

PC - DP

COMUNICAÇÃO

EFEITO DE ALGUNS ANTIOXIDANTES NO CULTIVO “*in vitro*” DE SEGMENTOS NODAIS DE CARÁ-DA-COSTA (*Dioscorea cayenensis* Lam.).

NATONIEL FRANKLIN DE MELO¹

JOSÉ BARBOSA CABRAL²

GERALDO MILANEZ DE RESENDE³

ARNÓBIO GONÇALVES DE ANDRANDE⁴

RESUMO - A oxidação de compostos fenólicos é um dos principais problemas do cultivo de tecidos vegetais. No presente trabalho foram testados quatro tipos de substâncias antioxidantes no cultivo “*in vitro*” de segmentos nodais de cará-da-costa (*D. cayenensis* Lam.), objetivando estudar seus efeitos no controle de oxidação dos explantes e meio de cultura. Utilizou-se o meio MS com pequenas modificações, suplementado com ácido ascórbico, cisteína ou polivinilpirrolidone (PVP) nas concentrações de 50, 100 e 150

mg/l, ou ainda carvão ativo nas concentrações de 1 g/l e 2 g/l, além do meio controle basal sem antioxidantes. Com a análise dos resultados, o maior número médio de brotações foi obtido no tratamento com 100 mg/l de PVP, enquanto o ácido ascórbico na concentração de 150 mg/l mostrou-se mais eficaz no controle do escurecimento do meio nutritivo. Os tratamentos com cisteína, ácido ascórbico e carvão ativo, respectivamente, tiveram ordem decrescente em relação ao número médio de brotações.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Cará-da-costa, *Dioscorea cayenensis*, cultura de tecidos, antioxidantes.

EFFECT OF SOME ANTIOXIDANTS ON “*in vitro*” CULTIVATION OF NODAL SEGMENTS OF YAM (*Dioscorea cayenensis* Lam.).

ABSTRACT - One of the main problems in plant tissue culture is the oxidation of phenol compounds. In this work, four types of antioxidant compounds were tested on the “*in vitro*” cultivation of “cará-da-costa” yam (*D. cayenensis* Lam.) nodal segments with the objective to study their effects on the control of explant and culture medium oxidation. MS medium with few modifications, supplemented with and without (control)

ascorbic acid, cystein or polivinilpirrolidone (PVP) (50, 100 and 150 mg/l), and activated charcoal (1 g/l and 2 g/l), was used. According to our observation, while higher shoot average number was obtained using 100 mg/l PVP, the use of 150 mg/l ascorbic acid was more efficient in the control of medium darkening. The treatments with cystein, ascorbic acid and activated charcoal showed decreased shoot average number.

INDEX TERMS: Yam, *Dioscorea cayenensis*, tissue culture, antioxidants.

A oxidação de compostos fenólicos durante o cultivo “*in vitro*” de tecidos vegetais tem sido um dos principais problemas observados durante a propagação de diversas espécies de interesse econômico, como por exemplo a cana-de-açúcar e as dioscoreáceas (Ammirato, 1984; Lee, 1986). Após o corte do teci-

do, as células lesadas liberam substâncias que causam o escurecimento do explante e do meio de cultura. Esse escurecimento é feito da oxidação de compostos fenólicos, os quais podem ser tóxicos devido principalmente a trocas de ligações químicas a nível protéico. Nas espécies lenhosas esse problema ainda

1. Biólogo, M.Sc., Pesquisador da Área de Biotecnologia da Embrapa Semi-Árido. C. P. 23, CEP 56300-000, Petrolina-PE. E-mail: natoniel@cpatsa.embrapa.br
2. Biólogo, M.Sc., Pesquisador do IPA, Recife-PE.
3. Eng. Agrônomo, M.Sc. Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, Petrolina-PE.
4. Eng. Agrônomo, Ph.D., Professor Adjunto IV, UFRPE, Recife-PE.

é mais sério, porque os tecidos são ricos em compostos fenólicos, os quais são precursores da síntese de lignina (Durzan, 1987; Welander, 1988).

Algumas substâncias antioxidantes são empregadas como alternativa para minimizar o efeito da oxidação. A utilização dessas substâncias pode ser feita após a esterilização superficial na forma de uma última lavagem mais demorada, ou fazendo o trabalho de isolamento de explantes dentro de uma placa de Petri contendo alguma solução antioxidante. Essa última medida pode até mesmo ser efetiva só com a água, pois evita-se o contato das superfícies cortadas do explante com o oxigênio do ar (Bonga, 1985).

Substâncias antioxidantes também podem ser adicionadas ao meio. Gupta (1986), comparando o ácido cítrico, ácido ascórbico (vitamina-C) e carvão ativo, verificou que o ácido ascórbico no meio de cultura preveniu a oxidação fenólica em meristemas isolados de bananeira. Grewal, Ahuja e Atal (1980) utilizaram ácido ascórbico no meio de cultura de isolamento de meristemas de *Eucalyptus citriodora* Hook. diminuindo a produção de exudado na concentração de 50 mg/l e evitando totalmente o exudado a 100 mg/l. Greemers-Molenaar e Van Oort (1990), estudando a influência de alguns antioxidantes no crescimento de microcalos a partir de protoplastos de *Lolium perene* L., demonstraram que a vitamina-C servia como um importante antioxidante. Esses autores notaram que a adição de 1 a 10 mM (equivalentemente 176,1 a 1.761 mg/l) de vitamina-C aumentava a produção de protoplastos de 2 a 5 vezes. Walkey (1972) incorporou polivinilpirrolidone (PVP) ao meio de cultivo de macieira e verificou ser esta substância essencial para um bom desenvolvimento inicial do explante, embora pudesse ser eliminada após 4 a 8 semanas.

O presente trabalho procurou estudar o efeito do ácido ascórbico, da cisteína, do polivinilpirrolidone e do carvão ativo em relação ao controle da oxidação durante o cultivo "in vitro" de segmentos nodais do cará-da-costa (*D. cayenensis*).

Os experimentos foram realizados a partir de túberas-semente de *D. cayenensis* da variedade da Costa provenientes da Estação Experimental de Itapirema do IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária). As túberas foram tratadas com uma solução a 0,5% do fungicida Benomyl (nome comercial: Benlate), e colocadas em local sombreado e seco até quebra da dormência. A brotação das túberas ocorreu após um período de 3 meses, efetuando-se, em seguida, o plantio do material em vasos de barro com capacidade para 10 litros de substrato. O substrato utilizado consistiu de

40% de areia fina, 25% de vermiculita, 25% de húmus e 10% de cinza de casca de arroz.

O controle fitossanitário foi realizado semanalmente com aplicações do inseticida-acaricida sistêmico Nuvacron [fosfato de cis(2-metil-carbamoil-1-metilvinil) dimetila] a 0,01%, e do fungicida-acaricida Dithane (etilenobisditiocarbamato de manganês e íon zinco) a 0,05%, associados ao espalhante adesivo Extravon (alquil-fenolpoliglicoleter) a 0,01%. A condução do experimento foi feita em telado com malha anti-pulgão.

A coleta dos explantes foi feita a partir de plantas com idade de 4 meses após a brotação das túberas-semente. Segmentos nodais foram selecionados e seccionados, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo imediatamente mergulhados em recipientes contendo água destilada.

A seguir, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foi feita a desinfestação dos explantes em álcool a 70% (v/v), por 1 minuto, e em hipoclorito de sódio entre 1% e 2% durante 20 minutos. O hipoclorito de sódio foi obtido a partir das formulações comerciais de água sanitária, utilizando-se uma solução a 40% (v/v) para chegar-se à concentração desejada. Posteriormente, os explantes foram lavados 3 vezes em água deionizada e autoclavada para, em seguida, efetuar-se a inoculação nos meios de cultura.

A incubação do material foi feita em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, luminosidade aproximada de 2.000 lux e temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$.

Na preparação dos meios de cultura, utilizou-se a formulação de Murashige e Skoog (1962), com 20 g/l de sacarose, sendo a concentração de vitamina B1 (tiamina) aumentada de 0,1 mg/l para 0,5 mg/l. Tais alterações foram baseadas nos trabalhos de Mascarenhas et al. (1976) e Viana e Mantell (1989). Para multiplicação foram adicionados 2,0 mg/l de cinetina ao meio, conforme Melo (1994).

Foram testados o ácido ascórbico, a cisteína e o PVP nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/l, e o carvão ativo nas concentrações de 1,0 e 2,0 g/l, na tentativa de diminuir a oxidação dos compostos fenólicos liberados pelas partes danificadas dos explantes. Realizou-se também um tratamento controle sem adição de antioxidantes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado consistindo de 12 tratamentos com 10 repetições.

A avaliação da oxidação produzida pelos explantes na cultura de segmentos nodais foi feita 30 dias após a inoculação. A análise da oxidação foi realizada de maneira visual, observando-se o grau de escureci-

mento do meio e escolhendo-se, dentre os antioxidantes utilizados, o que produziu melhor resposta. Além disso, observou-se o número médio de brotações surgidas em cada concentração de antioxidante utilizada, a fim de verificar a eficiência dos mesmos na multiplicação do material.

A distribuição dos meios foi feita em tubos de ensaio medindo 3 cm de diâmetro por 12 cm de altura. As alíquotas de meio distribuídas foram de 10 ml. O fechamento foi feito com papel alumínio e a esterilização em autoclave à temperatura de 121° C e pressão de 1 Kg/cm², por 20 minutos.

A Tabela 1 traz os resultados obtidos em relação aos antioxidantes cisteína, ácido ascórbico e PVP. No caso do carvão ativo não foi possível fazer uma avaliação do grau de escurecimento do meio, devido a este composto, por si, dar uma tonalidade escura ao ser adicionado no meio nutritivo. Entretanto, pode-se observar que os explantes estavam pouco oxidados e sem necrose evidente.

Observa-se que o maior número médio de brotações ocorreu no tratamento contendo 100 mg/l de PVP, e o menor, no tratamento contendo 2 g/l de carvão ativo. De maneira geral, o tratamento contendo PVP foi

superior aos outros quanto ao número de brotações, seguido dos tratamentos com cisteína, ácido ascórbico e carvão ativo, respectivamente.

Por outro lado, quanto ao grau de escurecimento do meio, verificou-se uma melhor resposta no tratamento contendo 150 mg/l de ácido ascórbico (oxidação restrita). Oxidação intensa foi observada em todos os níveis de cisteína empregados e no nível 50 mg/l de PVP. Os demais tratamentos apresentaram uma oxidação intermediária relativa ao grau de escurecimento do meio. O número médio de brotações obtidas nos meios contendo os antioxidantes testados, variou entre 1,5, no caso do carvão ativo (2 g/l) até 3,3 para o PVP (100 mg/l).

No tratamento controle, sem antioxidantes, formaram-se 1,8 brotações em média por explante, apresentando intensa oxidação tanto do meio como dos explantes. Verificou-se haver uma maior eficiência no controle do escurecimento do meio pelo ácido ascórbico na concentração de 150 mg/l. Entretanto, foi observado, neste caso, um menor número médio de brotações produzidas quando comparado com os tratamentos contendo os antioxidantes cisteína e PVP. Este último, por sua vez, apesar de ter mantido o meio mais escuro, apresentou uma melhor resposta na produção de brotações. O

Tabela 1 - Grau de escurecimento do meio e número médio de brotações produzidas 30 dias após inoculação, em função dos tratamentos com os antioxidantes ácido ascórbico, cisteína, polivinilpirrolidone e carvão ativo, em mg/l, durante o cultivo "in vitro" de segmentos nodais de cará-da-costa (*D. cayenensis*).

Antioxidante	Concentração	Grau de Escurecimento*	Número Médio de Brotações
Ác. Ascórbico	50	++	2,1 bcde
	100	++	2,0 bcde
	150	+	2,1 bcde
Cisteína	50	+++	2,5 abcde
	100	+++	2,6 abcd
	150	+++	2,5 abcde
PVP	50	+++	3,0 abc
	100	++	3,3 a
	150	++	3,1 ab
Carvão Ativo	1.000	-	1,8 de
	2.000	-	1,5 e
Controle	0	+++	1,8 de

(*) +++ = oxidação intensa, ++ = oxidação intermediária, + = pouca oxidação, - = não observado.

obs.: médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

PVP utilizado como antioxidante em cultura de tecidos, apesar de eficiente, nem sempre evita o escurecimento do meio de cultura pela presença de compostos fenólicos (George e Sherrington, 1984). Vale salientar que a presença de agentes redutores no meio de cultura abaixa o potencial de redox da solução, prevenindo assim o escurecimento do explante e evitando a oxidação de polifenóis. No caso do cará-da-costa, a utilização de carvão ativo resultou em uma queda no número de brotações observadas (1,5 - 1,8 brotações por explante). Este agente parece adsorver as substâncias presentes no meio de cultura, diminuindo os efeitos multiplicativos (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Nas condições em que foi realizado o experimento, conclui-se que o PVP na concentração de 100 mg/l, por controlar a oxidação, promove um maior número de brotações na cultura de segmentos nodais de cará-da-costa. O ácido ascórbico na concentração de 150 mg/l e o carvão ativo, apesar de efetivos no controle da oxidação dos explantes, ocasionam um efeito secundário no desenvolvimento da cultura, resultando em um baixo número médio de brotos formados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P.V. Yams. In: SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; YAMADA, Y. (eds.) **Handbook of plant cell culture: crop species**. New York: Macmillan. 1984. v.3, Cap.12, p. 327-355.
- BONGA, J.M. Tissue culture techniques. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Tissue culture in forestry**. 2 ed. Dordrecht: M. Nijhoff, 1985. p.4 - 34. (Forestry Sciences).
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq/ABCTP. 1990, p. 37-70.
- DURZAN, D.J. Plant growth regulators in cell and tissue culture of woody perennials. **Plant Growth Regulation**, Hague, v.6, p. 95-111. 1987.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Basingstone: Exegetics, 1984. 709p.
- GREEMERS-MOLENAAR, J.; VAN OORT, Y. Antioxidants influence the plating efficiency and microcallus growth of protoplasts in *Lolium perene* L. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H. W.; VAN AARTRIJK, J. (eds.). **Progress in plant cellular and molecular biology**. London: Kluwer Academic, 1990. p. 44-49.
- GREWAL, S.; AHUJA, A.; ATAL, C.K. "In vitro" proliferation of shoots apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.18, n. 7, p. 775-777, 1980.
- GUPTA, P.P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v.6, p. 33-39, 1986.
- LEE, T.S.G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Turrialba**, San Jose, v. 36, n. 2, p.231-236, 1986.
- MASCARENHAS, A.F.; HENDRE, R.R.; NADGIR, A.L.; GHUGALE, D.D.; GODBOLE, D.A.; PRABHU, R. A.; JAGANNA THAN, V. Development of plantlets from cultured tissues of *Dioscorea deltoidea* Wall. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 14, p. 604-606, 1976.
- MELO, N.F. Cultivo "in vitro" de cará-da-costa (*Dioscorea cayenensis* Lam.) - aspectos e condições adequadas. Recife: UFRPE, 1994. 85p. (Dissertação - Mestrado em Botânica).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- VIANA, A.M.; MANTELL, S.H. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl. and *D. cayenensis* Lam. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hangue, v. 16, p. 113-122, 1989.
- WALKEY, D.G. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 52, p. 1085-1087, 1972.
- WELANDER, M. Biochemical and anatomical studies of birch (*Betula pendula* Roth) buds exposed to different climatic conditions in relation to growth "in vitro". In: HANOVER, J.W.; KEATHTEY, D.E. (eds.). **Genetic manipulation of wood plants**. New York: Plenum Press, 1988. 205p. (Basic Life Sciences, 44).