



Organogênese Direta em Folhas de *Annona glabra*, *Annona squamosa* e *Annona bahiensis*

Renato Paiva¹; José Raniere Ferreira de Santana²; Eurico Eduardo Pinto de Lemos³ ;
Ednabel Caracas Lima¹, Edson José Artiaga de Santiago⁴; Mauro Batista dos Santos¹

Introdução

Atualmente, o extrativismo representa a única forma de exploração de muitas fruteiras nativas. Esse extrativismo tem levado a uma forte pressão de extermínio da vegetação nativa e dentre estas, as *Annonaceae* frutíferas.

O emprego das técnicas de cultura de tecido, especialmente no processo da propagação vegetativa *in vitro* (micropropagação), tem sido amplamente utilizado, principalmente quando a propagação generativa é insatisfatória, quando a progênie obtida é muito heterogênea (devido a uma forte heretorigose) ou em casos em que a propagação por sementes não ocorre naturalmente. Por outro lado, é muito importante ressaltar sua grande utilidade em programas de conservação e /ou melhoramento, dada a economia de tempo na multiplicação de variedades, assim como na produção de clones promissores e livres de patógenos.

A literatura traz várias pesquisas onde meristemas, gemas ou segmentos nodais foram usados na propagação de fruteiras (Jordan, 1988). Organogênese ou embriogênese tem sido induzida diretamente de muitas espécies herbáceas. Entretanto, pesquisas sobre a regeneração de brotações de folhas em espécies lenhosas, em especial as *Annonaceae*, ainda são raras (Nair et al. 1984a; Rasai et al. 1994).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de regeneração em folhas das espécies *Annona squamosa*, *Annona glabra*, e *Annona bahiensis*, expressos sob as condições *in vitro*.

Material e Métodos

Obtenção dos explantes. Os explantes de *Annona squamosa* foram obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* (meio WPM, suplementado com 10 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem), que permaneceram em sala de crescimento (temperatura de 25 ° ± 3 °C) sob baixa iluminação (2-5 μmol. m⁻².s⁻¹) por 15 dias após a germinação . Cada folha constituiu um explante, sendo separado em dois tipos: folhas definitivas e folhas cotiledonares.

Os explantes das espécies *A. bahiensis* e *A. glabra* foram obtidos a partir da indução de brotações *in vitro* de segmentos nodais (meio WPM, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e

2mg.L⁻¹ de BAP, solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar e o pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, sob intensidade luminosa de 50-55 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ° ± 3 °C).

Meio básico e condições de incubação. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio WPM enriquecido com 30 g.L⁻¹ de sacarose e combinações de BAP (0,0; 0,5; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e ANA (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) e solidificado com 7 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,7 antes da autoclavagem. O experimento foi conduzido sob intensidade luminosa de 50-55 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes frias, fotoperíodo de 16h e temperatura de 25 ° ± 3 °C.

No primeiro experimento foi avaliado o efeito do genótipo na organogênese direta. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo em fatorial 3 x 4 x 4 (onde 3 representa as espécies de *Annona*, 4 as concentrações de BAP e de ANA). Cada 10 tratamentos com 4 repetições, sendo cada repetição formada por 4 tubos.

No segundo experimento foi avaliado o efeito do tipo de explante na organogênese direta. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo em fatorial 2 x 4 x 4 (onde 2 representa os tipos de explantes e 4 as concentrações de BAP e de ANA). Cada 10 tratamentos com 4 repetições, sendo cada repetição formada por 3 tubos.

Foram avaliados a presença e ausência de gemas (atribuindo os valores 1 para presença e 0 para ausência) e brotações aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação.

Para efeito de análise de variância, os dados originais (x) foram transformados para a raiz quadrada de x+1.

Resultados e Discussão

Efeito da combinação genótipo, BAP e ANA. Os explantes de *Annona* apresentaram organogênese direta sem formação de calos e em algumas combinações de BAP e ANA (dados não mostrados) houve formação de calos na base do explante. Em todos as combinações, como verificado nos valores de quadrado médios apresentados, observou que o fator genótipo teve a maior contribuição na indução de gemas adventícias (Tabelas 3 e 5) e o número de gemas foi decrescente até 60^o dia, evidenciando uma correlação direta com o número de brotações que teve comportamento inverso ao longo do experimento (Tabelas 1 e 2).

A interação genótipo x BAP x ANA foi altamente significativa. Entretanto, não foi possível identificar uma combinação capaz de induzir gemas em *A. glabra* (Tabelas 1 e 2).

Efeito da interação tipo de explante, BAP e ANA. Os maiores números (dados não mostrados) de gemas e brotações foram observados de explantes tomados das folhas cotiledonares, que mostraram também com maior capacidade organogênica em relação às folhas definitivas de *A. squamosa* (Tabelas 4 e 6). A exemplo do que ocorreu no experimento anterior, combinação alguma induziu gemas em *A. glabra*.

O presente estudo mostra claramente que citocinina e auxina agem sinergisticamente para produzir brotações vigorosas de *A. squamosa* e *A. bahiensis in vitro*. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Nair et al. (1984a, 1984b) para a espécie *A. squamosa* em meio MS, onde múltiplas brotações foram obtidas de explantes foliares estimulados BAP e cinetina.

O tipo de explante usado para muitas culturas é também um fator muito importante na indução de gemas e brotações. As folhas cotiledonares respondem rapidamente aos reguladores utilizados e parecem ser um tipo excelente de explante para a propagação rápida de *Annona*.

A propagação de múltiplas brotações em explantes foliares é possível em *Annona*, mas novos estudos são necessários para vencer a dificuldade para enraizar.

Referências Bibliográficas

- JORDAN, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**, v.53, n.5, p.234-237, 1988.
- NAIR, S.; GUPTA, M.V.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* propagation of *Annona* hybrid (*Annona squamosa* L x *Annona cherimola* L) **Indian Journal of Horticulture**. v.41, 160-165, 1984a.
- NAIR, S.; GUPTA, M. V.; SHIRGURKAR, M.V.; MASCARENHAS, A..F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.3, 29-40, 1984b.
- RASAI, S.; KANTHARAJAH, A..S.; DODD, W.A.. The effect of growth regulators, source of explants and irradiance on *in vitro* regeneration of atemoya. **Australian Journal of Botany**, v.42, p.333-340, 1994.





Tabela 1. Interação BAP x ANA x espécie na indução de gemas. (A) *A. squamosa*; (B) *A. bahiensis*; (C) *A. glabra*

BAP	ANA	Presença de Gemas										
		1ª Avaliação			2ª Avaliação			3ª Avaliação				
mg.L ⁻¹	mg.L ⁻¹	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)		
	0,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	0,25	1,00 b	1,21 a	1,00 b		1,00 b	1,21 a	1,00 b		1,00 b	1,21 a	1,00 b
0,50	0,50	1,21 a	1,00 b	1,00 b		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	1,00	1,21 a	1,21 a	1,00 b		1,00 b	1,41 a	1,00 b		1,00 b	1,21 a	1,00 b
	0,00	1,21 a	1,00 b	1,00 b		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 b	1,21 a	1,00 b		1,00 a	1,00 a	1,00 a
1,00	0,50	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	1,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	0,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 a	1,00 a	1,00 a
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a		1,00 b	1,21 a	1,00 b		1,00 a	1,00 a	1,00 a

2,00	0,50	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,41 a	1,00 b	1,00 a	1,00 a	1,00 a
	1,00	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b
	0,00	1,00 b	1,41 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 a	1,00 a	1,00 a
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,00 a
4,00	0,50	1,00 a	1,21 b	1,00 a	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,41 a	1,00 b
	1,00	1,21 a	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,41 a	1,00 b
dms			0,182			0,152			0,100	



Tabela 2. Interação BAP x ANA x espécie na indução de brotações. (A) *A. squamosa*; (B) *A. bahiensis*; (C) *A. glabra*

BAP mg.L ⁻¹	ANA mg.L ⁻¹	Presença de brotações								
		1ª Avaliação			2ª Avaliação			3ª Avaliação		
		(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)	(A)	(B)	(C)
	0,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b
	0,25	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b
0,50	0,50	1,00 a	1,00 a	1,00 a	1,21 a	1,00 b	1,00 b	1,21 a	1,00 b	1,00 b

























































































	1,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,21 a	1,00 b	1,00 b	 1,21 a	1,00 b	1,00 b
 	 	 a	 a	 a	 a 	 a	 a	 a 	 a	 a
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 b	1,21 a	1,00 b
1,00	0,50	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a
	1,00	1,21 a	1,00 b	1,00 b	 1,21 a	1,00 b	1,00 b	 1,21 a	1,00 b	1,00 b
 	 	 a	 a	 a	 a 	 a	 a	 a 	 a	 a
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 b	1,21 a	1,00 b
2,00	0,50	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,21 c	1,41 a	1,00 b
	1,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,21 a	1,00 b	1,00 b	 1,00 b	1,21 a	1,00 b
 	 	 a	 a	 a	 a 	 b	 b	 b 	 a	 b
	0,25	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a
4,00	0,50	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a
	1,00	1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,00 a	1,00 a	1,00 a	 1,21 a	1,00 b	1,00 b
dms			0,082			0,163			0,182	
	 			 	 		 			 

Tabela 3. Resumo da ANDEVA referente aos fatores espécies, BAP e ANA na indução na


 Organogênese direta em folhas de *Annona*.

FONTE DE VARIACÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS (PRESENÇA DE GEMAS)		
		1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
				



 ESPÉCIE (E)	2	0.139403 ***	0.432507 ***	0.175147 ***
BAP	3	0.047659 ***	0.022638 *	0.041702 ***
ANA	3	0.038127 **	0.022638 *	0.041702 ***
ESPÉCIE*BA P	6	0.044085 ***	0.022638 *	0.041702 ***
ESPÉCIE*AN A	6	0.020255 ns	0.022638 **	0.041702 ***
BAP*ANA	9	0.028595 **	0.032170 ***	0.022638 ***
E*BAP*ANA	18	0.039319 ***	0.032170 ***	0.022638 ***
Resíduo	144	0.011915	0.008340	0.003574
Total	191			
CV		 8		



 **ela 4.** Resumo da ANDEVA referente aos fatores tipo de explante, BAP e ANA na indução na organogênese direta em folhas de *Annona*.

FONTE DE VARIACÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS (Tipo de explante na indução de gemas)		
		1ª	2ª	3ª Avaliação

		Avaliação		Avaliação	

EXPLANTE	1	0.434294***	1.125000** *	-
BAP	3	0.262721***	0.458333** *	-
ANA	3	0.091148***	0.458333** *	-
T*BAP	3	0.248423***	0.458333** *	-
T*ANA	3	0.134041***	0.458333** *	-
BAP*ANA	9	0.057787***	0.236111** *	-
T*BAP*ANA	9	0.062553***	0.236111** *	-
Resíduo	96	0.008936	0,00009	-
Total	127			
CV		8,42	0,00	-

Tabela 5. Resumo da ANDEVA referente aos fatores espécies, BAP e ANA na indução na anogênese direta em folhas de *Annona*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS (PRESENÇA DE BROTAÇÕES)		
		1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação

ESPÉCIE (E)	2	0.014298***	0.153701***	0.228764***
BAP	3	0.004766ns	0.028595*	0.047659***
ANA	3	0.004766ns	0.028595*	0.028595ns
ESPÉCIE*BAP	6	0.004766ns	0.039319***	0.104850***
ESPÉCIE*ANA	6	0.004766ns	0.039319***	0.028595*
BAP*ANA	9	0.007943***	0.006355ns	0.063546***
E*BAP*ANA	18	0.007943***	0.007546ns	0.044482***
Resíduo	144	0.002383	0.009532	0.011915
Total	191			
CV		1.84	9.94	10.21

Tabela 6. Resumo da ANDEVA referente aos fatores tipo de explante, BAP e ANA na indução de organogênese direta em folhas de *Annona*.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADOS MÉDIOS (Tipo explante na indução de brotações)		
		1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação

EXPLANTE	1	0.193019***	0.434294**	0.772078***
BAP	3	0.121531***	0.391401**	0.343146***
ANA	3	0.092935***	0.391401**	0.100084***
T*BAP	3	0.121531***	0.048255**	-

T*ANA	3	0.035744***	0.048255**	0.042893**
BAP*ANA	9	0.078638***	0.062553** *	0.128680***
T*BAP*ANA	9	0.059574***	0.024425*	0.109616***
Resíduo	96	0.003574	0.012511	0.010723
Total	127			
CV		5,62	9,74	8,77



[1](#) Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia, Brasil). raniere@ufla.br



[2](#) Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil.



[3](#) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas (Alagoas, Brasil)

[4](#) Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental.

