

INFLUÊNCIA DA SACAROSE NO CRESCIMENTO E NO PERFIL DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM DUAS ESPÉCIES ARBÓREAS CULTIVADAS *IN VITRO*

Lindomar Maria de Souza¹
Marta Ribeiro Barbosa²
Robson Antonio de Souza³
Erik Castilho Bussmeyer⁴

RESUMO

O uso de técnicas de cultivo *in vitro* com fins de produção de mudas já é uma realidade biotecnológica que permite a manutenção da biodiversidade de muitas florestas. Todavia, altas concentrações de sacarose no meio de cultura podem influenciar negativamente o crescimento das plantas. Objetivou-se avaliar a influência de diferentes concentrações de sacarose no crescimento e perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas da Mata Atlântica cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais de *Handroanthus impetiginosus* e *Jacaranda brasiliana* foram obtidos de plantas *in vitro* e inoculados em meio WPM, acrescido de 0,1 g.L⁻¹ de inositol e 5,5 g.L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de sacarose: 0,0; 15,0 e 30,0 g.L⁻¹. Aos 50 dias de cultivo foi avaliado o comprimento da parte aérea, número de folhas, teor de clorofilas, razão *clorofila a/b* e carotenoides. Os dados foram submetidos ao Teste de Tukey a 5% de probabilidade. A adição de sacarose no meio de cultivo influenciou positivamente a emissão de folhas, entretanto não promoveram diferenças significativas no comprimento das brotações de *J. Brasiliana*. O teor de clorofilas totais foi maior a medida em que a concentração de sacarose aumentou. Não houve influência das concentrações de sacarose no conteúdo de carotenoides e na razão clorofilas a/b. Com base nos resultados a redução em 50% na concentração da sacarose no meio de cultivo não implica em perdas na qualidade das brotações e permite a redução dos custos para a produção de mudas dessas espécies.

Palavras-chave: *Jacaranda brasiliana*, *Handroanthus impetiginosus*, cultivo *in vitro*, fonte de carbono.

¹Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), lindomarsouza.ufrpe@gmail.com; martaribeiro21@hotmail.com; robson.souza@cetene.gov.br; erik.bussmeyer@cetene.gov.br.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a Mata Atlântica é considerada provavelmente o bioma mais devastado e ameaçado do planeta, sofrendo um ritmo de mudanças que está entre os mais rápidos observados. A necessidade de ações que visem à conservação é de grande urgência, visto que o processo de devastação desse bioma foi iniciado na colonização do Brasil e por se estender ao longo da costa do país, sofreu os impactos dos diversos ciclos econômicos durante sua história, particularmente durante o processo de urbanização e crescimento das cidades (CARDOSO, 2016).

Mais de 530 espécies de plantas da Mata Atlântica estão ameaçadas de extinção, portanto, é razoável especular que, diante de eventuais mudanças no habitat, decorrentes do aquecimento global, este já alarmante número de espécies ameaçadas irá aumentar, pois a fragmentação generalizada da floresta limita a migração e a colonização de espécies, necessárias para a persistência das populações em longo prazo (TABARELLI et al. 2005).

Com o intuito de mitigar as perdas de diversidade e áreas da Mata Atlântica, ações que visam a recuperação do bioma vêm sendo incentivadas e realizadas. Para tanto, a propagação de mudas é etapa crucial no suporte à iniciativas que visam a restauração e enriquecimento de áreas degradadas (OLIVEIRA, et al. 2016). O uso de técnicas de cultivo *in vitro* com fins de produção de mudas para reflorestamento e conservação de espécies já é uma realidade biotecnológica que permite a manutenção da biodiversidade de muitas florestas (ULISSES et al. 2010; CHANDRA et al. 2010).

No cultivo *in vitro* de plantas, o interior dos recipientes geralmente apresentam elevada umidade relativa, baixas concentrações de CO₂, acúmulo de etileno, onde as brotações crescem dependendo de uma fonte de carbono externa, que geralmente é suprida por altas concentrações de sacarose, sendo considerada o segundo componente do meio de cultura mais oneroso nessa técnica (ARENCEBIA et al. 2018; MIRANDA et al. 2016; SAHU & SAHU, 2013). A modificação de um ou mais desses fatores pode melhorar as taxas fotossintéticas, favorecendo o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de reduzir os custos de produção de mudas (SOUZA & HOULLOU, 2019).

Altas concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura podem influenciar negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (HASSANKHAH et al. 2014), por outro lado, a supressão ou redução desse componente no cultivo *in vitro* permite que as plantas modulem o metabolismo de carboidratos e assim, fotossintetizem mais facilmente

durante a aclimatização (LEMBRECHTS et al. 2017). Por isso, o crescimento e o desenvolvimento de plantas em um meio de cultivo sem adição de sacarose estão intimamente relacionados com a capacidade da espécie em melhorar seu desempenho nessas condições (MARTINS et al. 2015).

Pesquisas acerca do cultivo *in vitro* de espécies arbóreas têm sido realizadas com sucesso e os resultados demonstram a viabilidade da técnica na propagação de mudas, sendo o *Handroanthus* um dos gêneros dessas pesquisas (BASSEGIO et al. 2017; PEREIRA et al. 2015).

Comumente conhecida como ipê roxo, *Handroanthus impetiginosus* é uma espécie arbórea da família Begoniaceae (MARTINELLI & MORAES, 2013), originária do bioma Mata Atlântica e com ocorrência preferencialmente na floresta estacional decídua e semidecídua, podendo ocorrer também no Cerrado, Amazônia, Pantanal e Caatinga, tendo sua presença marcada nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-oeste e Sul do Brasil. É considerada heliófila e muito utilizada na regeneração de florestas e arborização urbana, encantando os locais públicos como ruas e parques com suas belas flores. Além disso, é uma espécie medicinal devido sua ação antiinflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica (CNCFlora, 2019). Devido sua importância econômica e por seu declínio verificado/projetado (MARTINELLI & MORAES, 2013), pesquisas recentes evidenciam a necessidade do estabelecimento, em curto prazo, de estratégias voltadas à conservação dessa espécie (MATOS et al. 2017).

Outra espécie de grande importância, é o *Jacaranda brasiliana*. Pertencente à família Bignoniaceae, é uma espécie pioneira, sendo muito bem empregada em ações que visam a recuperação de áreas degradadas. A espécie é utilizada também na arborização urbana. Suas propriedades medicinais são antiinflamatória, diurética, sudorífica, depurativa, tônica, adstringente. Sendo indicado contra o edema e a dor de articulações, porque o chá das folhas é usado para combater infecções cutâneas e reumatismo. Combate a sífilis e úlceras e as cascas do tronco são utilizadas para dermatites (MACEDO & FERREIRA, 2004).

Assim como as pesquisas voltadas para o cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Handroanthus*, pesquisas acerca focadas no gênero *Jacaranda* com o intuito de estabelecer o cultivos *in vitro* para a obtenção de processos que viabilizem a propagação de mudas é de suma importância. Sendo assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar a influência de diferentes concentrações de sacarose no crescimento e perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas da Mata Atlântica cultivadas *in vitro*.

METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica (LAPAB) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), localizado em Recife/PE-Brasil.

Plântulas germinadas *in vitro* foram utilizadas para obtenção de segmentos nodais (explantes) com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, os quais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio WPM (Wood Plant Medium) (LLOYD & MCCOWN, 1981), acrescido de 0,1 g.L⁻¹ de inositol e 5,5 g.L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de sacarose: 0,0; 15,0 e 30,0 g.L⁻¹. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram vedados com filme plástico de polipropileno para permitir maior entrada de luz. Em seguida os tubos foram mantidos em sala de crescimento a temperatura de 25°C ± 2, sob lâmpadas led branca, com intensidade luminosa de 42 μmol m² s⁻¹ por 50 dias. Ao final deste período, foi avaliados o comprimento da parte aérea, número de folhas, teor de clorofila *a*, *b*, e totais, razão clorofila *a/b* e carotenoides.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o Software SISVAR (FERREIRA, 2014) e apenas os da variável número de folhas foram transformados por x+1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento e o desenvolvimento das brotações foram diferentes entre as espécies em estudo. As brotações de ipê apresentaram maior comprimento da parte aérea em relação às do Jacarandá (Figura 1A).

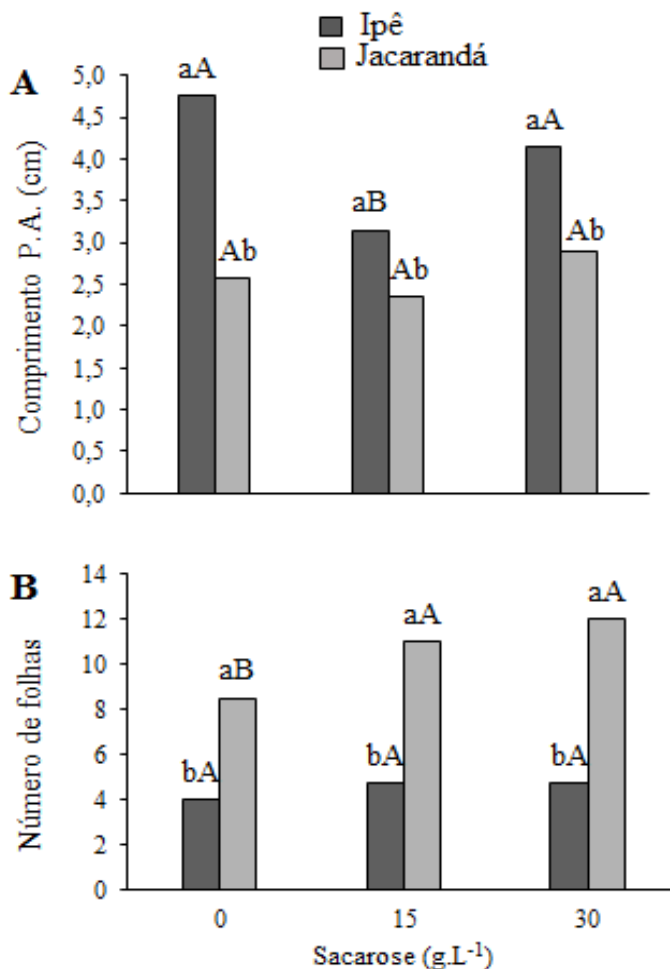


Figura 1. Comprimento da parte aérea (A) e número de folhas (B) em *Handroanthus impetiginosus* e *Jacaranda brasiliana* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose.

As concentrações de sacarose no meio de cultivo não promoveram diferenças significativas no comprimento das brotações de *J. brasiliana*. Por outro lado, as brotações de *Handroanthus impetiginosus* apresentaram menor comprimento da parte aérea na concentração de 15,0 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 1A).

A redução das taxas fotossintéticas *in vitro* se dá principalmente pelo excesso de sacarose adicionada ao meio de cultura, uma vez que esse componente pode exercer um feedback negativo sobre enzimas relacionadas ao processo fotossintético (LOBO et al. 2015; FURBANK et al. 1997).

Cada espécie pode responder de maneira diferente à adição de sacarose ao meio de cultivo. Fernandes et al. (2013) avaliando o efeito de diferentes concentrações de sacarose na micropropagação de *Tectona grandis* verificaram que não houve influência deste composto no

crescimento das plantas, demonstrando que baixas concentrações deste componente podem ser utilizadas, resultando na economia dos insumos do meio de cultura.

Estudo realizado por Khan et al. (2002) aponta que a supressão da sacarose no meio de cultura combinado com o aumento da intensidade luminosa favoreceu o comprimento das brotações de *Eucalyptus tereticornis*.

A adição de sacarose no meio de cultura influenciou positivamente na emissão de folhas nas brotações de *J. brasiliiana* (Figura 1B). Já em *Handroanthus impetiginosus* não houve diferenças significativas para o número de folhas em detrimento das concentrações de sacarose (Figura 1B).

A supressão da sacarose no meio de cultivo favoreceu o aumento do número de folhas em plantas de *Acacia mangium* cultivadas *in vitro* (ERMAYANTI et al. 1999). O número e o tamanho das folhas estão intimamente atrelados com a área fotossintetizante da planta.

Assim sendo, a fotossíntese tem início com a captação de luz pelas clorofilas, onde a clorofila *a* é tida como pigmento principal e a clorofila *b* como pigmento acessório, evitando que o excesso de energia luminosa acarrete danos aos fotossistemas e comprometa o processo fotossintético (LICHTENTHALER, 1987).

Os resultados dos teores de clorofila *a* (Chl *a*) variaram em função da espécie e das concentrações de sacarose (Figura 2).

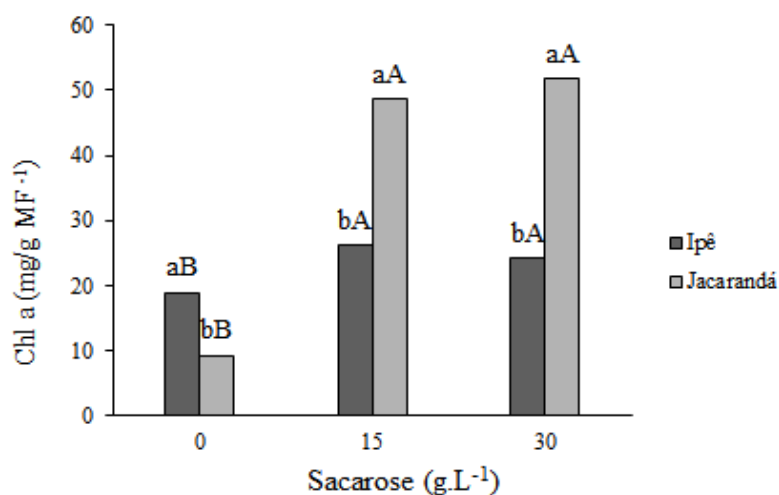


Figura 2. Teor de clorofila *a* em folhas de *Handroanthus impetiginosus* e *Jacarandá brasiliiana* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose.

De um modo geral, as brotações regeneradas em meio contendo sacarose apresentaram maiores teores de clorofila *a* (Figura 2). Entre as espécies, observou-se que o *Jacarandá*

brasiliiana apresentou maiores médias desse pigmento nos meios contendo sacarose em relação ao *Handroanthus impetiginosus*. O ipê roxo, embora tenha apresentado diferenças significativas nos teores de chl_a entre as concentrações de sacarose, essa diferença é menor do que àquela observada para *J. brasiliiana* (Figura 2).

A quantificação dos teores de clorofilas em plantas propagadas *in vitro* fornece informações importantes sobre o estado fotossintético durante a micropropagação (YADAV et al. 2010), visto que o conteúdo desses pigmentos estão diretamente relacionados com metabolismo primário (DUTTA GUPTA & PATTANAYAK, 2017) e podem influenciar na sobrevivência das plantas durante a aclimatização (LOBO et al. 2015).

Os teores de clorofila *b* (Chl_b) variaram entre as espécies estudadas, onde o *J. brasiliiana* teve os maiores valores médios desse pigmento. Entretanto, não houve diferenças significativas em função das concentrações de sacarose adicionadas no meio de cultivo (Figura 3A, B).

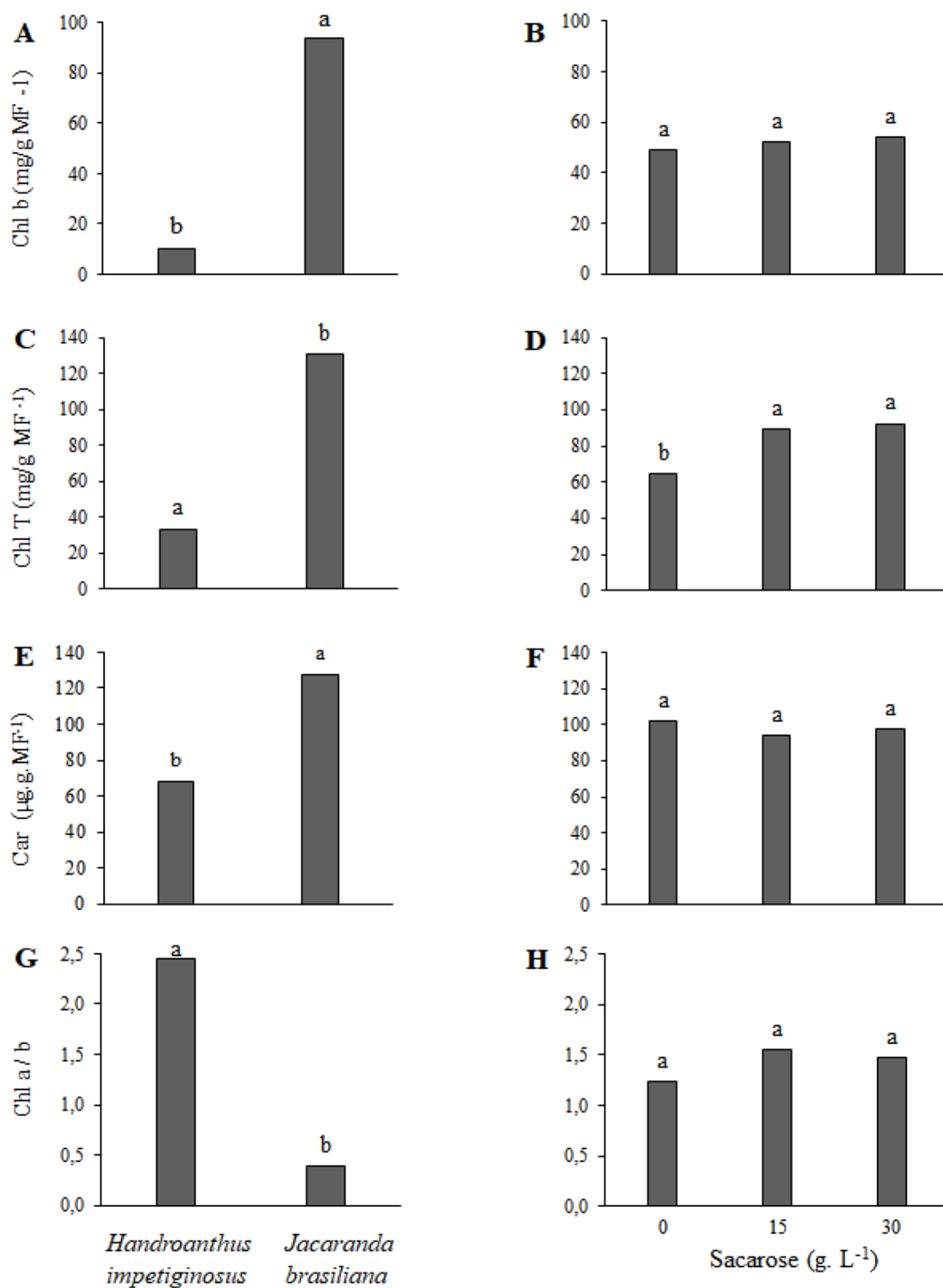


Figura 3. Teor de clorofila *b* (A, B), *totais* (C, D), carotenoides (E, F) e razão clorofila *a/b* (G, H) em folhas de *Handroanthus impetiginosus* e *Jacaranda brasiliana* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose.

De modo semelhante, para os teores de clorofilas totais (ChIT) e carotenoides (Car), a espécie *J. brasiliiana* apresentou os maiores valores desses pigmentos (Figura 3C, F).

A supressão da sacarose no meio de cultivo influenciou significativamente na redução dos teores de ChIT em ambas as espécies (Figura 3D). Resultado semelhante foi encontrado por Furbank et al. (1997) avaliando o conteúdo de clorofilas em plantas de *Nicotiana tabacum*.

Arencibia et al. (2018) verificaram que a redução em 50% da concentração de sacarose usual no meio de cultura (3%) melhorou o enraizamento e a qualidade das brotações de *Populus* spp. cultivadas *in vitro*. Geralmente no cultivo *in vitro*, as culturas apresentam baixos teores de clorofilas e/ou redução na atividade ou inativação de enzimas relacionadas à fotossíntese.

A adição de sacarose no meio de cultivo não influenciou nos teores de carotenoides nas duas espécies (Figura 3F). A manutenção dos teores de carotenoides em plantas micropropagadas é de grande importância, pois além de desempenharem a função de pigmentos acessório na fotossíntese, são antioxidantes, atuando na prevenção dos danos oxidativos nas células ocasionados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SUN et al., 2018; HAVAUX, 2013).

A razão clorofila a/b foi diferente entre as espécies, com maior a/b para *H. impertiginosus* (Figura 3G). As concentrações de sacarose não influenciaram na razão clorofila a/b nas duas espécies estudadas (Figura 3H), sendo uma importante resposta, uma vez que a razão clorofila a/b pode indicar a eficiência dos fotossistemas em diversas condições ambientais (VICTÓRIO et al. 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução em 50% na concentração da sacarose no meio de cultivo não implica em perdas na qualidade das brotações e permite a redução dos custos para a produção de mudas dessas espécies.

A manutenção dos teores de carotenoides e da razão clorofila a/b pode ser considerado um bom indicativo da qualidade das brotações.

REFERÊNCIAS

- ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M. A.; ORELLANA, F.; ALARCÓN, J. E.; CORTEZ, N.; VALENZUELA, M. A. Establishment of photomixotrophic cultures for high-scale micropropagation by temporary immersion bioreactors (TIBs) in plant commercial species. **Acta Horticulturae**, v. 1224, p. 203–208, 2018.
- BASSEGIO, C.; FOGAÇA, L. A.; BALTAZAR, P.; EMMEL. Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de bap (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 1, p. 72-80. 2017.
- CARDOSO, J. T. A Mata Atlântica e sua conservação. **Encontros Teológicos adere a uma Licença Creative Commons**. v. 31, n.3, p. 441-458, 2016.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1199–1205, 2010.
- CNCFlora. *Handroanthus impetiginosus* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Handroanthus_impetiginosus>. Acesso em 05/11/2019.
- DUTTA GUPTA, S.; PATTANAYAK, A. K. Intelligent image analysis (IIA) using artificial neural network (ANN) for non-invasive estimation of chlorophyll content in micropropagated plants of potato. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 6, p. 520–526, 2017.
- ERMAYANTI, T.M., IMELDA, M., TAJUDDIN, T., KUBOTA, C. AND KOZAI, T. Growth promotion by controlling in vitro environment in micropropagation of tropical plant species. Proc. of The Tokyo. **International Forum on Conservation and Sustainable Use of Tropical Bioresources**. NEDO and IBA, Tokyo, pp. 10-25. 1999.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, p.109-112, 2014.
- FURBANK, R. T.; PRITCHARD, J.; JENKINS, C. L. D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant *Tobacco* and the C4 plant *Flaveria bidentis*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 3, p. 291 – 299, 1997.
- HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M.; PREECE, J.; ASSAREH, M. Effects of ventilation and sucrose concentrations on the Growth and plantlet

anatomy of micropropagated Persian Walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 1, p. 111-120, 2014.

HAVAUX, M. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. **The Plant Journal**, disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tpj.12386/epdf>>, v. 79, p. 597 – 606, 2013.

KHAN, P. S. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 141–146, 2002.

LEMBRECHTSA, R.; CEUSTERSB, N.; PROFTA, M. P.; CEUSTERSB, J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 224, p. 226–231, 2017.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LLOYD, G; McCOWN, B. Micropropagação comercialmente viável do louro da montanha, *Kalmia latifolia* , pelo uso da cultura de ponta de broto. **Proc. In. Plant Prop. Soc.** v. 30, p.421–427, 1981.

LOBO, A. K. M.; MARTINS, M. O.; LIMA NETO, M. C.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, F. V.; SILVEIRA, J. A. G. Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 113–121, 2015.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 40-44, 2004.

MARTINELLI, G. MORAES, M. A. Livro Vermelho da Flora do Brasil. 1. Ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: **Instituto de Pesquisas jardim Botânico do Rio de Janeiro**, p. 20-25, 2013.

MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science** 9, p. 85-91, 2015.

MATOS, M. F. S.; SCARANTE, A.; SOARES, M. T. S.; BOGNOLA, I. A.; WREGE, M. S. Distribuição de *Handroanthus impetiginosus* no Brasil e as projeções futuras conforme as

mudanças climáticas globais. **Anais do V Simpósio de Mudanças Climáticas e Desertificação no Semiárido Brasileiro**, p. 1-11, 2017.

MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; GONÇALVES, J. F.; ROCHA, F. M. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia Forestalis** v. 44, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; OGATA, R. S.; ANDRADE, G. A.; SANTOS, D. S.; SOUZA, R. M.; GUIMARAES, T. G.; SILVA JÚNIOR, M. C.; PEREIRA, D. J. S.; RIBEIRO, J. F. **Manual de viveiro e produção de mudas: espécies arbóreas nativas do Cerrado**. 1. ed. Brasília, DF: Universidade de Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2016. 124 p.

PEREIRA, M. O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotricus*). **Nativa, Sinop**, v. 3, n. 1, p. 59-63. 2015.

SAHU, J.; SAHU, R. K. A review on low cost methods for *in vitro* micropropagation of plant through tissue culture technique. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, v. 1, p. 38-41, 2013.

SOUZA, L. M.; HOULLOU, L. M. Micropropagação de espécies arbóreas: Alternativa biotecnológica na recuperação de ambientes degradados. In: Seabra G, Marcelino MM, Potuguez AP, Oliveira Junior A, Neu C, Seabra GF, Oliveira HCM, Araújo LF, Pereira MIC TERRA Mudanças Climáticas e Biodiversidade. **Editora Ituiutaba: Barvalento** 1:837-847. ISBN: 978-85-68066-56-0. 2019.

SUN, T.; YUAN, H.; CAO, H.; YAZDANI, M.; TADMOR, Y. Carotenoid Metabolism in Plants: The role of plastids. **Molecular plant**. v. 11, n. 1, p. 58-74, 2018.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. MC.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v.1, n. 1, p. 132-138, 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.

VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 213-215, 2007.

YADAV, S. P.; IBARAKI, Y.; DUTTA GUPTA, S. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, n. 2, p. 183–188, 2009.