

RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS EM EXPLANTES FOLIARES DE CAIXETA *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.

MANTOVANI, Nilton C.¹; FRANCO, Elci T. H.²

¹ UPF - Departamento de Biologia. Passo Fundo RS. niltonmantovani@zipmail.com.br

² UFSM - Departamento de Biologia. Santa Maria RS.
(Recebido para publicação em 21/08/2000)

RESUMO

Estudou-se o comportamento morfogênético *in vitro* de explantes foliares de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch., uma espécie florestal da família Araliaceae de interesse econômico e ecológico nas florestas do Sul do Brasil. Discos foliares foram retirados de folhas produzidas *in vitro* e cultivados em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) com várias combinações de BAP e ANA. As respostas observadas foram calogênese nos discos foliares na presença de ANA, e regeneração direta de brotos na presença de BAP. A combinação de ANA e BAP promoveu a regeneração indireta de gemas, embriões somáticos e raízes. As brotações e os embriões somáticos, após alongamento, foram isolados e produziram plantas completas.

Palavras-chave: *Didymopanax morototoni*; morfogênese; explantes foliares.

ABSTRACT

MORPHOGENETIC RESPONSES BY LEAF EXPLANTS OF CAIXETA (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.). This research was carried out aiming to study the morphogenetic pattern induced *in vitro* by leaf explants of caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.). This species belongs to Araliaceae family and presents economic and ecologic importance in the forest of South of Brazil. Leaf discs were obtained from leaf *in vitro* produced and cultured in WPM (Wood Plant Medium) supplemented with BAP and NAA. The responses showed were calogenic in the presence of NAA and shoot regeneration in the presence of BAP. With both BAP and NAA these explants showed an indirect pattern of bud regeneration, somatic embryogenesis induction and rhizogenesis. Shoots and somatic embryos after elongated were isolated and developed into whole plants.

Key words: *Didymopanax morototoni*; morphogenesis; explants discs.

INTRODUÇÃO

Como muitas espécies florestais nativas, a caixeta (*Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. da família Araliaceae) apresenta interessante valor comercial devido às boas qualidades de sua madeira, e por esta razão sua exploração foi bastante acentuada nas formações florestais onde naturalmente ocorria, como na Mata Atlântica e Depressão Central do Rio Grande do Sul.

Segundo REITZ *et al.*, (1988) a fraca densidade populacional da caixeta observada nas florestas ou vegetação secundária reflete a necessidade de escarificação das sementes para que ocorra a germinação, o que pode ser verificado também em viveiro. A propagação desta espécie através da estaquia é dificultada pela quase ausência de ramificação lateral.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* tornaram-se uma alternativa para a propagação de plantas que desempenham um papel fundamental no equilíbrio de diferentes ecossistemas e que por razões antrópicas ou sérias restrições quanto a sua forma natural de propagação, seja sexuada ou asexuadamente, encontram-se ameaçadas de extinção. Estas técnicas são também ferramentas poderosas no apoio aos programas de melhoramento genético florestal pela possibilidade de capturar e fixar os componentes aditivos e não aditivos da variância genética, através da propagação clonal (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Somam-se a estas vantagens o rápido crescimento do estoque de explantes com características juvenis possibilitado pelo cultivo *in vitro*, altas taxas de multiplicação, e produção de material genético uniforme.

MANTOVANI *et al.* (1998 e 1999), utilizando segmentos nodais como explantes, desenvolveram um protocolo para a regeneração *in vitro* da caixeta. Contudo, explantes de folhas produzidas *ex vitro* mostraram-se exclusivamente calogênicos, independentemente da idade e posição em que foram retirados da folha e do balanço de reguladores de crescimento.

Este trabalho avalia as respostas morfogênicas induzidas em explantes retirados de folhas de caixeta produzidas *in vitro* quando cultivados com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se como fonte de explantes folhas de *Didymopanax morototoni* formadas em brotações de gemas de segmentos nodais cultivados *in vitro* no meio de cultura WPM (Wood Plant Medium de Lloyd & McCown, 1981) sem reguladores de crescimento. Os discos foliares excisados (10 mm de diâmetro) foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

Foram adicionadas ao meio de cultura diferentes combinação e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido 1-naftalenoacético) em 10 repetições por tratamento e 3 frascos com 4 discos foliares por parcela. As culturas foram mantidas por 60 dias (um subcultivo a cada 30 dias) a 25°C (±2°C) e fotoperíodo de 16 horas sob intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias


























RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o cultivo dos discos foliares observou-se a expressão de diferentes padrões morfogênicos em uma ampla variedade de respostas: formação de calos,

neoformação de gemas, raízes e embriões somáticos, conforme esquema da Figura 1.

A calogênese ocorreu nos discos foliares cultivados na presença de ANA, e iniciou com a proliferação de células ao longo das bordas cortadas do disco foliar progredindo com a

proliferação destas células recobrimdo totalmente o explante. A velocidade de formação e o potencial de desenvolvimento destes calos foram estimulados, pelo aumento na concentração da auxina, independentemente de combinações com diferentes concentrações da citocinina.

| BAP (mg.L ⁻¹) | ANA (mg.L ⁻¹) | | | | |
|------------------------------|--|--|--|--|--|
| | 0,00 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10,00 |
| 0,00 |  |  |  |  |  |
| 0,01 |  |  |  |  |  |
| 0,10 |  |  |  |  |  |
| 1,00 |  |  |  |  |  |
| 10,00 |  |  |  |  |  |

LEGENDA DAS FIGURAS:








| | |
|--|---|
|  = Explante inicial |  = Disco foliar com regeneração direta de gemas adventícias |
|  = Calo |  = Calo com raízes |
|  = Calo com brotações de gemas adventícias |  = Calo com raízes e embriões somáticos em estádios Cordiforme(C); Globular (G); e Torpedo (T) |
|  = Calo com brotações de gemas adventícias e raízes | |

Figura 1 - Comportamento morfogenético de discos foliares de caixaeta (*Didymopanax morototoni*), retirados de folhas produzidas *in vitro*, em diferentes concentrações e combinações de BAP e ANA em meio de cultura WPM, após 60 dias de cultivo *in vitro*

Os tratamentos proporcionaram a formação de calos com diferenças morfológicas de cor e estrutura. Quanto à coloração, os calos apresentaram-se amarelos, amarelo-esverdeados e verde escuros. Quanto à estrutura, os calos apresentaram-se compactos ou compactos nodulares.

A expressão de padrões morfogenéticos esteve associada a estas morfologias. Calos amarelo-esverdeados ou verde escuros compactos nodulares apresentaram-se tipicamente organogênicos, nos quais ocorreu a neoformação de gemas. Calos amarelados compactos nodulares apresentaram-se embriogênicos e também organogênicos nos quais observou-se a formação de embriões somáticos e raízes, respectivamente. Por outro lado calos amarelos compactos não nodulares não apresentaram nenhum tipo de regeneração após 60 dias de cultivo.

As estruturas nodulares amareladas e verdes, observadas nos calos nos diferentes tratamentos com BAP e ANA, foram identificadas como proliferações de células meristemáticas, os meristemóides, primórdios de gemas vegetativas, raízes e embriões somáticos.

Estruturas semelhantes foram também identificadas por NARAYANASWAMY (1977), BHOJWANI & RAZDAN (1983) e LAINÉ & DAVID (1994) antes da emergência de gemas vegetativas e raízes em calos de explantes foliares de *Eucalyptus grandis*.

A presença isolada de BAP 0,1 mg.L⁻¹ induziu a formação direta de numerosas gemas adventícias ao longo das bordas cortadas dos discos foliares após 3 a 4 semanas de cultivo. Este tipo de regeneração em explantes foliares ocorre geralmente a partir de células do parênquima (BROWN & THORPE, 1986), normalmente células perivasculares,

provavelmente devido ao teor endógeno de reguladores de crescimento presentes no tecido vascular de transporte (VAN ECK & KITTO, 1992).

Em alguns casos o processo intermediário de calo antecedeu a formação das gemas, porém sempre na presença de ANA. O maior número de gemas neoformadas, em torno de 7 a 8 por calo, foi obtido com BAP 0,1 mg.L⁻¹, após 60 dias de cultivo. O crescimento destas gemas só ocorreu após a transferência dos calos para novo meio de cultura, com o mesmo balanço de reguladores de crescimento. Baixas concentrações de BAP e ANA favoreceram o desenvolvimento destas brotações, sendo que a combinação destes reguladores de crescimento na concentração de 0,1 mg.L⁻¹ originou brotações mais alongadas, o que permitiu a individualização e uma melhor manipulação destas.

A rizogênese ocorreu de forma abundante nos calos de caixeta, porém não foi induzida com ANA isoladamente ou em combinação com BAP 10,0 mg.L⁻¹. O potencial rizogênico foi favorecido por baixas concentrações dos reguladores de crescimento, sendo que o maior número de raízes foi formado com ANA 0,01, 0,1, e 1,0 mg.L⁻¹ em combinação com BAP 0,01 mg.L⁻¹. O aumento destas concentrações reduziu o comprimento e o número de raízes, porém, aumentou o diâmetro destas. As raízes apresentaram geotropismo positivo, e formaram-se, independentemente do tratamento, ainda na primeira fase de cultivo, aos 30 dias.

A embriogênese somática ocorreu de forma indireta na presença de ANA 10,0 mg.L⁻¹ e BAP 0,1 mg.L⁻¹. Os embriões, em diferentes estádios de desenvolvimento (globular, cordiforme e torpedo), foram observados somente após a primeira repicagem dos calos para novo meio de cultura com o mesmo balanço de reguladores de crescimento.

Resultados semelhantes foram obtidos em explantes foliares de *Stevia rebaudiana* (FERREIRA & HANDRO, 1987); *Orange mint* (VAN ECK & KITTO, 1992); e *Eucalyptus grandis* (LAINÉ & DAVID, 1994), onde a regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos foi obtida sempre que uma combinação entre auxina e citocinina, basicamente ANA e BAP, estava presente no meio de cultura.

Processos integrados de desdiferenciação, indução à competência e rediferenciação celular, segundo CHRISTIANSON & WARNICK (1988), e HANDRO & FLOH (1990) estão envolvidos na expressão de padrões morfológicos *in vitro*. A organogênese e embriogênese somática podem ser expressadas em tecidos diferenciados dependendo, sobretudo, da intensidade de determinação e competência das células (THORPE, 1980; BROWN & THORPE, 1986), bem como, das condições de cultivo, como meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais (TRAN THANH VAN, 1980).

As brotações de gemas neoformadas de caixeta, através das vias direta e indireta, foram transferidas após 60 dias de cultivo para novo meio de cultura acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, onde regeneraram tufos de novas brotações. A multiplicação destas brotações pôde ser mantida nas mesmas condições, sem diminuição da taxa de multiplicação, por sucessivos subcultivos. Mesmo na ausência de auxinas nesta fase de multiplicação, observou-se a formação de raízes na base das brotações das gemas neoformadas nos tratamentos iniciais contendo ANA. As brotações enraizadas foram então transferidas para substrato e aclimatizadas conforme protocolo sugerido por MANTOVANI *et al.* (1999), para a mesma espécie.

Os embriões somáticos foram transferidos em estágio cotiledonar para novo meio de cultura acrescido de 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, e após desenvolvimento foram também

transferidos para substrato e aclimatizados antes da transferência para casa de vegetação.

CONCLUSÃO

Sistemas multicelulares, que apresentam tecidos organizados e células diferenciadas com intensidades variadas de determinação, como nos discos foliares de *Didymopanax morototoni*, possuem a habilidade de expressar seu potencial morfológico em condições *in vitro*.

As diferentes respostas morfológicas verificadas são o resultado da interação entre diferentes concentrações de BAP e ANA e também de uma condição mais responsiva destes tecidos, e o cultivo *in vitro* favorece esta reversão à juvenildade.

A utilização de folhas regeneradas *in vitro* como fonte de explantes possibilita a produção de grande número de plantas de caixeta através da organogênese direta e indireta e também embriogênese somática.

A utilização deste tipo de explante permitirá a organização de um modelo cíclico regenerativo, em que plantas produzidas e ainda em condições *in vitro* tornam-se fontes de propágulos para novos sistemas regenerativos, reduzindo desta forma o tempo e o custo de produção.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Universidade Federal de Santa Maria pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHOJWANI, S. S., RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice developments in crop science.** Oxford: Elsevier Science, 1983. v.5. 488p.
- BROWN, D. C. W., THORPE, T. A. Plant regeneration by organogenesis. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants.** London: Academic Press, 1986. v. 3. p. 49-65.
- CHRISTIANSON, M. L., WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hort. Science**, v. 23, n.3, p.515-519, June, 1988.
- FERREIRA, C. M., HANDRO, W. Some morphogenetic responses in leaf explants of *Stevia rebaudiana* cultured "in vitro". **Revista Brasileira de Botânica**, v. 10, p. 113-116, 1987.
- GEORGE, E. F., SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture.** England: Eastern Press, 1984. 709p.
- HANDRO, W., FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 203-212.
- LAINÉ, E., DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v.13, n.8, p. 473-476, 1994.
- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-327, 1981.
- MANTOVANI, Nilton César; FRANCO, Elci T. H.; GABBI, Gláucia; *et al.* Enraizamento de brotações de *Didymopanax morototoni* (AUBL) DCNE ET PLANCH. In: XLIX CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 1998, Salvador. **Anais...** Salvador, 1998. p. 172.

MANTOVANI e FRANCO. Respostas Morfogenéticas em Explantes Foliares de Caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.

MANTOVANI, Nilton César; FRANCO, Elci T. H.; GUERRA, Miguel Pedro; et. al Micropropagação de caixeta *Didymopanax morototoni* (AUBL) DCNE ET PLANCH. **CIÊNCIA FLORESTAL**, Santa Maria, v.10, n. 5, p.15-33, 1999.

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J., BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p.179-248.

REITZ, R., KLEIN, M., REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Companhia Rio-Grandense de Artes Gráficas, 1988. 525 p.

THORPE, T. A. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.

TRAN THANH VAN, K. Control of morfogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. **Int. Rev. Cyt.**, 11A, p. 175-194, 1980.

VAN ECK, J. M., KITTO, S. L. Regeneration of peppermint and orange mint from leaf disks. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.30, p.41-49, 1992.