

## Efeito de ANA e TDZ na calogênese *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B.Smith).

Machado, Isaac Stringueta<sup>1</sup>; Soriano, Leonardo<sup>2</sup>; Gomes, Allan Correia<sup>2</sup>; Bertozzo, Fernanda<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Professor Doutor (UNESP-FCA), Departamento de Recursos Naturais, Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 3811-7162, e-mail: [isaac@fca.unesp.br](mailto:isaac@fca.unesp.br);

<sup>2</sup>Graduando (UNESP-FCA), Curso de Engenharia Florestal, Departamento de Recursos Naturais, Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (19) 9141-8231, email: [soriano@fca.unesp.br](mailto:soriano@fca.unesp.br) e [acgomes@fca.unesp.br](mailto:acgomes@fca.unesp.br); <sup>3</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agricultura (UNESP-FCA), Programa de Pós-Graduação em Agricultura, Departamento de Recursos Naturais, Campus Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970, Botucatu, São Paulo, fone (14) 9712-4640, email: [bertozzo@fca.unesp.br](mailto:bertozzo@fca.unesp.br).

O curauá (*Ananas erectifolius* L. B. Smith) é uma bromélia originária do Complexo Amazônico cujas fibras naturais (biomassa renovável e biodegradável) substituem as de origem sintética na indústria, especialmente a automobilística, onde são empregadas na composição de novos materiais (“composites”). A calogênese e a produção de células não diferenciadas representa importante contribuição para o melhoramento genético da espécie, pois através da organogênese indireta pode-se obter variantes somaclonais, com valores agrônômicos agregados, ou mesmo, facilitar a obtenção de protoplastos para o emprego da tecnologia molecular do DNA-recombinante. A indução da calogênese está relacionada ao “pool” de hormônios vegetais endógenos, sendo também influenciada pela suplementação exógena de reguladores vegetais; dentre estes, destacam-se o Thidiazuron (TDZ), por ser a mais potente das difenilurêias avaliadas na cultura de tecidos, e o ácido naftalenoacético (ANA), auxina bastante empregada na obtenção de calos. Este trabalho teve como finalidade desenvolver protocolo laboratorial para a indução da calogênese, manutenção e cultivo *in vitro* de células não diferenciadas provenientes de plantas de curauá. Foram selecionadas matrizes do banco de germoplasma do Departamento de Recursos Naturais (FCA-UNESP) e delas coletados rebentos jovens, que passaram por tratamentos prévios de desinfestação com benomyl, etanol (70%), hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e proteção antioxidante com ácido ascórbico. Em condições assépticas, procedeu-se desfolhamento segundo a filotaxia original e a extração de gemas epicórmicas apicais e axilares. Os meristemas assim obtidos foram inoculados e estabelecidos *in vitro* em meio nutritivo basal de Murashige & Skoog (1962), consistência sólida, por um período de 20 dias, no escuro e temperatura ambiente de 27 ±3 C°. As gemas “habitadas” foram transferidas para meio MS sólido suplementado com diferentes concentrações de ANA e TDZ: T1-ausência de reguladores; T2 – 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 0,25 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ; T3 - 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 0,5 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ; T4 – 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ; T5 – 1,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ; T6 - 2,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ; T7 - 3,0 mg. L<sup>-1</sup> de ANA e 0,0 mg. L<sup>-1</sup> de TDZ. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e o número de repetições 10, sendo 1 gema por frasco. Os resultados fisiológicos de massa fresca, massa seca e teor protéico total foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05%). A calogênese e cultivo dos aglomerados mostraram-se viáveis na ausência de regulador de crescimento e nos tratamentos com TDZ, onde a produção de calos foi proporcional à elevação da concentração. O mesmo não ocorreu na presença de ANA e os meristemas, em poucos dias, entraram em senescência e posterior necrose. Como conclusões para a espécie e condições empregadas: o TDZ aplicado de maneira isolada pode ser um poderoso indutor da calogênese, especialmente na concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup>; é possível a calogênese espontânea *in vitro*, em meio nutritivo basal MS, sem a presença de regulador vegetal; o ANA reprime a resposta promotora da calogênese.

### PALAVRAS-CHAVES:

*Ananas erectifolius* L.B.Smith; calogênese *in vitro*; ANA; TDZ; regulador vegetal.

## Calogênese em diferentes tipos de explantes de paricá na presença de 2,4-D.

Lulla Naiff Rabelo de Souza Reis<sup>1</sup>; Osmar Alves Lameira<sup>2</sup>; Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro<sup>3</sup>; Allan Guerreiro Carneiro<sup>4</sup>; Carla Vanessa Borges Castro<sup>5</sup>; Silvaney Fonseca Ferreira<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (UFV) Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG, CEP 36570-000. e-mail: [naiff\\_agro@yahoo.com.br](mailto:naiff_agro@yahoo.com.br); <sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. Trav. Dr. Enéas Pinheiro sn, CP 48, Belém-PA, CEP 66095-100, e-mail: [osmar@cpatu.embrapa.br](mailto:osmar@cpatu.embrapa.br); <sup>3</sup>Doutoranda do curso de Ciências Florestais (UFRA). Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530, e-mail: [mgti@amazon.com.br](mailto:mgti@amazon.com.br); <sup>4</sup>Cientista da Computação (CESUPA). Av. Governador José Malcher, 1963, Belém-PA, CEP: 66060-230, e-mail: [allanquerreiro@yahoo.com.br](mailto:allanquerreiro@yahoo.com.br); <sup>5</sup>Mestre em Agronomia (UFRA), e-mail: [carlinhaufra@hotmail.com](mailto:carlinhaufra@hotmail.com); <sup>6</sup>MSc em Ciência Animal (UFPA). Rua Augusto Côrrea, 01, Guamá, Belém-PA. CEP 66075-110 - CP 479, e-mail: [silvaney8@yahoo.com.br](mailto:silvaney8@yahoo.com.br).

### INTRODUÇÃO

O paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) é uma espécie florestal, cuja madeira é leve, com coloração branco-amarelado-claro, de processamento fácil e com bom acabamento (Sousa et al., 2005), sendo que um dos principais usos é a produção de lâminas para compensados. Algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando definir metodologia de micropropagação do paricá com vista ao melhoramento dos plantios, contudo, ainda não foi possível o estabelecimento de um processo clonal da espécie. Tendo em vista a necessidade de estudos referentes à aplicação da cultura de tecidos no paricá, faz-se necessária a busca por técnicas alternativas que possibilitem a definição de um protocolo de clonagem dessa espécie. Assim, a regeneração das plantas *in vitro*, diretamente a partir do explante ou através do cultivo de calos, pode ser uma alternativa para propagação deste material de qualidade.

Calos são tecidos que podem apresentar diferenciação parcial, constituídos por uma massa de células irregulares, que se multiplicam desordenadamente, em resposta a injúrias químicas ou físicas e que possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras (Torres & Caldas, 1990; Paiva & Paiva, 2001).

De uma maneira geral, concentrações equivalentes de auxina e de citocininas no meio promovem a calogênese, entretanto, isso varia em função do tipo e idade do explante utilizado, genótipo da planta doadora e do balanço hormonal da espécie, sendo que para algumas espécies apenas a adição de auxina ao meio de cultura pode ser suficiente para indução de calos, e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é a auxina sintética mais relatada para induzir o processo de calogênese.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de indução de calos *in vitro* a partir do cultivo de diferentes explantes de paricá em meio de cultura MS adicionado de 2,4-D.

### MATERIAL E MÉTODOS

Como fontes de explante foram utilizadas plântulas germinadas *in vitro* com 20 dias de cultivo. Os tratamentos testados foram constituídos de de diferentes combinações de 2,4-D (0, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) com BAP (0, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) e 5 fontes de explante (segmento apical – SA; segmento nodal – SN; segmento intercotiledonar – SI; segmento foliar – SF e segmento cotiledonar – SC). Os segmentos apical e nodal, ambos medindo em torno de 0,5 cm e segmento intercotiledonar de aproximadamente 1,0 cm foram inoculados na posição horizontal, enquanto que segmentos foliares e cotiledonares de 0,5 cm<sup>2</sup> foram inoculados com a superfície abaxial voltada para o meio de cultivo. Todos os explantes foram inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura básico MS com as concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e Fe-EDTA reduzidas a metade (demais componentes em suas concentrações normais), sacarose 3%, ágar 0,6%, pH 5,8, e suplementado com o antioxidante ácido cítrico 0,1%, na presença ou ausência de 2,4-D e BAP, e mantidos no escuro em sala de crescimento sob temperatura de 24 ± 1°C.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5 (5 combinações de 2,4-D com BAP e 5 fontes de explante), com 5 repetições, totalizando 125 unidades experimentais, sendo que cada parcela foi constituída por um frasco contendo 3 explantes. A avaliação do experimento foi realizada 20 dias após a inoculação, onde se avaliou o percentual de explantes com calos; área dos explantes cobertas por calos, levando em consideração as seguintes notas: 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos; a textura; coloração e oxidação. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de percentual de explantes com calos foram transformados para  $\arcsen (X/100)^{1/2}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo análise de variância, houve efeito significativo, para indução de calos e área coberta por estes, entre os explantes de paricá e entre as concentrações de 2,4-D, ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que a interação entre esses dois fatores só foi significativa para o percentual de explantes com calos.

A formação de calos iniciou-se a partir de quinto dia de cultivo nos segmentos intercotiledonares e a partir do décimo dia nos demais explantes. Conforme a Tabela 1, não houve indução de calos em segmentos foliares e cotiledonares na ausência de reguladores de crescimento. Por outro lado, 56,3% dos segmentos apicais formaram calos sob essa mesma condição, não diferindo estatisticamente daqueles submetidos às concentrações de 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, sendo que a concentração de 6 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D proporcionou o maior percentual de explantes apicais com calos (100%). Da mesma forma, segmentos nodais e intercotiledonares formaram calos em meio MS sem adição de 2,4-D, com 90,3 e 87,5%, respectivamente, os quais também não diferiram dos demais tratamentos contendo esse regulador de crescimento (Tabela 1). Essa diferença de resposta entre explantes extraídos da mesma planta na ausência de reguladores, é justificável, uma vez que segmentos apicais, nodais e intercotiledonares apresentam maior atividade meristemática em relação às folhas e cotilédones, que contêm maior número de células diferenciadas.

Com relação aos segmentos foliares, a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi a mais eficiente, com 100% de calogênese, enquanto que para segmentos cotiledonares, não houve diferença significativa entre as três concentrações de 2,4-D estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de explantes de paricá que formaram calos na presença de diferentes concentrações de 2,4-D. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )	SA	SN	SIC	SF	SC
	%				
0	56,3 bA	90,3 aA	87,5 aA	0,0 cB	0,0 bB
2	68,8 bB	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	91,7 aAB
4	66,7 bB	100,0 aA	100,0 aA	66,7 bB	75,0 aAB
6	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA	75,0 bA	100,0 aA

Médias seguidas por letras distintas entre si comparam: minúsculas, as concentrações de 2,4-D; e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SN – segmento nodal; SIC – segmento intercotiledonar; SF – segmento foliar e SC – segmento cotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste de Tukey.

De uma forma geral, segmentos nodais e intercotiledonares apresentaram as melhores respostas para formação de calos, independente da concentração de 2,4-D utilizada. Segundo Watt (1999), a indução de calos de *Eucalyptus* foi obtida em meio MS com concentrações de 1 a 5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, na ausência de luz. Mesquita (1999) e Lima (2004) observaram que a concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi a mais eficiente para a indução de calos em lechiera (*Litchi chinensis* Sonn.) e sangra d'água (*Croton urucurana* Baill), respectivamente. Já Sahoo et al. (1997) verificaram que concentrações entre 0,5 a 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D não foram eficientes para a formação de calos em explantes foliares de amoreira (*Morus indica*). Rodrigues (2000) induziu calos em diversos tipos de explantes (segmentos nodais, ápices, discos foliares, epicólitos e cotilédones) de cupuaçu (*Theobroma*

*grandiflorum* Wildenow wx. Sprengel) e verificou que os cotilédones foram os mais responsivos à formação de calos na presença de 2,4-D.

De acordo com a Figura 1, segmentos intercotiledonares apresentaram maior área coberta por calos (62%), porém não diferiu significativamente de segmentos nodais (50%). Segmentos apicais, cotiledonares e foliares foram menos eficientes, com 30, 27 e 24% de cobertura por calos, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

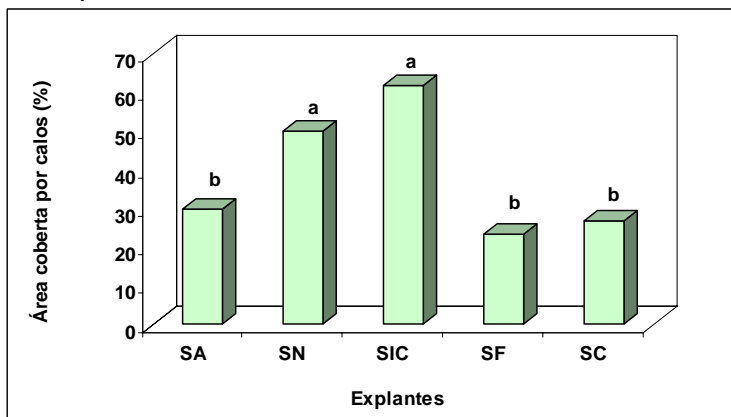


Figura 1. Média de área coberta por calos em diferentes explantes de paricá inoculados em meio MS adicionado de 2,4-D. Letras distintas entre si comparam as médias de área coberta por calos, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Em relação ao 2,4-D, a concentração de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  proporcionou a maior área coberta em todos os explantes utilizados (segmentos apical, nodal, intercotiledonar, foliar e cotiledonar), com 58% em média de cobertura por calos (Figura 2). Resultado semelhante foi obtido por Mesquita (1999), o qual constatou que a concentração de  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D proporcionou um grande volume de calos em lechiera (*Litchi chinensis*).

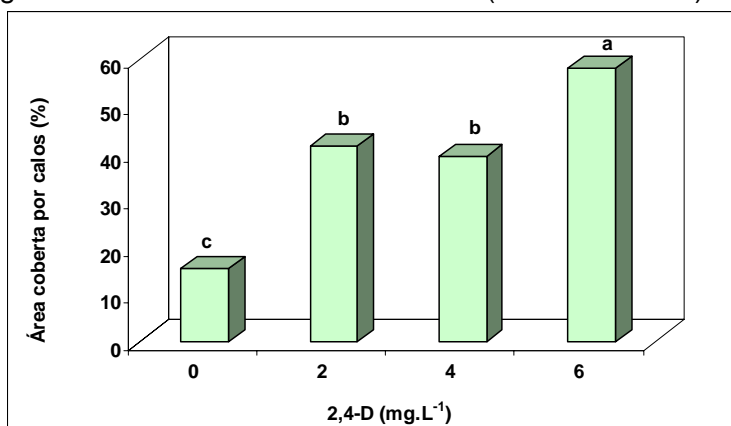


Figura 2. Média de área coberta por calos em explantes de paricá inoculados em meio MS na presença de diferentes concentrações de 2,4-D. Letras distintas entre si comparam as médias de área coberta por calos, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

As concentrações de 2 e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D não apresentaram diferença significativa entre si, com respectivamente, 41 e 39%. E quando não foi adicionado 2,4-D ao meio de cultivo, a área dos explantes coberta por calos foi relativamente pequena (15%), conforme mostra a Figura 2. Os calos formados em explantes de paricá, iniciados a partir do quinto dia de cultivo (Figura 3A) apresentaram-se translúcidos até o décimo quinto dia (Figura 3B), assumindo no momento da avaliação coloração bege (Figura 3C), e a partir daí cores mais escuras até a total oxidação após 35 dias de inoculação (Figuras 3D, 3E e 3F). Este fato pode ter ocorrido em função da exaustão de nutrientes ou liberação de substâncias fenólicas no meio de cultivo, sendo que a transferência para novo meio de cultura deve ser feita em torno de 20 dias após a inoculação. Quanto à textura, os calos foram predominantemente friáveis.

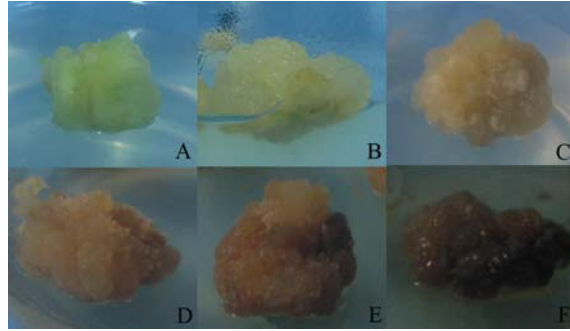


Figura 3. Formação de calos em segmentos intercotiledonares de paricá cultivados em meio MS suplementados com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, com 5 (A), 15 (B), 20 (C), 25 (D), 30 (E) e 35 (F) dias de cultivo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

### CONCLUSÕES

Na ausência de regulador de crescimento não há calogênese em segmentos foliares e cotiledonares; e na presença de 2,4-D, a formação de calos independe do explante e da concentração utilizada, sendo que segmentos intercotiledonares foram os mais eficientes para indução de calos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LIMA, E.C. **Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d'água (*Croton urucurana* Baill)**. Lavras: UFLA, 2004. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

MESQUITA, A.C. **Estabelecimento *in vitro* de lechieira (*Litchi chinensis* Sonn) através do cultivo de segmentos foliares e nodais e análise bioquímica de calos**. Lavras: UFLA, 1999. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

PAIVA, R.; PAIVA, P.D. O. **Textos acadêmicos: cultura de tecidos**. Lavras: FAEPE/UFLA. 2001. 97p.

RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento de eixo embrionário *in vitro* e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willdenow wx. Sprengel) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius)**. Jaboticabal: UNESP, 2000. 60p. Tese (Doutorado em Agronomia).

SAHOO, Y.; PATTNAIK, S.K.; CHAND, P.K. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.69, n.1/2, p.85-98, mar. 1997.

SOUSA, D.B.de; CARVALHO, G.S.; RAMOS, E.J.A. **Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)**. Manaus: INPA. n.13, 2005. 2p. (Informativo Técnico Rede Sementes da Amazônia).

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.

WATT, M.P.; BLAKEWAY, R.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S.M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (Ed.). **Somatic embryogenesis in woody plants**. Boston: USA, v.5, 1999, p.63-78.

### PALAVRAS-CHAVE

*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*, calos, 2,4-D, explantes.