

CONCENTRAÇÕES DE SAIS DO MEIO MS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Desmodium incanum*

Raíssa Schwalbert¹, Joseila Maldaner², Marta Farias Aita², Gláucia Azevedo do Amaral², Adriana Kroef Tarouco²

1. Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal de Santa Maria (raissa_schwalbert@hotmail.com)
2. Pesquisadora Doutora da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária-FEPAGRO – Rio Grande do Sul

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Desmodium incanum é uma leguminosa nativa ocorrente nas pastagens naturais do Rio Grande do Sul, considerada ótima forrageira devido às suas características de frequência, ciclo, produtividade e aceitação pelos animais. Objetivou-se testar o requerimento nutricional de *D. incanum* em cultivo *in vitro*, através de variações na concentração dos nutrientes no meio de cultura. Acompanhou-se a germinação e o desenvolvimento de *D. incanum* nos seguintes tratamentos: meio MS completo; em meio MS/2 (com metade da concentração de nutrientes minerais do meio MS) e em meio MS-Fe/2 (meio MS com metade da concentração de ferro). Observou-se diferença significativa na altura das brotações e no número de folhas por plântula em resposta aos tratamentos, sendo que as maiores médias para ambas as variáveis foram observadas em meio de cultura MS com metade da concentração de sais (MS/2), enquanto o número de brotações e o número de raízes não variaram significativamente em resposta aos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Forrageiras, leguminosas, micropropagação, requerimento nutricional.

SALT CONCENTRATIONS OF MS CULTURE MEDIUM IN *IN VITRO* CULTURE OF *Desmodium incanum*

ABSTRACT

Desmodium incanum is a native legume occurring in natural pastures of Rio Grande do Sul, it is considered excellent forage due to its characteristics of frequency, cycle, productivity and acceptance by animals. This study aimed to test the nutritional requirement of *D. incanum* in *in vitro* cultivation, through variations in the nutrients concentration in the culture medium. The germination and development of *D. incanum* were observed in the following treatments: MS medium; MS/2 medium (with half strength MS medium nutrients) and MS-Fe/2 (MS medium with half concentration of iron). There was significant difference in the height of shoots and number of leaves in response to treatments, with the highest averages for both variables in MS medium with half the concentration of salts (MS/2), while the number of shoots and the number of roots did not vary significantly in response to treatments.

KEYWORDS: Forage, legumes, micropropagation, nutritional requirement.

INTRODUÇÃO

Desmodium incanum DC. é uma leguminosa nativa, perene, de clima estival, popularmente conhecida como “pega-pega” (OLIVEIRA, 1983). É considerada a leguminosa mais frequente nos campos, segundo BOLDRINI (1993), ocorrendo em todas as regiões do estado do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 1983). De acordo com suas características de frequência, ciclo de vida, produtividade e aceitação pelos animais, é apontada como ótima forrageira (BARRETO & KAPPEL, 1967).

Embora a iminência da degradação do bioma Pampa seja uma realidade alarmante, as áreas remanescentes de pastagens naturais do Rio Grande do Sul estão presentes, em sua maioria, em áreas marginais, constituídas de solos ácidos e de baixa fertilidade, e representam uma porção importante na produção forrageira da pecuária sul brasileira (VALENCIA & LIGARRETO, 2012). As pastagens naturais suprem em grande parte as necessidades forrageiras para a produção pecuária do Rio Grande do Sul, sendo incomum nessas áreas as práticas como adubação ou correção do solo. Contudo, alternativas para a conservação da diversidade associadas a estudos que visem um melhor entendimento dos requerimentos dessas espécies são de fundamental importância para a preservação do bioma e até mesmo para otimizar a produção animal em campo nativo.

Sendo uma forma de propagação vegetativa, a cultura de tecidos vegetais apresenta como uma das principais vantagens o aumento em grande escala do número de indivíduos, a garantia da manutenção da biodiversidade e conservação do germoplasma (SARTOR et al., 2012). O tipo de formulação mineral mais adequado para o cultivo de diversas espécies vegetais tem variado bastante, mesmo entre espécies com hábitos semelhantes. O meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e suas variações destacam-se como sendo os mais utilizados em cultura de tecidos vegetais para a maioria das espécies herbáceas (BERTOZZO & MACHADO 2010). Além disso, estudos de meios de cultura que favoreçam a germinação *in vitro* são importantes, tanto para maximizar a taxa de germinação como para obter plântulas com qualidade (ROSA et al., 2012).

Nesse contexto, a cultura de tecidos e suas técnicas são especialmente úteis para espécies de plantas nativas pelo fato de possibilitar sua utilização por meio da propagação massal de mudas, bem como por representar uma alternativa na conservação da diversidade genética do germoplasma de espécies de diferentes origens (CHAGAS et al., 2012). Bem como, podem ser importantes ferramentas para programas de melhoramento genético de espécies vegetais, com os propósitos de acelerar e gerar resultados de alta confiabilidade (GOLLE et al., 2009).

Não há, até o momento, registros de trabalhos abordando aspectos da propagação *in vitro* de *D. incanum*. Assim, este trabalho teve como objetivo testar o requerimento nutricional de *D. incanum* em cultivo *in vitro*, através de variações na concentração dos nutrientes no meio de cultura.

Os resultados apresentados são dados parciais de um projeto que propõe o estabelecimento de uma coleção de germoplasma *in vitro* de espécies nativas do bioma Pampa com potencial forrageiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes (1,5 gramas) de *Desmodium incanum*, escarificadas mecanicamente em lixa 120 (nº de grãos de areia por cm²), foram desinfestadas por meio de lavagem em água com detergente comercial (2 gotas 100 mL⁻¹) durante dois minutos; imersão em solução de álcool 70% (v/v) por 45 segundos; imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) acrescido de detergente (2 gotas 100mL⁻¹)

por cinco a sete minutos; cinco lavagens em água destilada e autoclavada. Todas as etapas foram feitas sob agitação constante e em condições assépticas.

Após esse processo foram colocadas para germinar em meio MS (MURASHIGE & SCOOG, 1962); em meio MS/2, ou seja, com metade da concentração de nutrientes minerais do meio MS e em meio MS-Fe/2, ou seja, meio MS com metade da concentração de ferro. Em todos os tratamentos o meio foi acrescido de 30gL^{-1} de sacarose, 100mgL^{-1} de mio-inositol e 7gL^{-1} de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $35\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições, sendo a unidade experimental constituída por um frasco (100 mL) com aproximadamente 20 mL de meio de cultura contendo três sementes.

Trinta dias após a instalação do experimento foram avaliados altura das brotações, número de brotações, número de folhas e número de raízes por planta. Os dados resultantes foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com $\alpha=0,01$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software* ASSISTAT 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância foi possível verificar que as plântulas de *Desmodium incanum*, cultivadas em meio de cultura MS com metade da concentração de sais do meio, apresentaram as maiores médias para as variáveis: altura das brotações e número de folhas por plântula quando comparadas àquelas cultivadas em meio MS completo ou com redução a metade da concentração de ferro (Fig. 1 A e C). A espécie *D. incanum* é natural dos campos sulinos, estando, portanto habituada a condições de baixa acidez do solo, e conseqüentemente baixa fertilidade deste (CORADIN et al., 2011). O pH baixo do solo acarreta uma série de conseqüências, dentre elas a indisponibilidade de alguns nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (SOUZA et al., 2010).

O meio de cultura MS é reconhecidamente um meio muito rico em macronutrientes, micronutrientes e vitaminas (DEZAN et al., 2012), no entanto as exigências nutricionais são bastante específicas, variando grandemente entre as diferentes espécies. O suprimento inadequado de um elemento essencial (excesso ou deficiência) pode resultar em prejuízos para o desenvolvimento vegetal. O excesso de nutrientes, por exemplo, pode provocar danos por salinidade, ou seja, ocorre um desequilíbrio osmótico que afeta negativamente a absorção de água pelas raízes.

GEORGE (1993) afirma que a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio. SOUZA et al. (2010), trabalhando com germinação de pinhão manso, submetidos ao estresse salino em diferentes concentrações, observaram que a salinidade causou atraso no processo de germinação das sementes e uma redução no crescimento inicial das plântulas. Neste sentido, pode-se inferir que a concentração de 50% do meio MS foi a que mais se assemelhou às condições habituais naturais do *D. incanum*, de acordo com suas exigências nutricionais, proporcionando uma melhor resposta no cultivo *in vitro*.

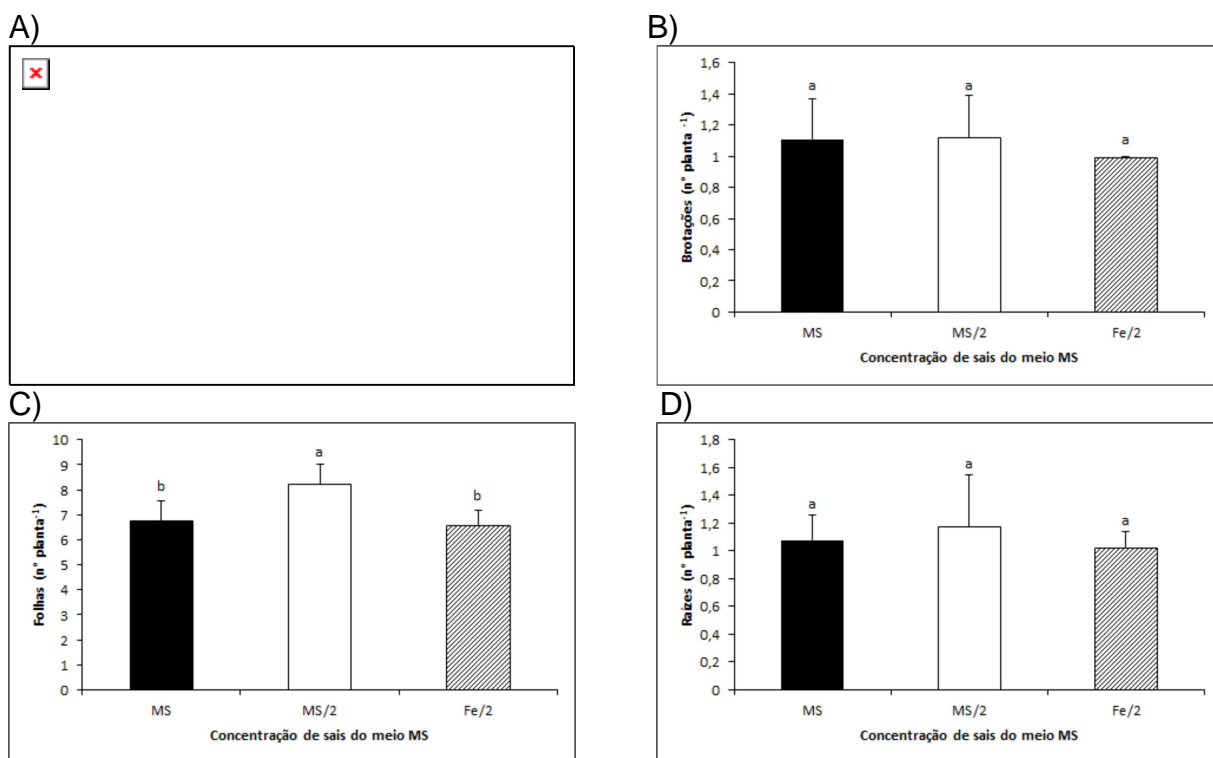


FIGURA 1: Efeito da concentração de sais do meio MS na altura das brotações (A) no número de brotações (B), no número de folhas (C) e no número de raízes (D) de *Desmodium incanum* cultivado *in vitro*.

Outros trabalhos igualmente reportam que a redução na concentração de sais do meio de cultura MS é benéfica para o desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies, como por exemplo, para orquídeas (PEDROSO-DE-MORAES et al., 2009, CORDEIRO et al., 2011, CUNHA et al., 2011), e para *Schomburgkia gloriosa* Lindl (DEZAN et al., 2012). RODRIGUES et al. (2013), avaliando diferentes concentrações de sais do meio MS (0, 25, 50, 75 e 100%) no cultivo *in vitro* de *Physalis peruviana*, identificaram o meio com 50% dos sais como o mais eficiente para a multiplicação *in vitro* da espécie, utilizando suplementação de 1,3 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina.

O número de brotações (Fig. 1B) e o número de raízes (Fig. 1D) não variaram significativamente nos diferentes tratamentos aplicados. Diferentemente dos resultados apresentados, ANIS et al. (2010) observaram a vantagem do meio MS reduzido à metade de sua concentração de sais sobre os processos rizogênicos em segmentos nodais de *Balanites aegyptiaca* (Zygophyllaceae). BIASI et al. (1998) também relataram que a concentração de 50% dos sais do MS maximizou o número de raízes por planta de videira (*Vitis vinifera*). Além disso, concentrações de sais no meio básico MS reduzidas à 1/2, 1/3 ou 1/4 resultaram em um melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Cainguangue (DANTAS et al., 2000 citado por LEITZKE, et al. 2009). Em oposição, o número de brotos formado por explante de amoreira preta foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do meio de cultura, sendo o maior número de brotos obtido no tratamento com 150% da concentração padrão de sais do meio MS (LEITZKE, et al. 2009). Assim, pode-se concluir que essas variáveis resposta são espécie-dependentes.

A redução da concentração do ferro não promoveu resultados significativamente diferentes daqueles apresentados pelas plântulas cultivadas em meio MS completo (Fig. 1). Demonstrando que a concentração utilizada é suficiente para suprir o requerimento deste mineral em *D. incanum*. As plantas necessitam do nutriente mineral ferro (Fe) intracelular como catalisador para a síntese da clorofila. O Fe também está presente em uma série de enzimas fundamentais. A alta afinidade do Fe para formar complexos com vários ligantes (por exemplo, ácidos orgânicos e fosfatos) e a capacidade em alterar a sua valência são as duas características importantes que formam a base dos numerosos efeitos fisiológicos desse nutriente (MOTHÉ et al., 2012).

CONCLUSÕES

O meio MS com metade da concentração de sais estimulou o crescimento em altura e o número de folhas em *Desmodium incanum*, sendo uma composição favorável ao desenvolvimento *in vitro* para a espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo financiamento do projeto e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio fornecido ao longo deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANIS, M.; VARSHNEY, A.; SIDDIQUE, I. *In vitro* clonal propagation of *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. **Agroforestry systems**, v.78, n.2, p. 151-158, 2010.
- BARRETO, I.L.; KAPPEL, A. Principais espécies de gramíneas e leguminosas das pastagens naturais do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL, 15, 1964, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS. p.281-294, 1967.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I.S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, 2010.
- BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S; POMMER, C.V. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1587-1594, 1998.
- BOLDRINI, I.I. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos, Depressão Central, RS**. Porto Alegre, 1993. 262f. Tese (doutorado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CHAGAS, E.A.; PASQUAL, M.; SOARES, J.D.R.; RODRIGUES, F.A. **Tissue culture techniques for native Amazonian fruit trees**. In: LEVA, A.; RINALDIP, M.R. (Eds.). Recent advances in plant in vitro culture. Croatia: InTech Prepress, p. 151-164, 2012.

CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Sul. **Brasília: MMA**, 934p., 2011.

CORDEIRO, G.M.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; MASSARO, R.; CUNHA, T. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindleey) em diferentes meios de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.18, pp. 22-28, 2011.

CUNHA, T.; CORDEIRO, G.M.; MASSARO, R.; DEZAN, L.F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v.7, pp.1-5, 2011.

DEZAN, L.F.; CANASSA, F.; SOUZA-LEAL, T.; DIOGO, J.A.; MASSARO, R.; CORDEIRO, G.M.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificados. **Idesia**, v.30, n.2, 2012.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture: part 1 –**The technology**. 2 ed. Edington, Exegetics Limited, 1574p., 1993.

GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; BEVILACQUA, C.B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, 2009.

LEITZKE, L.N, DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'xavante': efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência Agrotecnologia**, v.33, Edição Especial, p. 1959-1966, 2009.

MOTHÉ, G.P.B. **Capacidade fotossintética e crescimento de dois genótipos de *Ricinus communis* L. em resposta a doses de material sólido particulado à base de ferro aplicadas ao solo**. Dissertação 2012. 64 f. (Mestrado Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro)

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v.15, p. 473-479, 1962.

OLIVEIRA, M. de L.A.A. de. Estudo taxonômico do gênero *Desmodium* Desv. (Leguminosae, Faboideae, Desmodieae). **Iheringia Série Botânica**, v.31, p.37-104, 1983.

PEDROSO-DE-MORAES, C.; DIOGO, J.A.; PEDRO, N.P.; CANABRAVA, R.I.; MARTINI, G.A.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, pp. 67-69, 2009.

RODRIGUES, F.A.; PENONI E.S.; SOARES, J.D.R. & PASQUAL, M. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, v.29, n.1, p.77–82, 2013.

ROSA, F.C.; REINIGER, L.R.S.; GOLLE, D.P.; MUNIZ, M.F.B.; CURTI, A.R. Superação da dormência e germinação in vitro de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, 2012.

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, v.3, n.1, p.31-39, 2012.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4,n.1, p. 71-78, 2002.

SOUZA, Y. A.; PEREIRA, A.L.; SILVA, F.F.S. da; REIS, R.C.R.; EVANGELISTA, M.R.V.; CASTRO, R.D.de, DANTAS, B.F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 083-092, 2010.

VALENCIA, R. A. R.; LIGARRETO, G. A. M. Differential response of plants to aluminum. A review. **Agromía Colombiana**, v.30, p.71-77, 2012.