

ACÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E FITOREGULADORES NA ORGANOGÊNESE DE *Begonia rex*.

Elcí Terezinha Henz Franco e Cinara Echart-Almeida

Departamento de Biologia - CCNE

UFSM – Santa Maria, RS

RESUMO

A *Begonia rex* é uma espécie ornamental de interiores que se propaga vegetativamente. A regeneração “*in vitro*” desta espécie, foi obtida por cultivo de pecíolos em meio MS completo, suplementado com três concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) (0,01 mg/l; 0,1 mg/l; 0,5 mg/l) combinados com quatro concentrações de cinetina (KIN) (0,1 mg/l; 0,2 mg/l; 0,5 mg/l ; 1,0 mg/l) ou apenas MS com extrato de batata (15% e 20%) ou água de coco (15% e 20%).

Os resultados indicaram que é possível regenerar *Begonia rex* apenas com água de coco na ausência de fitoreguladores em meio básico MS, obtendo-se 40% de plantas completas em MS + água de coco à 20%. Com a utilização de 0,1 mg/l KIN e 0,01 mg/l ANA obteve-se 100% de regeneração de plantas completas. Já a combinação de 0,01 mg/l ANA com 0,2 mg/l e 0,5 mg/l KIN produziu a regeneração de 80% e 83% de plantas completas, respectivamente.

Palavras chaves: *Begonia rex*, micropropagação, organogênese, extratos vegetais e cultivo *in vitro*.

SUMMARY

Petiole explants of *Begonia rex* were cultured on basal medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962). The medium was supplemented with naphthalene acetic acid (0.01; 0.1 and 0.5 mg/l) and kinetin (0.1; 0.2; 0.5 and 1.0 mg/l). In these experiments, were as also used coconut water (15% and 20%) or potato extract (15% and 20%). Buds were formed in several treatments, but the best combination was coconut water 0.01 mg/L NAA and 0.1 mg/l KIN. Whole plants (40% of the explants) were obtained when was added coconut water . The optimal combination for plant regeneration (100%) was 0.01 mg/l NAA plus 0.1 mg/l KIN.

Key words: *Begonia rex*. micropropagation, organogenesis, in vitro culture.

INTRODUÇÃO

A família Begoniaceae possui mais de 200 espécies sendo a maioria ornamentais, mas há também algumas com valor medicinal e alimentar (CASTILLO & SMITH, 1997). *Begonia rex* é uma das espécies ornamentais muito usada para decoração de interiores, pela beleza de suas folhas multicoloridas e por ser pouco exigente quanto aos cuidados de cultivo e manutenção. Por ser de multiplicação vegetativa, a busca de mudas sadias através do uso da técnica da micropropagação "*in vitro*" se constitui numa excelente ferramenta para fins de produção comercial em grande escala, possibilitando, ainda, a multiplicação rápida em períodos de tempo e espaço físicos reduzidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Também permite uma produção independente da estação e das condições ambientais, bem como a obtenção de plantas livre de infecções por bactérias, fungos e vírus, pois as begônias são muito susceptíveis às doenças (TAKAYAMA, 1990).

Folhas e pecíolos de begônias em geral possuem uma alta capacidade regenerativa. Estudos histológicos clássicos de PREVOT (1948)

demonstraram que em explantes de folhas de *Begonia rex* os brotos e raízes se originam espontaneamente das células epidérmicas, mas do tecido perivascular formam-se somente raízes. Contudo, quando foram excisadas 3 a 4 camadas de células epidérmicas da região subjacente ao colênquima das nervuras foliares, houve a formação de brotos e raízes apenas na presença de determinadas substâncias reguladoras de crescimento. Devido a este fato, a composição e a concentração dos fitoreguladores no meio de cultura tornaram-se fatores determinantes para o crescimento e desenvolvimento da maioria dos sistemas através da cultura de tecidos, sendo as auxinas e as citocininas os mais utilizados. Segundo SKOOG & MILLER (1957), a disponibilidade e a interação desses dois fitoreguladores modularam a formação de raiz e parte aérea. Entre as citocininas, a benzilaminopurina (BAP) tem grande influência no início da formação de brotos e na alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação enquanto que o KIN e o 2-ip (2- isopenteniladenina) provocam o crescimento normal (HU & WANG, 1983).

A indução direta de partes aéreas em *Begonia rex*, tem demonstrado que a relação citocinina / auxina é muito importante. Pois as concentrações de 0,3 mg BAP e 1,0 mg/l ANA, produziram um grande número de brotações adventícias a partir de pecíolo e também as concentrações de 1,0 mg/l KIN com 1,0 mg/l ANA foram eficiente para a iniciação e o crescimento das partes aéreas de *Begonia hiemalis* (TAKAYAMA, 1990). Ainda, para esta espécie, o percentual de brotações em explantes peciolares, atingiu índices de 90 a 100% nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg/l de BA, mas, com a utilização de ANA os índices de brotações ficaram abaixo de 50% (HILDING & WELANDER, 1976).

Os extratos naturais, apesar das diferenças na composição e na concentração de seus componentes têm sido de grande valor na cultura de tecidos, podendo substituir o uso de fitoreguladores, além de enriquecerem os meios de cultivo e torná-los mais baratos. Vários autores

obtiveram resultados positivos utilizando diferentes extratos naturais, tais como: de batata (LINGAPPA, 1957), de folhas de fumo (MURASHIGE & SKOOG, 1962), água de coco (VAN OVERBEEK et al. 1941) e suco de tomate que adicionados aos meios são fonte de nitrogênio, carboidratos e de fatores de crescimento (MROGINSKI, C.A. & ROCA, W. M., 1991). O endosperma de coco e os extratos de leveduras têm uso mais geral. A água de coco é retirada dos frutos verdes ou maduros, filtrada, autoclavada ou usada diretamente; às vezes, com uma parte da massa de coco ralado e moído conforme descrição de HENSHAW et al, 1966 citado por CALDAS & TORRES (1990). Esta contém sais minerais, mio-inositol, citocininas, nucleotídeos (STEWART et. al, 1968) e outros componentes orgânicos. Em análise feita por KRIKORIAN, 1991, estão relacionados 19 tipos de aminoácidos, vários ácidos orgânicos, compostos nitrogenados, açúcares, vitaminas, substâncias de crescimento entre outras.

A substituição de fitoreguladores por extratos vegetais é de grande importância na obtenção de mudas para reduzir os custos de produção, pois poderiam atuar auxiliando o desencadeamento dos processos morfogênicos.

O presente trabalho tem como objetivos verificar a influência de diferentes concentrações dos fitoreguladores de crescimento e a ação dos extratos vegetais no desenvolvimento e morfogênese “*in vitro*” de *Begonia rex*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas matrizes de *Begonia rex* mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente serviram como fonte de explante. Segmentos de pecíolos com 0,5 cm de diâmetro por 0,2 mm de espessura foram lavados em água corrente, mergulhados posteriormente, em álcool 70%, por 30 segundos. Logo a seguir, em câmara de fluxo laminar, foram

desinfestados em hipoclorito de sódio, a 2 % do comercial, com 2 gotas de detergente neutro por 100 ml de solução, em agitação por 10 minutos. Após uma tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada os explantes foram retirados e inoculados em meio básico e Murashige & Skoog (1962), MS completo, contendo 30 g/l de sacarose solidificado com, 7 g/l de ágar, 10 mg/l de tiamina-HCl e 100 mg/l de mio-inositol.

Foram constituídos dois bioensaios :o primeiro com extratos de batata e de água coco separadamente nas concentrações de 15 e 20% e o segundo com cinco diferentes combinações de fitoreguladores ,constituindo os tratamentos: T1.-: 0,1 mg/l KIN + 0,01 mg/l de ANA; T2.-: 0,2 mg/l KIN + 0,01 mg/l ANA; T3.-: 0,5 mg/l KIN + 0,01 mg/l ANA; T4.-: 0,5 mg/l de KIN + 0,1 mg/l ANA; T5.-:1,0 mg/l KIN + 0,5 mg/l de ANA. O pH do meio foi ajustado para 5,9, sendo em seguida autoclavado a 120 °C, a 1 atm por 15 minutos. O meio de cultura estéril foi distribuído em frascos, num total de 20 frascos para cada um dos tratamentos com extratos vegetais e fitoreguladores separadamente. Cada frasco recebeu um explante constituindo-se uma unidade experimental.

Os frascos foram colocados numa sala de crescimento na ausência de luz até a iniciação de respostas ou mudanças morfológicas, sendo, posteriormente, mantidos em sala de incubação com um fotoperíodo de 16 h, a uma temperatura de 25° C, pelo período de 50 dias.

Avaliou-se o percentual de respostas através de observações visuais, com e sem o auxílio de lupa, para a contagem do número de brotações, aspectos morfogênicos apresentados pelos explantes, e o número de plantas completas formadas. Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As brotações obtidas e as plantas completas foram separadas e cultivadas em MS na ausência de reguladores de crescimento, por 60 dias, e ao apresentarem 3 ou 4 folhas bem desenvolvidas, foram transplantadas para vasos com terra esterilizada, e colocadas em casa de vegetação, com temperatura ambiente, para aclimação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da água de coco no meio de cultura foi eficaz na obtenção de respostas morfogênicas, ocorrendo, diretamente, a formação de raiz e parte aérea conforme se observa na Tabela 1 . O aumento da concentração de água de coco (5%), no meio de cultura, proporcionou a elevação de 10% na formação de brotações, demonstrando um acréscimo quantitativo dos mesmos. Enquanto que a presença de diferentes concentrações de extrato de batata não estimularam nenhum tipo de resposta morfogênica nos explantes.

A diferença de resposta verificada nestes tratamentos pode ser melhor interpretada ao analisarmos a composição desses extratos. A água de coco contém, além de outros compostos, sais minerais, mio-inositol, citocininas, nucleotídeos (STEWART et al, 1968), zeatina, zeatinaribosídeo e purinas que podem promover a divisão celular e ser substituídas por substâncias químicas (KRIKORIAN, 1991) ou ainda podem interagir com efeito sinérgico na nutrição dos tecidos cultivados in vitro (MROGINSKI, L. A. & ROCA, W. M. 1991). Já no extrato de batata encontram-se proteínas, hidratos de carbono, sais minerais, tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico e outros componentes, substâncias incapazes de induzir a morfogênese na ausência de fitoreguladores, comprovado pelos resultados negativos obtidos neste estudo no tratamento com extrato de batata. MANGAT et al. (1989), comparando diferentes fontes de carbono, demonstraram que o uso de sucrose para *Begonia rex* produziu 40 brotações por explantes, desde que citocininas e auxinas estivessem presentes no meio de cultura. Acredita-se que o efeito estimulatório da água de coco neste estudo, seja devido a ação das citocininas naturais, das substâncias do grupo das auxinas, giberelinas, além da presença de fontes de carbono, e também das concentrações subótimas de tiamina e de outros aminoácidos presentes. Pois, VAN **OVERBEECK** et al. 1941 demonstraram pela primeira vez a eficácia da água de coco na indução de embriões de *Datura* e

LINGAPPA 1957, entre outros, evidenciou a sua ação estimulatória no crescimento de calos.

As respostas obtidas nas diferentes combinações de fitoreguladores testados encontram-se na Figura 1. Os resultados demonstram a alta frequência obtida para a *Begonia rex*, na combinação de 0,1 mg/l de KIN + 0,01 mg/l de ANA, onde houve 100% de regeneração de plantas, seguidos de 83,4% e 80% com a regeneração de plantas nas combinações de 0,5 e 0,2 mg/l de KIN para 0,01 mg/l de ANA. Evidencia-se assim a ação da cinetina na formação de brotação aérea, demonstrado nos clássicos trabalhos de SKOOG & MILLER, 1957. Com o aumento da concentração de ANA para 0,1 mg/l e a manutenção de 0,5 mg/l de KIN, os índices de regeneração de plantas foram reduzidos para 28,6%. Neste tratamento 19,1% dos explantes apresentaram apenas intumescimento, não ocorrendo nenhuma evolução e apenas 9,5% formaram brotos aéreos. Esta combinação produziu um número ainda expressivo de respostas morfogênicas diferenciadas, isto é, só o intumescimento ou nenhuma resposta, enquanto que na combinação 1,0 mg/l de KIN + 0,5 mg/l de ANA só observou-se intumescimento dos explantes. O que indica que estas concentrações dos fitoreguladores não são suficientes para desencadear o processo de morfogênese, destacando a importância da relação auxina /citocinina, pois em *Begonia erythrophylla*, segundo RAMACHANDRA & KHATAMIAN, (1989), os segmentos peciolares produziram 38,7% de brotações com concentrações altas de KIN (10,0 mg/l) combinadas com 1,0 mg/l de ANA. Comparando-se estes dados aos obtidos para *Begonia rex*, sugere-nos um efeito inibitório da morfogênese, atribuído ao uso de alta concentração de KIN.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados quanto ao número de brotos formados a partir de explantes peciolares, cultivados em meio MS com diferentes concentrações na associação de KIN e ANA. Observa-se que a menor concentração de cinetina associada a 0,01 mg/l de ANA, produziu o maior número de brotos aéreos, 33 por explante. Enquanto que nas combinações subsequentes, o número desses brotos (25 e 24), também foi

expressivo. Em *Begonia hiemalis* (HILDING & WELANDER, 1976), usando combinações de ANA e BAP, em concentrações similares, obtiveram, em média 5 brotações aéreas por planta, resultados muito inferiores aos obtidos em *Begonia rex*, nas combinações testadas neste estudo. Já, em *Begonia rieger*, segmentos de pecíolos formaram 60% de brotos com as concentrações de 0,2 – 2,0 mg/l de ANA e KIN, respectivamente, enquanto que em concentrações menores, não mais do que 40% dos explantes regeneraram brotos (PARANHOS et al., 1994). Isto é confirmado pelo fato de que todos os tratamentos testados com diferentes combinações das substâncias de crescimento mostram respostas morfogênicas. As brotações formadas foram isoladas e subcultivadas em meio MS até apresentarem 3 a 4 folhas. Destacamos a formação espontânea das raízes sem a necessidade de suplementação de fitoreguladores, efeito que talvez possa ser atribuído à concentração endógena de auxina ou indução pela presença de ANA no meio de cultura anterior.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram o potencial dos pecíolos de *Begonia rex*, como fonte de explantes para a multiplicação “*in vitro*”, com a formação de alto número de brotações nas combinações de substâncias de crescimento utilizadas. Também, fica evidenciada a formação de brotações adventícias em meio MS com água de coco, que atua como indutor da morfogênese devido à presença de inúmeras substâncias naturais ativas na divisão celular. E, finalmente, que nas concentrações mais baixas de KIN combinadas com ANA, houve a formação de um maior número de plantas completas e também de brotações adventícias.

AGRADECIMENTOS:

Ao PET-CAPEs pela bolsa concedida e a FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao acadêmico Leandro Bertochi Gavioli e a Tânia Boucinha pela colaboração na organização deste trabalho.

LITERATURA CITADA :

- CALDAS, L. S., TORRES, A.C. **Meios de cultura**. IN : TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ Embrapa – CNPH, 1990. p. 433.
- CASTILLO, B. & SMITH, M. A. L. - **Direct embryogenesis from Begonia gracilis explants**. Plant Cell Report, n 16, p. 385-388, 1997.
- 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.
- HILDING, A., WELANDER, T. **Effects of some Factors on Propagation of Begonia x hiemalis in vitro**. Swedish J. Agric. Res.n. 6, p. 191-199, 1976.
- HU, C. Y., WANG, P. G. **Meristem shoot tip and bud cultures**. In : EVANS, D. A. et al.**Handbook of plant cell culture**. Ne York: Macmillan. V. 1, P 177-227, 1983.
- KRIKORIAN, A.D. **Medios de cultivo: generalidades, composicion y preparacion**. In:ROCA, W. M.; MROGINKI, L.A. (eds). Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicacions. Colombia : CIAT,1991. p 42-77.
- LINGAPPA, Y. **Tissue cultures of solanum tuberosum and Ipomea pandurale**. A ruer. J. Bot., n. 44, p.419-423, 1957.

- MANGAT, B.S., PELEKIS, M.K. & CASSELS, A.C.- **Changes in the starch content during organogenesis in vitro cultured Begonia rex stem explants** Phisiologia Plantarum, n. 79. 1990. p.267-274.
- MROGINSKI, L. A., ROCCA, W. M. – Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In : ROCA, W. M. & MROGINKI, L. A. (eds). Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicacions. Colombia : CIAT. 1991. p. 21 - 40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiology Plantarum, V. 15. 1962. p. 473-497.
- PARANHOS, J. T., ECHART, C. I., FRANCO, E. T. H. **Obtenção in vitro de brotos de Begonia rieger com thidiazuron, cinetina e acido naftaleno acético.** Ciência Rural, v. 24, n. 3. 1994 p. 533-537.
- PREVOT, P. **Contribution histologie des phénomènes de néoformation chez Begonia rex Putz.** Ver. Sci., n 5, 1948. p. 275-285.
- RAMACHANDRA,S. & KHATAMIAN, H. **Micropropagation of Peperomia and Begonia species using Petiole Segments.** Hort Science, 24 (1).p.153-154. 1989.
- STEWARD, F. C., NEWMANN, K. H., RAO, K. V. N. **Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota* II effects of iron, molybdenum and manganese on metabolism** Planta. n. 81, p. 351-371, 1968.
- SKOOG, F., MILLER, O. C. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured “ in vitro ”.** Symp. Soc. Exp. Biol., n. 11, p. 118-131, 1957.
- TAKAYAMA, S. Begonia In: AMMIRATO, P. V. et al. **Handbook of plant cell culture.** New York: Mc Graw-Will. 1990. V. 5. p. 253-283.
- VAN OVERBEEK, J., CONLIN, M.E. & BLAKESLEE, A. F. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science, 94: 350-351, 1941.

Tabela 1- Percentagem de ocorrência de plântulas de *Begonia rex* regeneradas “*in vitro*” em diferentes concentrações de extratos vegetais em meio MS completo., no período de 50 dias

TRATAMENTOS (%)		PLANTAS REGENERADAS (%)
Água de côco	15%	30% a
Água de côco	20%	40%b
Extrato de batata	15%	0%
Extrato de batata	20%	0%

* Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Tabela 2 – Número médio de brotos adventícios formados por explantes nas diferentes concentrações de fitoreguladores de crescimento, no período de 50 dias.

TRATAMENTOS Kin mg/L + ANA mg/L	BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS / EXPLANTE
0,1 + 0,01	33 a
0,2 + 0,01	25 b
0,5 + 0,01	24b
0,5 + 0,1	18 c
1,0 + 0,5	0 d

* Médias não seguidas pela mesma letra diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

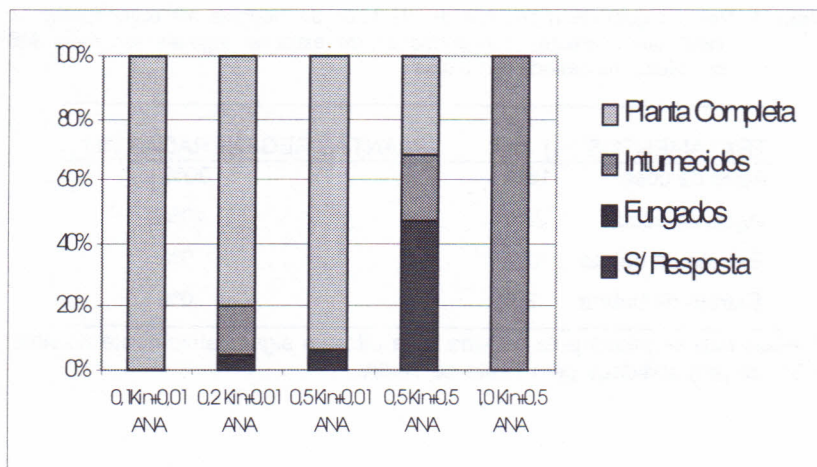


Figura 01 – Percentagem de respostas morfológicas de explantes de *Begonia rex* submetidos a diferentes concentrações e combinações de Cinetina e Ácido Naftaleno Acético (mg / l), em 50 dias.