

INDUÇÃO DE CALOS EM ERVA-DE-TOURO (*Tridax procumbens* L.) UTILIZANDO DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO E TIPOS DE EXPLANTES¹

ESTER SOLANGE CERQUEIRA²
JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO³
AUGUSTO RAMALHO DE MORAIS⁴
NILMAR EDUARDO ARBEX DE CASTRO⁵
MARIA DAS GRAÇAS CARDOSO³
OSMAR ALVES LAMEIRA⁶

RESUMO – Os trabalhos foram conduzidos com o intuito de definir o melhor regulador de crescimento e tipo de explante para indução de calos em *Tridax procumbens* L. Foram utilizados segmentos foliares e caulinares cultivados *in vivo* e *in vitro*. As folhas e caules oriundos de plantas-matrizes cultivadas em casa-de-vegetação foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em hipoclorito de sódio comercial a 30%, sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas por cinco vezes em água destilada e, autoclavada e, então, excisadas e inoculadas em meio de cultura em câmara de fluxo laminar. Os segmentos foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) com 3% de sacarose, 0,6% de agar e pH 5,7 suplementado com 1,0; 2,0 e 4,0mg/L de 2,4-D; AIB ou ANA acrescidos de 2,0mg/L de BAP, na presença de luz. Segmentos foliares foram mais eficientes que segmentos caulinares para a formação de calos, e o regulador de crescimento ANA na concentração de 2,0mg/L proporcionou melhor indução de calos, com maiores pesos de matéria seca e fresca.

TERMS FOR INDEXATION: *Tridax procumbens* L., planta medicinal, cultura de tecidos, calogênese.

INDUCTION OF CALLUS IN HERB-OF-BULL (*Tridax procumbens* L.) USING DIFFERENT GROWTH REGULATOR AND TYPES OF EXPLANTS

ABSTRACT – The work was conducted with the purpose of defining the best growth regulator and source of explant for callus induction in *Tridax procumbens* L. Leaf segments and stem nodal segments grown both *in vitro* and *in vivo*, were used as explants. The leaves from donor plants grown in greenhouse were disinfested in 70% alcohol for 30 seconds and immersed in 30% commercial sodium hypochloride under stirring for 10 minutes. Afterwards, the explants were washed

five times in distilled and autoclaved water under sterile conditions, excised and inoculated in MS culture medium. Explants were cultured in Murashige & Skoog (MS) medium with 3% of sucrose, 0.6% agar and pH 5.7 supplemented with 1.0; 2.0 and 4.0mg/L of 2,4-D; IBA or NAA interacted with BAP 2,0mg/L in the presence of light. Leaf segment was more efficient for inducing calluses in the presence of BAP 2,0mg/L + NAA 2,0mg/L.

INDEX TERMS: *Tridax procumbens* L., medicinal plants, tissue culture, calluses.

1. Parte da dissertação apresentada à UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS/UFLA, Caixa Postal 37 – 37200.000 – Lavras, MG, pelo primeiro autor, para obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal.
2. Bióloga, M.Sc., Caixa Postal 57, 37200.000 – Lavras, MG.
3. Professor do Departamento de Agricultura/UFLA.
4. Professor do Departamento de Ciências Exatas/UFLA.
5. Engenheiro Agrônomo, Caixa Postal 37, 37200.000 – Lavras, MG.

6. Pesquisador da EMBRAPA/Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, 66095.100 – Belém, PA.

INTRODUÇÃO

Tridax procumbens é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae e conhecida popularmente como erva-de-touro ou margaridinha. Em extratos da espécie analisados fitoquimicamente, foi descrita a ocorrência de várias substâncias que lhe conferem atividades medicinais.

Verma & Gupta (1988) descreveram o uso de *Tridax procumbens* L. no tratamento de disenteria, diarreia, e secreções brônquicas, além de atribuir propriedade antisséptica, inseticida, antiemorrágica e cicatrizante.

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de metabólitos secundários com o crescimento celular.

O metabolismo secundário manifesta-se em células e tecidos específicos em determinados estágios de crescimento de plantas superiores e a expressão desse metabolismo está intimamente correlacionada com o crescimento e a diferenciação morfológica de células.

Vários fatores interferem na calogênese, tais com o tamanho do explante, composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, órgão fornecedor do explante, idade e época do ano em que o explante é colhido e genótipo da planta doadora.

Várias espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores de crescimento (Lameira *et al.*, 1994; Becker, 1997; Abreu, 1998; Lameira, 1997; Kajiki, 1996). Geralmente, concentrações semelhantes de auxina e de citocinina no meio promovem a formação de calos, mas isso varia em função do balanço hormonal de cada espécie. Tisserat (1985) mostrou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, mas a adição de citocinina pode aumentar a proliferação do mesmo. Porém, o uso da 2,4-D tornou-se limitada na propagação, por causa da possibilidade de induzir mutações, ao mesmo tempo que pode inibir a fotossíntese, o que não foi descrito em outras auxinas, como a ANA, AIB e AIA (Pierik, 1989).

Espécies da família Asteraceae têm sido induzidas à formação de calos com ajuda de reguladores de crescimento. Duskova & Dusek (1995), utilizando raízes e parte aérea de *Leuzea carthamoides* DC. (Asteraceae), observaram que os calos de parte aérea desenvolveram-se melhor com 0,5mg/L de AIB, obtendo-se 544% de aumento no peso da matéria fresca após quatro semanas. A cultura de calos obtida das raízes cresceram bem me-

nos, e o melhor resultado obtido foi com 1mg/L de 2,4-D e 1mg/L de BAP, com 230% no aumento do peso fresco.

Paniego & Giulietti (1994), trabalhando com a espécie *Artemisia annua* L. (Asteraceae) em meio MS, obtiveram uma melhor indução de calos com 4,5µM de 2,4-D ou 5,4µM de ANA. O uso de 2,0mg/L de 2,4-D e 2,0mg/L de BAP apresentou-se como significativo na produção de calos derivados de hipocótilos de *Cassia acutifolia* Del. (Fabaceae-Caesalponioideae) nos trabalhos de Rady & Nazif (1997).

Uma grande quantidade de calos foi obtida através de sementes de *Pinellia pedatisecta* Schott. (Araceae) cultivadas em meio B5 e MS suplementados com 0,5 a 6,0mg/L de 2,4-D e 0,5mg/L de BA. Os calos cresceram rapidamente e tiveram consistência friável. Por outro lado, o meio MS suplementado com 0,1 a 4,0mg/L de ANA e 0,5mg/L de BA influenciou na frequência de diferenciação, tendo havido aumento de calos com a diminuição da concentração de ANA, segundo Baocheng *et al.* (1995).

A indução da formação de calos foi alcançada em *Rauwolfia caffra* Sond. (Apocynaceae) a partir de folhas em meio MS usando diferentes concentrações de ANA (0,5 a 2,0mg/L) em combinação com BAP (0,5 a 2,0mg/L) em estudos realizados por Upadhyay *et al.* (1992). A melhor resposta foi obtida usando-se concentrações de 2,0mg/L de ANA e BAP. Os calos possuíam aspecto compacto e ligeiramente amarelo.

Calos podem ser multiplicados por sucessivas subculturas, mantidos *in vitro* por longos períodos e são de grande importância para estudos morfogenéticos *in vitro* e através da suspensão de células para a obtenção de produtos secundários, incluindo fármacos, representando uma biotecnologia de grande interesse científico e comercial.

Com este trabalho objetivou-se avaliar influência de reguladores de crescimento na formação de calos para *Tridax procumbens*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, MG.

Foram utilizados segmentos foliares e caulinares cultivados *in vivo* e *in vitro*. As folhas e caules oriundos de plantas-matrizes cultivadas em casa-de-vegetação foram desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em hipoclorito de sódio comercial a

30%, sob agitação por 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas por cinco vezes em água destilada e autoclavada, e, então, excisadas e plaqueadas em meio de cultura em câmara de fluxo laminar.

Segmentos de foliares de aproximadamente 1cm², bem como segmentos internodais com 0,8cm de comprimento, foram excisados de plântulas estabelecidas *in vitro* com auxílio de pinça e bisturi em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram cultivados em tubos de ensaio de vidro (25 x 150 mm) contendo 15mL de meio de cultura MS, com 0,6% de ágar e 3% de sacarose. Os tratamentos avaliados foram formados pelas combinações de: três reguladores de crescimento (2,4-D; ANA ou AIB), três concentrações (1,0; 2,0 e 4,0 mg/L) de reguladores e dois tipos de explantes (segmentos foliares e caulinares). Em todas as combinações dos tratamentos, foram acrescidas 2,0 mg/L de BAP. O pH dos meios foi ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Os tubos de ensaio foram vedados com tampa plástica e selados com parafilme.

Após a inoculação, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 26°C±1 na presença de luz, sendo o fotoperíodo de 16 horas de luz sob 25 µmol.m⁻².s⁻¹ de irradiância.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, com cada parcela composta por quatro tubos, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial 3x3x2 (três reguladores, três concentrações e dois tipos de explantes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e, quando houve efeito significativo de reguladores, esses foram comparados pelo teste de Tukey (5%); para concentrações, foi usada análise de regressão, e para tipos de explantes, o teste F.

Aos 30 dias após a instalação do experimento, avaliaram-se a porcentagem de área coberta com calos, coloração e o peso da matéria fresca e seca dos calos formados. A área dos explantes coberta com calos foi estimada por três avaliadores e os explantes foram classificados como tendo 25; 50; 75 ou 100% da área coberta com calos. A coloração dos calos foi classificada em verde claro, verde-escuro, amarelo ou marrom.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve formação de calos quando segmentos foliares e caulinares foram inoculados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento do grupo au-

xina (2,4-D, AIB e ANA) e em presença de BAP, não havendo formação de calos na ausência de reguladores de crescimento (S/RC). O melhor tratamento para a indução de calos nos segmentos foliares foi quando se adicionaram 2,0mg/L de ANA+2,0mg/L de BAP, resultando em 100% de área coberta com calos (Figura 1). Segmentos foliares cultivados em meios com concentrações de 1,0mg/L de ANA, AIB ou 2,4-D; 2,0mg/L de 2,4-D ou AIB e 4,0mg/L de AIB ou ANA, apresentaram apenas 25% de área coberta com calos. A concentração de 4,0mg/L de 2,4-D não promoveu o desenvolvimento de calos nos segmentos foliares.

O melhor resultado para segmentos caulinares foi obtido com 1,0 mg/L de ANA + 2,0mg/L de BAP, o qual proporcionou 75% de área coberta do explante com calos, seguido por 2,0mg/L de AIB e 4,0mg/L de ANA com 50%. As concentrações 1,0 e 2,0mg/L de 2,4-D, 2,0mg/L de ANA e 4,0mg/L de AIB obtiveram apenas 25% de área coberta. Não ocorreu formação de calos com 1,0mg/L de AIB e 4,0mg/L de 2,4-D (Figuras 1 e 2).

O melhor resultado para o peso da matéria fresca dos calos formados em segmentos foliares foi obtido com ANA na concentração de 2,0mg/L + 2,0mg/L de BAP (Tabela 1 e Figura3). Nos reguladores AIB e 2,4-D, houve uma tendência de decréscimo na matéria fresca dos calos com o incremento das concentrações. Naseem & Jha (1994), trabalhando no estabelecimento de calos com segmentos foliares de *Cleome viscosa* L. (Capparidaceae), também encontraram que 2,0mg/L de ANA e 2,0mg/L BAP proporcionaram maior indução de calos nessa espécie medicinal. O 2,4-D normalmente é um regulador de crescimento mais empregado para indução de calos. Nessa espécie, o 2,4-D, nas concentrações usadas, mostrou-se menos eficiente na indução de biomassa fresca em explantes foliares e caulinares (Tabela 1, Figura 3 e 4).

O peso da matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos caulinares foi maior com a concentração de 2,0mg/L de AIB + 2,0mg/L de BAP (Tabela 1). A indução de calos não só dependeu do regulador de crescimento, mas da interação entre o explante e o regulador de crescimento. Com essa espécie, o melhor ganho de biomassa fresca com segmento foliar foi obtido com o ANA, e no segmento caulinar foi obtido com AIB (Figuras 3 e 4), com valores máximos estimados de 1,48g, na concentração de 2,27mg/L de ANA, e de 0,62g, na concentração de 2,05mg/L de AIB.

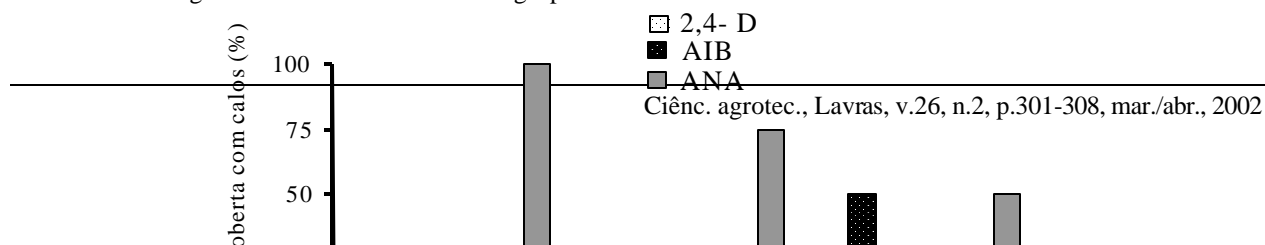


FIGURA 1 – Porcentagem da área coberta com calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos de BAP (2mg/L).

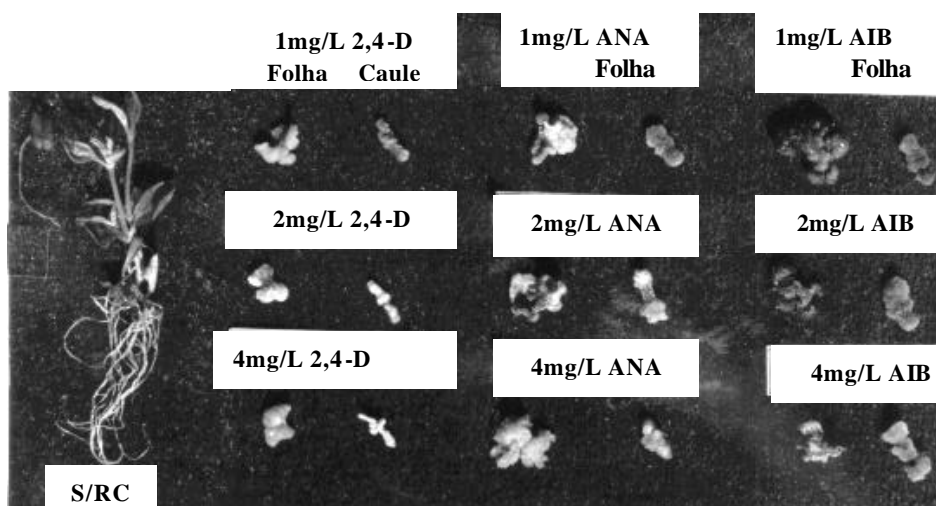


FIGURA 2 – Segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* avaliados aos 30 dias, em diferentes concentrações de 2,4-D, ANA ou AIB, interagindo de 2mg/L de BAP e sem regulador de crescimento (S/RC).

TABELA 1 – Valores médios de peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos de BAP.

Explante	Regulador de cimento	Cres-	Concentração (Mg/L)			Média
			1,0	2,0	4,0	
Folha	2,4-D		0,468 c	0,215 c	0,211 c	0,298 c
	AIB		1,098 a	0,865 b	0,804 b	0,922 b
	ANA		0,707 b	1,431 a	1,110 a	1,083 a
Caulo	2,4D		0,199 b	0,103 b	0,211 a	0,171 b
	AIB		0,287 ab	0,613 a	0,335 a	0,412 a
	ANA		0,407 a	0,185 b	0,345 a	0,312 a

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas, em cada explante, diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

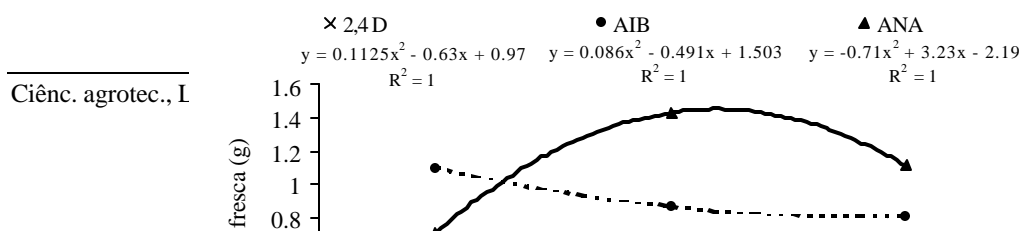


FIGURA 3 – Peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens* em função das concentrações dos reguladores 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos com BAP.

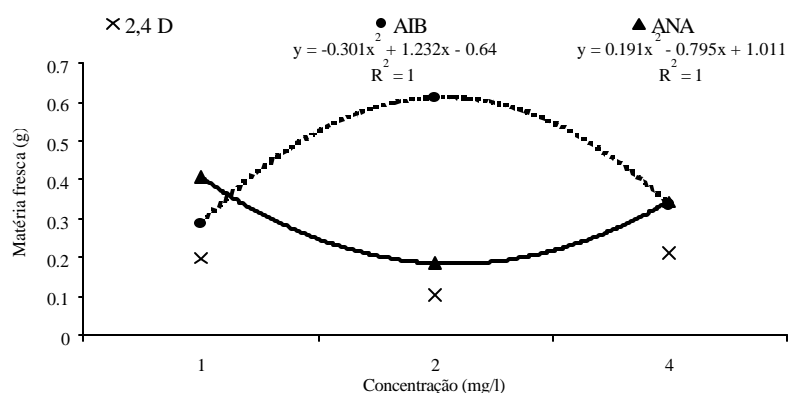


FIGURA 4 – Peso de matéria fresca dos calos formados a partir de segmentos caulinares de *Tridax procumbens* em função das concentrações dos reguladores 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos com BAP.

Calos formados a partir de segmentos foliares produziram maiores pesos de matéria fresca e seca que calos originados de segmentos de caule (Tabelas 1 e 2). Os maiores pesos de matéria seca de calos formados em segmentos foliares foram obtidos com 1,0mg/L de AIB e também por 2,0mg/L de ANA e de AIB (Tabela 2 e Figura 5). Em segmentos caulinares, o maior peso foi obtido com 2,0mg/L de AIB (Tabela 2, Figura 6).

A maioria dos tratamentos formou calos friáveis, excetuando-se o tratamento com AIB, que formou calos de consistência um pouco compacta. Notou-se também que à medida que foi aumentada a concentração de 2,4-D, alguns calos mostraram início de necrose, sugerindo toxidez.

A coloração e a consistência de calos dependeu tanto da concentração como do tipo de regulador de crescimento usado no meio de cultura. O tipo de regulador de crescimento também influencia na concentração dos metabólitos secundários (Subroto & Doran, 1994).

Calos formados a partir de segmentos foliares ou caulinares produziram coloração semelhante. Em presença de AIB, os calos apresentaram coloração amarelada, e coloração verde-escura em presença de ANA. Naseem & Jha (1994), trabalhando com *Cleome viscosa* L., usando ANA e BAP na concentração (2mg/L), observaram calos de coloração verde-escura. O uso do 2,4-D resultou na produção de calos de cor verde-escura em segmentos caulinares, e de cor amarela, em segmentos foliares (Tabela 3).

TABELA 2 – Valores médios para peso de matéria seca dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos de BAP.

Explante	Regulador Crescimento	Concentração (mg/L)			Média
		1,0	2,0	4,0	
Folha	2,4-D	0,029 c	0,019 b	0,017 c	0,022 b
	AIB	0,088 a	0,070 a	0,059 b	0,072 a
	ANA	0,054 b	0,083 a	0,073 a	0,070 a
Caule	2,4-D	0,024 a	0,019 b	0,017 b	0,020 b
	AIB	0,034 a	0,062 a	0,038 a	0,045 a
	ANA	0,035 a	0,016 b	0,024 b	0,025 b

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas, em cada explante, diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

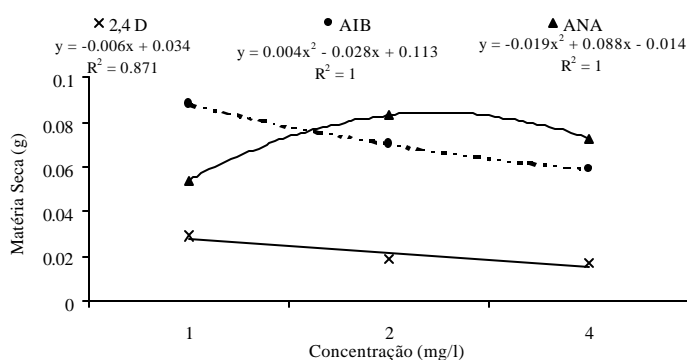


FIGURA 5 – Peso da matéria seca dos calos formados a partir de segmentos foliares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos com BAP.

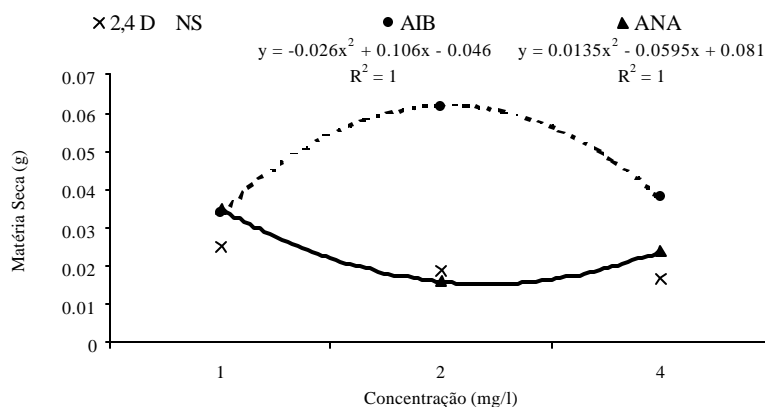


FIGURA 6 – Peso da matéria seca dos calos formados a partir de segmentos caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos com BAP.

TABELA 3 – Cores dos calos formados a partir de segmentos foliares e caulinares de *Tridax procumbens* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D, AIB ou ANA acrescidos de BAP.

Explante	Regulador de	Concentração (mg/L)
----------	--------------	---------------------

	cimento	1,0	2,0	4,0
Caule	2,4-D	Verde escuro	Verde escuro	Verde escuro
	AIB	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	ANA	Amarelo	Verde escuro	Verde escuro
Folha	2,4-D	Verde escuro	Amarelo	Amarelo
	AIB	Amarelo	Amarelo	Verde escuro
	ANA	Verde escuro	Verde escuro	Verde escuro

CONCLUSÕES

a) Para a obtenção de calos em *Tridax Procumbens*, faz-se necessário o uso de reguladores de crescimento;

b) Segmento foliar apresentou melhor formação de calos que segmento caulinar, sendo considerado um explante satisfatório para a indução de calos em *Tridax Procumbens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I.N. de. **Propagação in vivo e in vitro, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides***. 1998. 113f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BAOCHENG, Z.; AIMIN, W.; YALI, C. *et al.* Studies on tissue culture of *Pinellia pedatisecta* schott and analysis of its medicinal composition. **Acta Agronomica Sinica**, Beijing, China, v.21, n.4, p.475-478, Febr. 1995.

BECKER, L. **Propagação vegetativa in vivo e in vitro, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras)**. 1997. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DUSKOVA, J.; DUSEK, J. *Leuzea carthamoides* DC. *in vitro*. **Herba Polonica**, Poland, v.41, n.4, p.165-169, May 1995.

KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Es-

cola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LAMEIRA, O.A. **Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. 1997. 87f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, Set./Dez. 1994.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review Plant Physiology**, Washington, v.25, n.30, p.135-166, Dez.1974.

NASEEM, M.; JHA, K.K. Differentiation and regeneration in *Cleome viscosa* leaves cultured *in vitro*. **Egyptian Journal of Botany**, Cairo, v.34, n.1, p.37-47, Set. 1994.

PANIEGO, N.P.; GIULETTI, A.M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.36, n.2, p.163-168, Feb. 1994.

PIERIK, R.L.M. **Vegetative propagation**. In: _____. *In vitro culture of higher plants*. Boston: M. Nijhoff, 1989. p.202-220.

RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. **Fitoterapia**, Roma, v.68, n.4, p.349-354, Feb.1997.

SUBROTO, M.A.; DORAN, P.M. Production of steroid alkaloid by hairy roots of *Solanum aviculare* and the ef-

fect of gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.38,n.2, p.93-102, Aug. 1994.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis na plant regeneration. In: DIXON, R. A. (ed.) **Plant cell culture, a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.

UPADHYAY, N.; MAKOVEYCHUK, A.Y.; NIKOLAEVA, L.A. *et al.* Organogenesis and somatic

embryogenesis in leaf callus culture of *Rauwolfia caffra* Sond. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.140, n.2, p.218-222, Aug.1992.

VERMA, R.K.; GUPTA, M.M. Lipid constituents of *Tri-dax procumbens*. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n.2, p.459-463, Feb. 1988.