., URCAMP/Ciências Biológicas, (53) 3242-5002, Bagé, RS. marcelos@alternet.com.br

(Recebido para publicação em 29/06/2007 aprovado em 28/03/2008)

Os reguladores de crescimento são importantes componentes do meio de cultura, porque, via de regra, são responsáveis pelo desencadeamento de respostas morfogênicas (HUGHES, 197 ; CALDAS et al., 1998).

Pontos importantes de controle da divisão celular são exercidos primariamente por meio da regulação da atividade de certas proteínas, particularmente das cinases dependentes de ciclina. As auxinas e as citocininas têm papel essencial neste processo, pois as primeiras aumentam a concentração das cinases e as segundas atuam na ativação das referidas proteínas. As auxinas atuam também na expansão/alongamento celular, inicialmente através da acidificação da parede celular e o conseqüente afrouxamento da mesma, e posteriormente na indução da absorção de solutos osmóticos e na atividade de enzimas relacionadas a biossíntese de polissacarídeos de parede (MERCIER, 2004).

A indução de regeneração em explantes desprovidos de regiões meristemáticas, como folhas e pecíolos, requer, em muitos casos, a utilização de auxinas conjuntamente com citocininas, pois estes tipos de explantes, geralmente apresentam reduzidas concentrações endógenas de auxinas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O BAP é uma das principais citocininas utilizadas no cultivo *in vitro* de plantas, devido às boas respostas que proporcionam na maior parte das espécies vegetais. O Ácido Indolacético (AIA) é uma das auxinas que apresenta ação sobre a morfogênese *in vitro*. No estabelecimento e iniciação de culturas *in vitro* de violeta-africana tem sido utilizadas diversas citocininas, entre elas, BAP, Tidiazurom e Cinetina, de forma isolada ou em combinação com a auxina Ácido Naftalenoacético (START & CUMMING, 1976; VAZQUEZ et al., 1977; CACHITA & LAZAR, 1982; CASSELS et al., 1986). O uso do AIA em combinação com citocininas na etapa de estabelecimento e iniciação de culturas de violeta-africana não foi observada na literatura científica.

O trabalho teve como objetivo determinar o efeito de diferentes combinações de AIA e de BAP no estabelecimento e iniciação *in vitro* de culturas de violeta-africana a partir de folhas.

Como explantes foram utilizados secções foliares triangulares com 7 mm de lados, selecionados de folhas que apresentavam comprimento de 25 mm e largura de 20 mm, obtidas de plantas de violeta-

africana cultivar Optimara Miki, mantidas em laboratório.

O processo de desinfestação consistiu na imersão das folhas, sob agitação, em álcool 70% durante 30 segundos, seguida da imersão em hipoclorito de sódio (água sanitária Qboa®) com 1% de cloro ativo durante 10 minutos. Junto com o hipoclorito de sódio, foi adicionada uma gota de detergente líquido para cada 50 mL de solução desinfestante. Após esta etapa, as folhas foram lavadas quatro vezes, na câmara de fluxo laminar, com água destilada e esterilizada por autoclavagem.

As secções foliares triangulares foram transferidas para os recipientes de cultura, sendo inserido um dos vértices do triângulo no meio de cultura e, de modo que, pelo menos metade da área foliar permanecesse em contato com o mesmo. Como recipientes de cultura foram empregados tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura e fechados com tampas de polipropileno modelo KAP-UTS K20 Bellco® (Sigma).

Os tratamentos consistiram de diferentes combinações dos reguladores de crescimento BAP e AIA. Os tratamentos foram organizados de modo a permitir três tipos de comparações:

- O efeito de diferentes concentrações de AIA (0,0; 2,86; 5,71; 8,57; 11,42 e 14,28 μ M), mantendo-se fixa a concentração de BAP (0,44 μ M);
- O efeito de diferentes concentrações de BAP (0,00; 0,22; 0,44; 0,89; 1,33; 1,79 e 2,22 μ M), mantendo-se fixa a concentração de AIA (11,42 μ M);
- O efeito de diferentes combinações de BAP (0,11; 0,22; 0,33 e 0,44 μ M) e de AIA (2,86; 5,71; 8,57; 11,42 μ M).

O meio de cultura foi utilizado o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹) e ágar (7 g.L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e a esterilização do material foi realizada por autoclavagem a 120 °C e 1,0 kgf.m⁻² de pressão, durante 15 minutos. As condições da sala de crescimento durante o experimento foram: temperatura de 24 ± 2 °C, ausência de luz nos primeiros 7 dias de cultura e nos 38 dias restantes densidade de fluxo luminoso de 40 μ mol.cm⁻².s⁻¹ com fotoperíodo de 14 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas doze repetições de um

explante. Os parâmetros avaliados foram: número total de brotações por explante e número e altura de brotações maiores que 3 mm. A análise de variação e análise de regressão polinomial foram realizadas no programa estatístico Statistica (STATSOFT, 1998).

Efeito da interação de BAP com diferentes concentrações de AIA: a análise de variação foi altamente significativa ($p < 0,01$) para as variáveis número total de brotações e para número de brotações maiores 3 mm. Para altura de brotações

maiores que 3 mm a análise de variação foi significativa ($p < 0,05$).

A adição de AIA resultou no incremento do número total de brotações e de brotações maiores que 3 mm (Figura 1), existindo um ponto máximo de resposta próximo a 8,76 μM . Na Figura 1 também podem ser observados os resultados de altura de brotações maiores que 3 mm. Pode-se verificar que o aumento da concentração de AIA resultou no incremento da altura, até um ponto máximo no tratamento com 11,42 μM de AIA.

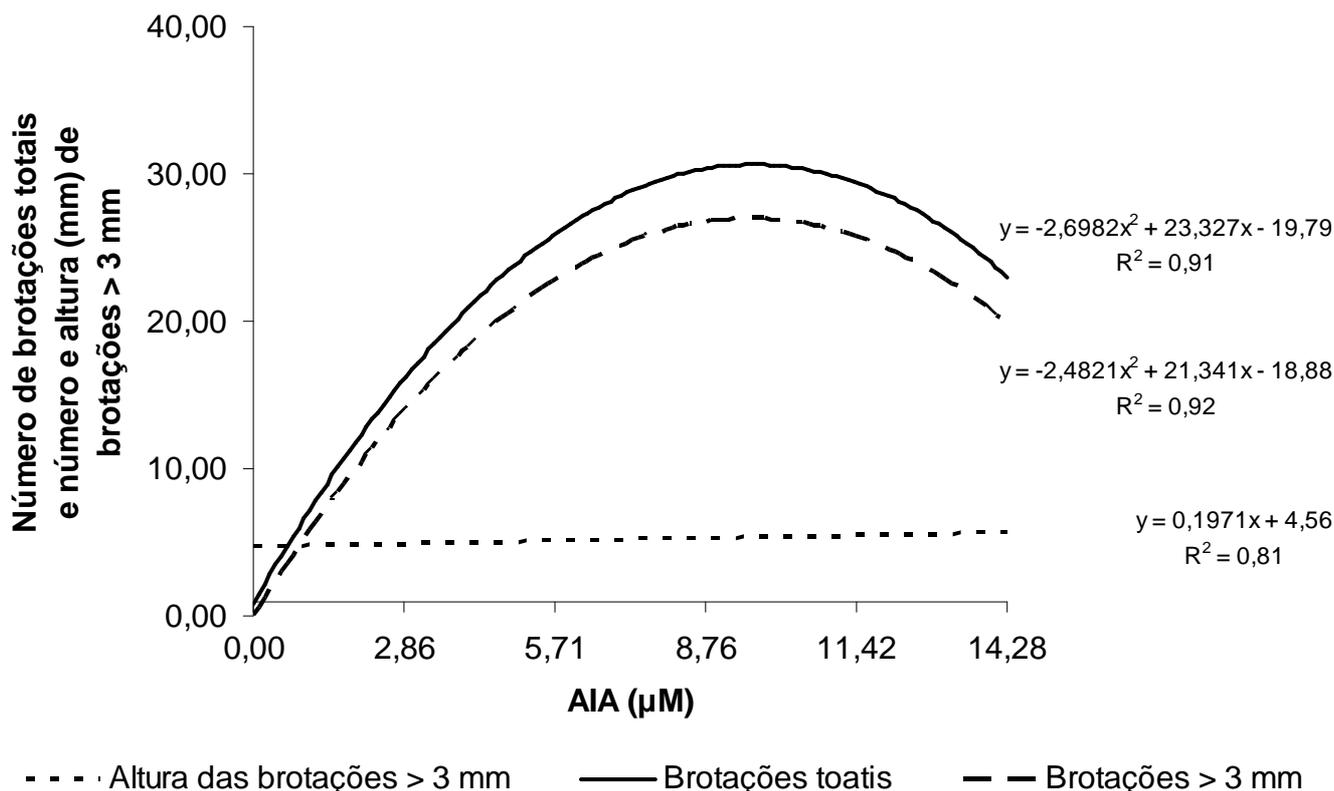


Figura 1. Número total de brotações e número e altura de brotações maiores que 3 mm, obtidas no estabelecimento e na iniciação de culturas *in vitro* de violeta-africana, cultivar Optimara Miki, em função da combinação de 0,44 μM de BAP com diferentes concentrações de AIA.

Os trabalhos de pesquisa disponíveis recomendam concentrações próximas às encontradas neste trabalho. SCHULZE & MAYER (1988) utilizaram 5,71 μM de AIA. LO et al. (1997) empregaram 11,42 μM de AIA para o estabelecimento desta espécie.

Trabalhos com ANA em combinação com diferentes citocininas também apresentam resultados

semelhantes em relação à concentração de auxina necessária para o estabelecimento. START & CUMMING (1976), VAZQUEZ et al. (1977), e CASSELS et al. (1986) obtiveram elevado número de brotações com 5,71 μM de ANA.

A promoção do AIA no aumento do tamanho das brotações pode ser evidenciado neste trabalho. As auxinas além de induzirem a formação de raízes atuam também na expansão celular da parte aérea da planta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Efeito da interação de AIA com diferentes concentrações de BAP: foram verificadas diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) para número total de brotações e para número de brotações maiores que 3 mm. A análise de variação dos resultados de altura de brotações maiores que 3 mm não foi significativa ($p > 0,05$).

Na Figura 2 observa-se um aumento na resposta do total de brotações e daquelas maiores que 3 mm com o aumento da concentração de BAP, atingindo o máximo com 1,33 μM de BAP. A altura de brotações maiores que 3 mm não foi influenciada pelas concentrações de BAP. Em todos os tratamentos ocorreu a formação de raízes e de calos.

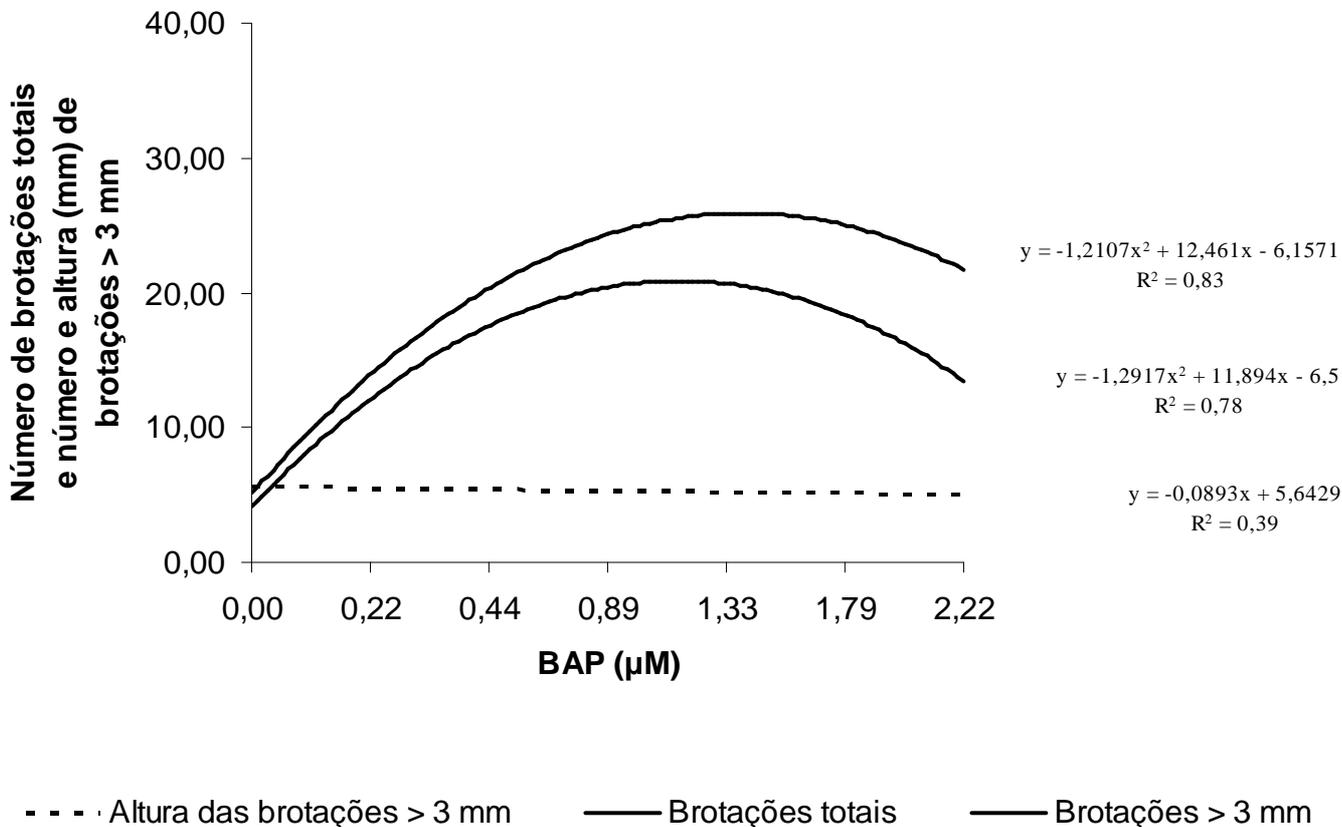


Figura 2. Número total de brotações e número e altura de brotações maiores que 3 mm obtidas no estabelecimento e iniciação *in vitro* de culturas de violeta-africana, cultivar Optimara Miki, em função da combinação de 11,42 μM de AIA com diferentes concentrações de BAP.

A concentração de BAP utilizada nos trabalhos existentes é também variável. XU (1984) e LO et al. (1997) utilizaram 0,44 μM . Bons resultados foram obtidos por SCHULZE & MAYER (1988), VAZQUEZ et al. (1977) e CASSELS et al. (1986), utilizando 4,44 μM . Por outro lado, NARENDRA RAM & MOHANDAS (2003) obtiveram elevado número de brotações com a utilização de 11,1 μM de BAP. Nos trabalhos de START & CUMMING (1976) e CACHITA & LAZAR (1982) melhores resultados foram obtidos com 22,2 μM .

O aumento no número de brotações com o incremento na concentração de BAP é uma

característica da ação das citocininas no desenvolvimento da parte aérea das plantas (GOUSSARD, 1981), pois as citocininas induzem grupos de células responsivas, existentes no explante, a se multiplicarem e a formarem brotações (KERBAUY, 1998). O incremento na concentração de BAP ativa um maior número destes grupos de células. O aumento da concentração de BAP tende a reduzir o tamanho das brotações formadas (OLIVEIRA et al., 1995). Este efeito negativo não foi verificado no presente trabalho. Possivelmente, devido às reduzidas concentrações de BAP utilizadas.

Efeito da interação de diferentes concentrações de BAP e AIA: não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) na análise de variação entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 1. Em todos os tratamentos foi observada a formação de raízes e calos.

A ausência de resposta aos tratamentos pode ser atribuída à manutenção da relação entre BAP e AIA nos meios de cultura (1:20). A resposta aos reguladores de crescimento depende da relação entre as concentrações utilizadas destes (NEHRA & STUSHNOFF, 1989).

Tabela 1. Número total de brotações, número e altura de brotações maiores que 3 mm obtidas no estabelecimento e na iniciação de culturas *in vitro* de violeta-africana, cultivar Optimara Miki, em função dos reguladores de crescimento BAP e AIA.

Reguladores de crescimento (μM)	Número total de brotações	Número de brotações > 3 mm	Altura de brotações (mm)
0,11 BAP + 2,86 AIA	14,30	10,50	4,86
0,22 BAP + 5,71 AIA	20,00	15,10	4,95
0,33 BAP + 8,76 AIA	18,33	15,20	5,46
0,44 BAP + 11,42 AIA	23,60	21,50	5,51

Os resultados permitem concluir que: a adição de BAP e AIA ao meio de cultura, na etapa de estabelecimento e iniciação, são essenciais para a regeneração de brotações de violeta-africana e que esta etapa deve ser realizada com a utilização de BAP na concentração de $0,44\mu\text{M}$ adicionada de AIA na concentração de $5,71$ ou $8,76\mu\text{M}$, as quais apresentam melhores resultados para a variável número de brotações.

REFERÊNCIAS

- CACHITA, C.D.; LAZAR, M. Multiplicarea *in vitro* a Saintpauliei. **Horticultura**, Cluj-Napoca, n.11, p.29-32, 1982.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: ASCTP/EMBRAPA – CNPQ, p.89-164. 1998.
- CASSELLS, A.C.; PLUNKETT, A.; KELLEHER, D. Screening of *Saintpaulia ionantha* Wendl. cultivars for caulogenetic potencial based on the *in vitro* responses of Young axenic leaves on auxin and cytokin factorial media. **Scientia Horticulturae**, Orlando, v.30, n.1-2, p.151-157, 1986.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S., BUSO, J.A. eds. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: ASCTP/EMBRAPA – CNPH, p. 183-260, 1998.
- GOUSSARD, P.G. Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass shoot derived from shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. **Vitis**, Piracicaba, v.20, n.3, p.228-234, 1981.
- HUGHES, K.W. Introduction. In: HUGHES, K.W.; HENKE, R.; CONSTANTIN, M. **Propagation of higher plants through tissue culture: a bridge between research and application**. Proceedings of an International Symposium Held at the University of Tennessee, Knoxville: United States Department of Energy. Technical Information Center, 1978. p.85-86.
- KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S., BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: ASCTP/EMBRAPA – CNPH, v.2, p. 519-531, 1998.
- LO, K.H.; GILES, K.L.; SAWHNEY, V.K. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confusa* hybrids (African Violet) cultured *in vitro*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n.6, p.416-420, 1997.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2004. p. 218-249.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.15, p.473-497, 1962.
- NARENDRA RAM, M.S.; MOHANDAS, S. Transformation of african violet (*Saintpaulia ionantha*)

with glucanasechitinase genes using *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Horticulturae**, Toronto, v.1, n.624, p.471-478, 2003.

NEHRA, N.S.; STUSHONOFF, C.; KARTHA, K.K. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks, **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.114, n.6, p.1014-1018, 1989.

OLIVEIRA, P. D. de; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de brotos de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) **Ciência e Prática**, Lavras, v.19, n.4, p.397-408, 1995.

SCHULZE, D.; MAYER, R. *Saintpaulia ionantha* C. Wendl – *in vitro* propagation and acclimatization in commercial laboratory. **Acta Horticulturae**, Geisenheim, v.2, n.226, p.619-622, 1988.

START, N.D.; CUMMING, B.G. *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. **Hortscience**, Alexandria, v.11, n.3, p.204-206, 1976.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows (Computer program manual)**. Tulsa: Statsoft. 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

VAZQUEZ, A.M.; DAVEY, M.R.; SHORT, K.C. Organogenesis in cultures of *Saintpaulia ionantha*. **Acta Horticulturae**, Gent, v.1, n.78, p. 249-258, 1977.

XU, L.Q. The promotive effects of ginseng on rapid clonal *in vitro* propagation of african violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Acta Botânica Sinica**, Beijing, v.26, n.5, p.489-498, 1984.