

# REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DE COUVE-COMUM (*Brassica oleracea* L. Var *Acephala*) A PARTIR DE CALOS PROVENIENTES DE TECIDOS FOLIARES.

V. M. T. S. DONATO<sup>1</sup>; A. G. de ANDRADE<sup>2</sup> & J. B. CABRAL<sup>3</sup>

1. Engenheira Agrônoma, MSc. Bolsista da CAPES/IPA. Rua Padre Anchieta, 473/601 Torre, CEP 50710-430, Recife-PE E-MAIL: [vmtdonato@uol.com.br](mailto:vmtdonato@uol.com.br)

2. Químico, Dr., Prof. Adj. Dep. Química da UFRPE. Rua D. Manoel de Medeiros s/n. Dois Irmãos, CEP.52171-030 Recife-PE.

3. Biólogo, MSc, Pesquisador, Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA.

Aceito para publicação em: 12/12/2002.

## RESUMO

A organogênese utilizada como via de regeneração de plantas, apresenta-se atualmente como importante instrumento para a transformação genética de plantas. O presente trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo eficiente para a obtenção de plantas de couve-comum (*Brassica oleracea* L. var *acephala*), via organogênese. Para a obtenção de calos, foram inoculados folhas jovens em meios MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/l de ANA combinados tanto com KIN quanto com BAP, nas concentrações 0,0; 0,01; 0,05; 0,10 e 1,0 mg/l. Observou-se que a presença tanto do KIN quanto do BAP não foi efetiva para o desenvolvimento de broto. No entanto a presença do ANA foi eficiente para a organogênese indireta de broto, sendo 1 mg/l a concentração que apresentou maior intensidade e frequência e brotação.

**Palavras-chave:** *Brassica oleracea* L. var *acephala*, Organogênese

## ABSTRACT

***IN VITRO* REGENERATION OF PLANTS OF CABBAGE-COMMON (*Brassica oleracea* L. Var. *Acephala*), FROM CALLUS DERIVING FROM LEAVES TISSUE.**

The organogenesis used as way of regeneration of plants, comes now as important instrument for the genetic transformation of plants. The present work had as objective the establishment of an efficient protocol for the obtaining of plants of cabbage-common (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), through organogenesis. For the obtaining of callus was inoculated young leaves in basic medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 0,5; 1,0; 2,0 and 5,0 mg/l of ANA combined so much with KIN as with BAP, in the concentrations 0,0; 0,01; 0,05; 0,1 and 1,0 mg/l. It was observed that the so much of KIN presence as of BAP it was not effective for the sprout development. However the presence of the ANA was efficient for the indirect organogenesis of sprout, being 1mg/l the concentration that presented larger intensity and frequency and sprout.

**Key words:** *Brassica oleracea* L. var *acephala*, Organogenesis.

## INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos, que tem como principal objetivo a limpeza clonal ou a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (Grattapaglia & Machado, 1998).

A cultura de tecido de plantas tem sido largamente utilizada como um sistema experimental para o estudo do crescimento e morfogênese *in vitro*. A diferenciação induzida, a partir da organogênese direta ou indireta, tem sido relatada para várias culturas, inclusive para a *Brassica napus* L. (Kartha, Gomborg e Constabel, 1971). *B. oleracea* var. *Itálica* (Johnson e Nitchell Jr., 1978) e *B. oleracea* L. var *Camprestis* (Dunwell, 1981).

Por outro lado, a regeneração e desenvolvimento de plantas de couve-comum (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) a partir de calo não havia sido muito relatado. No entanto, sabe-se que as brassicas possuem um potencial poder regenerativo. Utilizando tecido floral de *B. oleracea* var. *Botrytis* (couve-flor), Margara (1961) definiu os reguladores de crescimento e outros constituintes necessários para induzir um bom índice de regeneração. Subsequentemente, Lustinec e Horak (1970) obtiveram plantas regeneradas a partir de calos desenvolvidos em tecidos de várias partes da planta.

Por outro lado, discuti-se muito se a obtenção de plantas via calo é um bom sistema para clonar plantas. Embora seja pertinente, há também nessa preocupação muita carga especulativa. Dentro da biotecnologia, clone é um termo de origem botânica e representa a ideia de plantas que se originam de uma mesma matriz e, teoricamente, possuem o mesmo genótipo. Em cultura de tecidos, isso não necessariamente pode ser verdade, por isso, a dificuldade em aceitar sem suspeitas plantas provenientes de calo. Quando essa variabilidade morfogenética acontece a denominamos de variação somaclonal, que embora seja indesejável para a propagação clonal, possui muito potencial nos estudos de melhoramento vegetal (Cid, 2001).

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), a regeneração de plantas a partir de gemas adventícias são desejáveis como sistema de multiplicação, desde que a formação de calo seja mínima. Considerando que a desdiferenciação do tecido utilizado como explante, implica na passagem por uma fase de calo que em geral, depende da ação de reguladores de crescimento. Neste caso, os tecidos produzidos estão mais sujeitos a modificações genéticas. Horak et al. 1975, por exemplo relata que regenerou plantas de *B. oleracea* var. *Medulosa*, a partir de calos, com modificações na morfologia e pigmentação das folhas e ainda modificações no número cromossômico.

O presente trabalho teve como objetivo induzir a regeneração de plantas a partir de calos proliferados em tecidos foliares para possível utilização no melhoramento genético.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado no presente trabalho, couve - comum (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), foi fornecido pelo programa de hortícolas do IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária). As plantas foram cultivadas em vasos com solo estéril e mantidas em telado. Como fonte de explante foram utilizadas folhas imaturas, coletadas em gemas caulinares apicais e laterais de plantas com aproximadamente 20 dias após o transplante para os vasos.

Antes da secção dos explantes, as folhas foram submetidas a um prévio processo de assepsia que consistiu na imersão das mesmas, em álcool a 70% (v/v) durante 1-3

minutos e, posteriormente, em solução de hipoclorito de cálcio a 2% (p/v), por 15 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em água destilada estéril.

Os explantes foram excizados sob condições assépticas, em câmaras de fluxo laminar. Em seguida foram inoculados, sob as mesmas condições, em potes de vidro contendo 30 ml de meio nutritivo MS segundo Murashige e Skoog (1962), suplementado com ANA (ácido naftalenoacético) como fonte de auxina além de KIN (6-furfurilamino-purina) e BAP (6-benzilaminopurina), como fontes de citocinina, conforme combinações relacionadas nas Tabelas 1 e 2. Todos os meios foram solidificados com agar e o pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem.

**Tabela 1.** Combinações entre ANA e KIN, em meio MS, utilizadas para promover o desenvolvimento de calos.

Níveis de ANA (mg/L)	Níveis de KIN				
	0.0	0.01	0.05	0.10	1.00
0.50	E1	E2	E3	E4	E5
1.00	E6	E7	E8	E9	E10
2.00	E11	E12	E13	E14	E15
5.00	E16	E17	E18	E19	E20

**Tabela 2.** Combinações entre ANA e BAP, em meio MS, utilizadas para promover o desenvolvimento de calos.

Níveis de ANA (mg/L)	Níveis de BAP				
	0.0	0.01	0.05	0.10	1.00
0.50	E21	E22	E23	E24	E25
1.00	E26	E27	E28	E29	E30
2.00	E31	E32	E33	E34	E35
5.00	E36	E37	E38	E39	E40

Os potes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  em 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Os explantes foram distribuídos de forma inteiramente casualizada, permaneceram no meio para indução de calo durante 30 dias, período no qual foram feitas duas avaliações aos 15 e 30 dias após inoculação. As avaliações foram feitas com base em observações visuais e parâmetros qualitativos e quantitativo para a presença de calo, raiz e número de brotos respectivamente, desenvolvido durante o período de cultivo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tipo e a concentração do regulador de crescimento utilizado para cultivo *in vitro* estão diretamente relacionados com a planta. Cada espécie responde de maneira diferente a determinadas concentrações e tipos de reguladores de crescimento. Para a couve-comum, por exemplo, observou-se pelos resultados obtidos no presente trabalho, que o ANA não se mostrou adequado para a indução de calos embriogênicos por produzir raiz em grande quantidade, embora tenha sido eficiente na promoção de organogênese indireta de broto.

Para os meios de cultura nos quais foram utilizados o ANA como fonte de auxina, combinados tanto com BAP quanto com KIN, verificou-se que após a segunda semana de cultivo ocorreu desenvolvimento de raiz em 100% dos explantes cultivados. As raízes surgiram tanto diretamente no tecido apenas entumescido, como naqueles que apresentavam alguma formação de calo. Resultados similares foram

observados anteriormente por Figueredo e Squibel (1991), quando cultivaram explantes de *Datura insignis* Barb. Rodr. em meio suplementado com BA (0,6 mg/L) e ANA (2,00 mg/L). O mesmo resultado foi observado, recentemente, por Jr. Molinar et al. (1996) em explantes de *Berberis trifoliata* Moric., cultivados na presença de  $1 \mu \text{M}$  de ANA, onde foi observado a formação intensa de raiz seguida da organogênese de broto.

Subsequentemente, em torno da quarta semana de cultivo, além da presença intensa de raiz ocorreu organogênese de brotos, principalmente, nos meios de cultura desprovidos tanto de BAP quanto de KIN, conforme representam as tabelas 1 e 2. Da mesma forma, Keller e Armstrong (1977) já haviam observado que ao cultivarem anteras de *B. napus* L. em meio suplementado com ANA (0,09 mg/L) e BA (0,1 mg/L), ocorria um aumento significativo no desenvolvimento do calo com regeneração de múltiplos brotos em 2 a 4 semanas de cultivo. Comportamento similar relacionado a presença do ANA no meio de cultura, também foi observado por Perica e Berljak (1996) em explantes de *Drosera spatulata* Labill.

Com o intuito de verificar a influência tanto do ANA quanto do BAP na organogênese de broto, avaliou-se isoladamente cada uma de suas concentrações no meio de cultura. Desta forma, foi possível observar que a utilização de 1 mg/L de ANA, na ausência de BAP, promoveu o desenvolvimento de broto com maior intensidade e frequência, o que pode ser constatado a partir da análise estatística pois apenas o tratamento referido anteriormente, apresentou

diferença significativa em relação aos demais tabela 3. Resultados similares foram também observados anteriormente por Dunwell (1981) quando cultivou explantes de *B. oleracea* L. em meios de cultura suplementados também com 1 mg/L de ANA. Aparentemente, o BAP não influenciou a proliferação de broto visto que, quando avaliada cada concentração, verificou-se que apenas os explantes cultivados em meios de cultura desprovidos do referido regulador de crescimento apresentaram proliferação de broto em torno da quarta semana de cultivo. Os mesmos resultados foram observados por Jain et al. (1989), quando cultivaram explantes *B. juncea* L. em meios de cultura que continham o BAP (1,0 - 2,0 mg/L) em combinação com ANA (0,1 - 2,0 mg/L) e observaram um bom crescimento de calo, mas a organogênese de broto parecia está sendo inibida. Por outro lado, para a *Annona muricata* L a adição de ANA e BAP foi essencial para o desenvolvimento de brotos (Lemos e Blake, 1996).

**Tabela 3:** Número médio de brotos regenerados a partir de tecidos de couve-comum cultivados *in vitro*, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com distintos níveis de ANA e BAP.

Tratamentos	Número Médio de Brotos
E21	1,0 b
E22	0,3 b
E23	0,3 b
E24	1,0 b
E25	0,0 b
E26	5,3 a
E27	0,0 b
E28	0,3 b
E29	0,0 b
E30	0,0 b
E31	1,3 b
E32	1,0 b
E33	0,0 b
E34	0,0 b
E35	1,3 b
E36	0,0 b
E37	0,0 b
E38	0,0 b
E39	0,0 b
E40	0,0 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

Médias transformadas ( $\sqrt{x+1}$ ).

Para a interação entre ANA e KIN, observou-se que houve maior proliferação de brotos nos tecidos cultivados nos meios suplementados com 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L de ANA, na ausência de KIN. No entanto, quando cultivados na presença de baixas concentrações de KIN, como 0,01 e 0,05 mg/L combinados com 2,0 e 1,0 mg/L de ANA respectivamente, foi possível verificar que houve moderada regeneração de brotos nos tecidos cultivados nestes meios, embora a análise estatística tenha mostrado que não houve diferença

significativa entre os tratamentos Tabela 4. Entretanto, vale apenas salientar que quando os explantes foram submetidos a mais 10 dias de cultivo, não só a intensidade como o frequência de brotação aumentaram tanto na presença de KIN quanto de BAP. Estes brotos na sua maioria apresentavam-se com alterações morfológicas nas folhas ou aspecto vitrificado, provavelmente, pelo tempo prolongado de cultivo.

Dietert et al. (1982), cultivando explantes de brassicas perceberam que quando inicialmente cultivadas em meio MS suplementado com ANA (1,86 mg/L), KIN (4,30 mg/L) e 2,4-D (0,11 mg/L), o calo apresentava melhor desenvolvimento em relação ao meio que continha apenas KIN (0,11 mg/L), 2,4-D (1,11 mg/L) e 10% de leite de côco. No entanto, quando transferidos para o mesmo meio nutritivo desprovido de 2,4-D, ocorreu um considerável aumento na organogênese de raiz e broto, tornando evidente que o 2,4-D inibe a organogênese.

**Tabela 4:** Número médio de brotos regenerados a partir de tecidos de couve-comum cultivados *in vitro*, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo MS, suplementado com distintos níveis de ANA e KIN.

Tratamentos	Número Médio de Brotos
E1	2,3 a
E2	1,0 a
E3	0,0 a
E4	0,0 a
E5	0,0 a
E6	4,7 a
E7	0,0 a
E8	1,7 a
E9	0,0 a
E10	0,0 a
E11	0,3 a
E12	3,0 a
E13	0,0 a
E14	0,3 a
E15	0,0 a
E16	0,0 a
E17	0,0 a
E18	0,0 a
E19	0,0 a
E20	0,0 a

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

Médias transformadas ( $\sqrt{x+1}$ )

No cultivo *in vitro* de *Antirrhinum majus* (boca de leão) Sangwan e Harada (1975), verificaram que quando utilizavam ANA (1,00 mg/L) e KIN (1,00 mg/L) a organogênese de broto era totalmente inibida e ocorria uma intensa formação de raiz. Da mesma forma, foi observado no presente trabalho que, para a couve, a utilização das mesmas concentrações inibia o desenvolvimento de broto. Entretanto, ocorria o início do desenvolvimento de calo, seguido de

intensa proliferação de raiz. Com a redução do nível de KIN para 0,05 mg/L observou-se o desenvolvimento de broto. De forma semelhante ao que foi observado no presente trabalho. Ao mesmo tempo, Horák et al. (1975) demonstrava que a utilização de ANA (2,00 mg/L) e KIN (0,5 mg/L) em explantes de *B. oleracea* L. promovia o desenvolvimento de calo seguido da formação de brotos, o que aumentava significativamente quando transferidos para meio de cultura desprovido de ANA. Neste trabalho, os brotos regenerados foram excisados do calo de origem e cultivados em meio MS desprovido de reguladores de crescimento onde desenvolveram-se normalmente.

#### LITERATURA CITADA

- CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.
- DIETERT, M. F. ; BARRON, S. A.; YODER, O. C. Effects of genotype on *in vitro* culture in the genus brassica. **Plant Science Letters**, Amsterdam. v.26, p.233-240, 1982.
- DUNWELL, J. M. *In vitro* regeneration from excised leaf discs of three *Brassica* species. **Journal of Experimental Botany**, London, v.32, n.129, p.789-799, August, 1981.
- FIGUEIREDO, S. F. L. e ESQUEBEL, M. A. Callogenesis and micropropagation of *Datura innoxiosa* Barb. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.3, n.2, p.63-68, 1991.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A.J. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998, v. 1, p.183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A.M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília:ABCTP/EMBRAPA-CNPQ,1990. 433P.
- HORÁK, J.; LUSTINEC, J. MESICCK, J.; et al. Regeneration of diploid and polyploid plants from the stem pith explants of diploid marrow stem kale (*Brassica oleracea* L.). **Annals of Botany**, London, v.39, p.571-577, 1975.
- JAIN, R. K.; SHARMA, D. R.; CHOWDHURY, J. B. High frequency regeneration and heritable somaclonal variation in *Brassica juncea*. **Euphytica**, Dordrecht, v.40, p.75-81, 1989.
- JONHSON, B.B.; MITCHELL JR, E. D. *In vitro* propagation of broccoli from stem, leaf and rib explants. **Horticultural Science**, Alexandria, v.13, n.3, p. 246-247, 1978.
- KARTHA, K.K.; GAMBORG, O.L. e CONSTABEL, F. "in vitro" plant formation from stem explants of rape (*Brassica napus* cv. *Zephyr*). **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.31, p.217-220, 1974.
- KELLER, W. A. ; ARMSTRONG, K. C. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anthera cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.55, p.1383-1388, 1977.
- LEMONS, E. E. and BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.3, p.395-403, 1996.
- LUSTINEC, J. ; HORÁK, J. Induced regeneration of plants in tissue cultures of *Brassica oleracea*. **Experientia**, Basel, v.26, n.8, p. 919-920, 1970.
- MOLINAR Jr, F.; MACKAY, W. A.; WALL, M. M.; CARDENAS, M. Micropropagation of *Agarita* (*Berberis trifoliata* Moric.). **Horticultural Science**, v. 31, n. 6, p. 1030-1032, 1996.
- MARGARA, J. Etudes des facteurs de la formation de bourgeons en culture *in vitro* chez le chou-fleur. (*Brassica oleracea* L. var *Botrytis*) ssn. **Physiol. Veg.**, v.11, p.95-112, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p.473-497, 1962.
- PERICA, M. C. ; BERLJAK, J. *In vitro* growth and regeneration of *Drosera spatulata* Labill. on various media. **Horticultural Science**, v. 31, n. 6, p. 1033-1034, 1996.
- SANGWAN, R. S. ; HARADA, H. Chemical regulation of callus growth, organogenesis, plant regeneration, and somatic embryogenesis in *Antirrhinum majus* tissue and cell culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.26, n.95, p.868-881, december 1975.