

MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM EXPLANTES FOLIARES E RADICULARES DE JACARANDÁ DA BAHIA

Fernanda Raquel Sartor¹, Rafael Fonsêca Zanotti², Anderson Martins Pilon³, Cláudio Hiroshi Fukushima⁴

Resumo: A espécie *Dalbergia nigra* é conhecida popularmente como jacarandá da bahia. Devido ao seu destaque e importância econômica, a exploração para uso madeireiro acarretou devastação no seu ambiente natural o que a incluiu na lista de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. As técnicas de cultura de tecidos tornaram-se uma alternativa para propagação dessas espécies, pois permite propagação massal de plantas com elevada qualidade fitossanitária, em curto período de tempo e espaço. Objetivou-se neste estudo avaliar as respostas calogênicas induzidas em explantes de folíolos e raízes de jacarandá da bahia cultivados *in vitro* em diferentes meios de cultura e concentrações de reguladores de crescimento. Os tratamentos foram compostos por 10 repetições, cada repetição contendo cinco explantes de folíolos ou raiz, totalizando 32 tratamentos, onde variaram-se os meios de cultura (MS e WPM), concentrações de AIA (1; 5 e 10 μM), 2,4-D (1; 5 e 10 μM) e BAP (10 μM). As avaliações foram realizadas com 4, 8 e 12 semanas de cultivo, considerando a resposta quanto à formação calogênica, calos cicatriciais, mononodulares, heteronodulares e organogênese. Os meios de cultura com AIA sem a presença de BAP não induziram a formação calogênica; calos mononodulares são antecessores para organogênese indireta; explantes foliares cultivados durante 12 semanas em meio de cultura MS contendo 1 μM AIA e 10 μM BAP são ideais para formação de novos brotos via organogênese indireta.

PALAVRAS-CHAVE: *Dalbergia nigra*, organogênese indireta, calos, meio de cultura

¹Bióloga, doutoranda em Fisiologia Vegetal - Universidade Federal de Viçosa – UFV Viçosa – EMAIL - fernanda_sartor@biologia.bio.br.

²Biólogo, doutorando em Produção Vegetal - Universidade Federal do Espírito Santo – UFES Alegre.

³Engenheiro Agrônomo, Doutor em Bioquímica Agrícola – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural - Incaper.

⁴Discente Agronomia - Universidade Federal de Viçosa – UFV Viçosa.

IN VITRO MORPHOGENESIS IN LEAF EXPLANTS AND ROOT OF JACARANDA DA BAHIA

Abstract: The species *Dalbergia nigra* is popularly known as the jacarandada bahia. Due to its economic importance and prominence, the exploration for use in timber caused devastation in the natural environment that included the list of species of flora threatened with extinction. The tissue culture techniques have become an alternative to their propagation, since it allows mass propagation of plants with a high health status, in a short period of time and space. The objective of this study was to evaluate the responses calogenics induced in explants of leaves and roots jacaranda da bahia cultured *in vitro* in different culture media and concentration of growth regulators. The treatments consisted of 10 replicates, each replicate containing five explants of leaves or root, totaling 32 treatments, which ranged up the culture media (MS and WPM) concentration of AIA (1; 5 e 10 μM), 2,4-D (1; 5 e 10 μM) and BAP (10 μM). The evaluations were performed with 4, 8 and 12 weeks of culture, where as the response for the formation calogenics, callus healing, mononodular, heteronodular and organogenesis. The culture media with AIA without the presence of BAP did not induced the formation calogenics; mononodulars calluses are predecessors toin direct organogenesis, leaf explants cultured for 12 weeks in MS medium containing 1 μM AIA e 10 μM BAP are ideal for training new shoots via indirect organogenesis.

KEY-WORDS: calluses, indirect organogenesis, culture medium

INTRODUÇÃO

A espécie *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. pertence a família Fabaceae e é conhecida popularmente como jacarandá da bahia, jacarandá-preto ou caviúna, que se destaca por sua considerável importância econômica (LORENZI, 2002). A árvore tem características ornamentais mas a maior exploração é em virtude da excelente qualidade da madeira que é amplamente utilizada na construção civil,

marcenaria, fabricação de móveis e instrumentos musicais (CARVALHO, 2003).

A propagação da maioria das espécies florestais é realizada via seminal, principalmente, devido à ausência de informações silviculturais destas espécies (DIAS et al., 2012). A propagação *in vitro* pode constituir uma alternativa econômica adequada em relação aos métodos clássicos de propagação de espécies

florestais nativas, pois além de oferecer a possibilidade de propagação de árvores selecionadas, possibilita a limpeza clonal, obtendo-se plantas livres de vírus por meio de ápices caulinares e meristemas, superando problemas de contaminação patogênica (WENDLING et al., 2006).

A formação calogênica é dependente do tipo de tecidos e células que está sendo cultivado, e principalmente da constituição do meio de cultivo e concentrações de sais. Calos com potencial embriogênico iniciam a sua formação pela atividade de auxinas presentes nos tecidos bem como no meio de cultura e posteriormente as células com capacidade de diferenciação em novos órgãos serão mediadas pela ação de citocininas (SUGIMOTO et al., 2011).

Para a grande maioria das espécies florestais nativas ainda são incipientes os trabalhos sobre o método de propagação adequado que resultará em mudas saudáveis e em condições de serem utilizadas para as mais variadas funções, desde programas de reflorestamento até a implantação de florestas plantadas para fins de extração.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas calogênicas induzidas em explantes retirados de folíolos e raízes de Jacarandá da Bahia *in vitro* quando

cultivados em diferentes meios de culturas e concentrações de reguladores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,7 antes da autoclavagem, que foi realizada a 120°C, por 15 minutos. O preparo dos explantes e a inoculação no meio de cultura foram feitos em condições assépticas e as culturas mantidas no escuro com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foram utilizados folíolos e segmentos de raízes de Jacarandá da Bahia oriundos de plântulas anteriormente cultivadas *in vitro*. Os tratamentos foram compostos por 10 repetições, cada repetição contendo 5 explantes de folíolos ou raiz, totalizando 32 tratamentos, onde variaram-se os meios de cultura (MS e WPM), concentrações de ácido 3-indolacético - AIA (1; 5 e 10 μM), ácido 2,4-diclorofenóxiacético - 2,4-D (1; 5 e 10 μM) e 6-benzilaminopurina - BAP (10 μM), os tratamentos utilizados foram:

Tabela 1. Tratamentos utilizados para indução de calos em Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*).

Tratamentos	Meio de cultura		AIA (μM)			2,4-D (μM)			BAP (μM)	
	MS	WPM	1	5	10	1	5	10	10	
T1 folíolo	X			X						
T2 folíolo	X		X						X	
T3 folíolo	X			X					X	
T4 folíolo	X				X				X	
T5 folíolo	X						X			
T6 folíolo	X					X			X	
T7 folíolo	X						X		X	
T8 folíolo	X							X	X	
T9 raiz	X			X						
T10 raiz	X		X						X	
T11 raiz	X			X					X	
T12 raiz	X				X				X	
T13 raiz	X						X			
T14 raiz	X					X			X	
T15 raiz	X						X		X	
T16 raiz	X							X	X	
T1 folíolo		X		X						
T2 folíolo		X	X						X	
T3 folíolo		X		X					X	
T4 folíolo		X			X				X	
T5 folíolo		X					X			
T6 folíolo		X				X			X	
T7 folíolo		X					X		X	
T8 folíolo		X						X	X	
T9 raiz		X		X						
T10 raiz		X	X						X	
T11 raiz		X		X					X	
T12 raiz		X			X				X	
T13 raiz		X					X			
T14 raiz		X				X			X	
T15 raiz		X					X		X	
T16 raiz		X						X	X	

As avaliações foram realizadas após 4, 8 e 12 semanas de cultivo, a cada observação ocorreu um subcultivo. Os parâmetros avaliados foram quanto à resposta à formação calogênica, formação de calos cicatriciais, mononodulares,

heteronodulares e organogênese. A análise dos dados foi feita utilizando o programa estatístico Assistat versão 7.7 beta (SILVA E AZEVEDO, 2009), em que foi comparada a formação calogênica entre os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamentos utilizando folíolos como explantes, não apresentaram formação calogênica quando cultivados em meio de cultura MS, independente da concentração e regulador de crescimento. Isso provavelmente aconteceu devido ao fato do tempo que os reguladores de crescimento necessitam para estarem ativos nas rotas metabólicas para então estimularem às células a respostas, já que esses reguladores não estão disponíveis naturalmente na planta nas quantidades necessárias para indução de calos.

A eficiência dos explantes em gerar calos depende da determinação dos tecidos vegetais e de sua especificidade. Algumas

espécies são induzidas apenas com auxinas como o 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes classes fitorreguladores, como AIA, BAP e ácido naftalenoacético (ANA), pois a indução de calos bem como a diferenciação das células organogênicas podem ocorrer em apenas um meio de cultura, sem necessitar de subsequentes cultivos (MOTTE et al., 2014).

A indução de calos iniciou na nervura central e nas bordas dos explantes dos folíolos. Quando estes explantes foram cultivados em meio de cultura WPM, ocorreu formação calogênica com predominância monodular em 75% dos tratamentos avaliados, demonstrando o 2,4-D como promotor de calos monodulares (Figura 1).

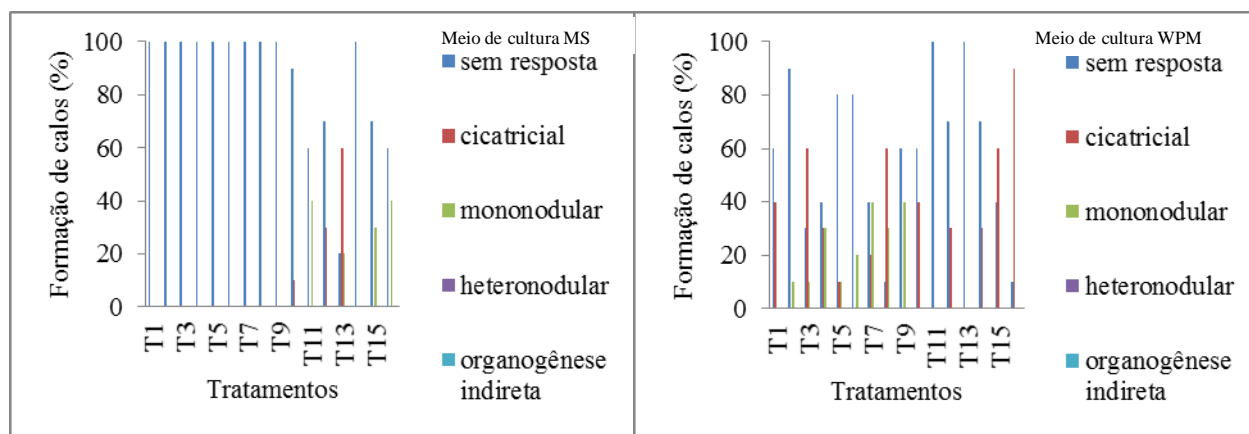


Figura 1. Calejamento em explantes oriundos de folíolos e segmentos radiculares de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*) na quarta semana de cultivo em meio de cultura MS e WPM suplementado com diferentes concentrações e reguladores de crescimento.

A indução de calos foi iniciada nas extremidades dos explantes radiculares e como pode ser observado na Figura 1, ao utilizar meio de cultura MS e explantes de segmentos radiculares, nos tratamentos 9 e 14 não ocorreu formação calogênica. Enquanto que nos demais tratamentos houve formação de calos cicatriciais e/ou mononodulares. Avaliando o desempenho do mesmo tipo de explantes cultivado em meio WPM, T11 e T13 não formaram calos, no entanto em 40% do T9 formou calos mononodulares e em 90% do T16 ocorreu formação de calos cicatriciais, isto provavelmente está relacionado à elevada concentração de 2,4-D, que tem função de desdiferenciação celular. Esses resultados corroboram com Santos et al. (2014) que também obtiveram maior formação calogênica quando também utilizaram a auxina 2,4-D para a indução da diferenciação celular visando a formação de calos organogênicos.

Na oitava semana de cultivo e em explantes de folíolos cultivados em meio de cultura MS, o tratamento 1 ainda não apresentou formação calogênica. O T5 obteve 40% de formação de calos mononodulares, seguido do T8 com 60%, T3 80% e T2 e T4 com 100%. Pode-se observar que tratamentos com a presença de AIA e BAP foram os que demonstraram

maior desempenho para formação de calos mononodulares (Figura 2).

Estes resultados provavelmente estão relacionados à necessidade de suprimentos exógenos de reguladores de crescimento e da eficiência no balanço hormonal entre os níveis de citocininas e auxinas exógenas à planta, que estimulam a proliferação celular. Rocha e Quiorin (2004) concluíram que a formação de calos em explantes foliares de mogno cultivados *in vitro* foi abundante, e, os maiores números de calos foram obtidos na presença das combinações de citocinina e auxina.

Em todos os tratamentos com 2,4-D ocorreu formação de calos cicatriciais, sendo que nos tratamentos 7 e 8 houve formação de calos heteronodulares (80 e 20%) sucessivamente. Nogueira et al. (2007) também concluíram que O 2,4-D é a auxina mais frequentemente usada na indução de calogênese e, em experimentos com murici-pequeno, explantes foliares responderam positivamente à sua presença. Estes resultados provavelmente acontecem porque as auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular

Na figura 2, quando utilizado o meio de cultura WPM, todos os tratamentos com explantes de folíolos

apresentaram formação de calos monomodulares, sendo que T7 e T8 marcaram 90% de formação monodular

e os demais tratamentos variaram entre 50% (T4), 40% (T1), 20% (T5 e T6) e 10% (T2 e T3).

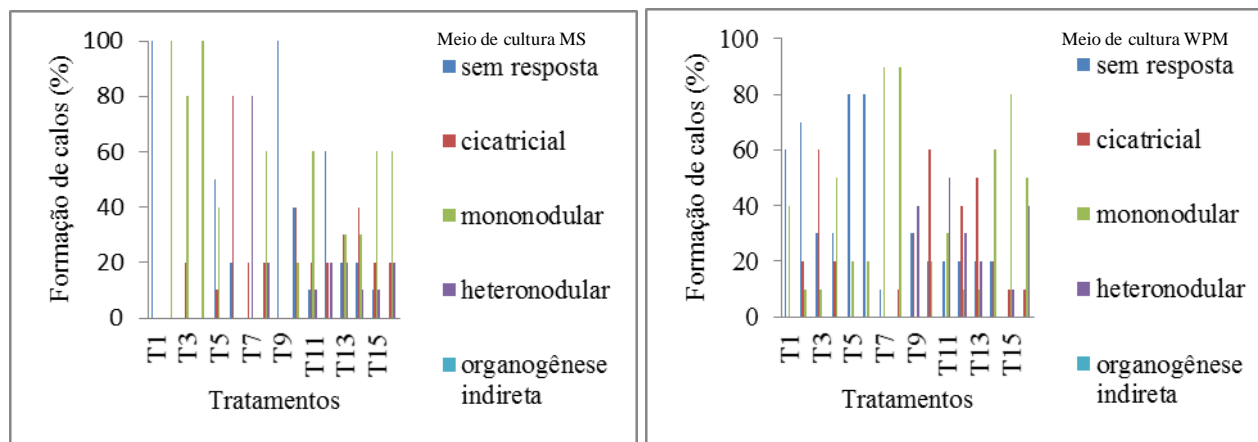


Figura 2. Calejamento em explantes oriundos de folíolos e segmentos radiculares de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*) na oitava semana de cultivo em meio de cultura MS e WPM suplementado com diferentes concentrações e reguladores de crescimento.

Em explantes de raiz subcultivados em meio de cultura MS, no tratamento 9, não ocorreu formação calogênica até a oitava semana de cultivo, nos demais tratamentos, a formação calogênica monodular se sobressaiu, T11, T15 e T16 com 60%, seguido de T10, T13 e T14 com 30% e os demais com menos de 20 pontos percentuais. A dominância de calos monomodulares provavelmente está relacionada à presença de BAP nesses tratamentos, sendo ele uma citocinina promotora de divisões celulares.

Nos tratamentos 11, 12, 13, 14, 15 e 16 ocorreu formação de calos heteronodulares, porém em todos os

tratamentos a incidência foi menor ou igual a 20%. Sete dos 8 tratamentos correspondentes ao explante raiz cultivados em meio de cultura WPM, ocorreu formação de calos monomodulares, com destaque para T15 com 80%, seguido de T14 (60%). Essas respostas provavelmente estão relacionadas à ação da citocinina BAP.

Na Figura 3, em explantes de folhas cultivados e meio de cultura MS, T1 foi o único em que no decorrer das 12 semanas de cultivo não apresentou qualquer tipo de formação calogênica. Esta resposta está associada à provável falta de eficiência do regulador AIA para esta

espécie, e também a ausência de citocinina, que demonstra ser um regulador de crescimento essencial na formação de calos em Jacarandá da Bahia. Todos os

demais tratamentos com este tipo de material vegetal apresentaram formação de calos cicatriciais e/ou monomodulares.

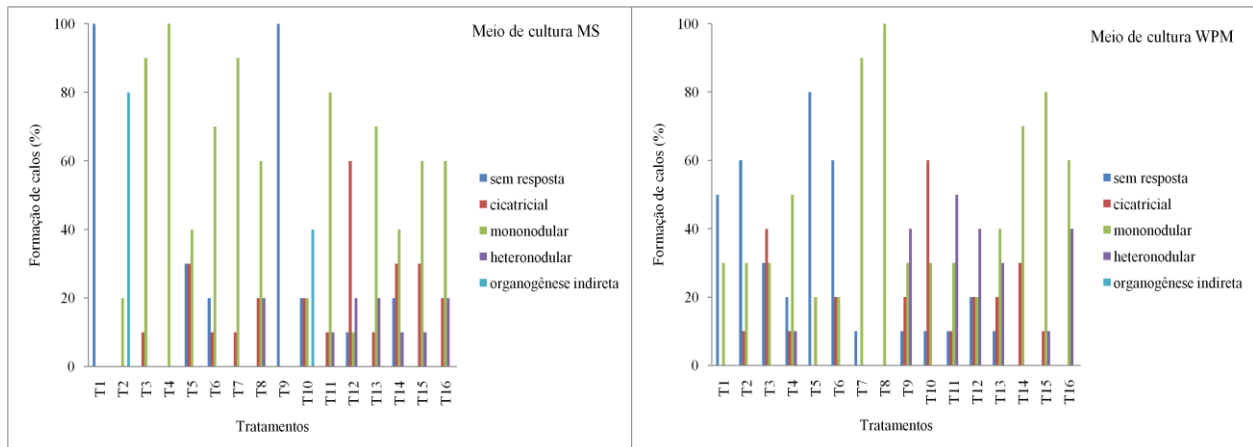


Figura 3. Calejamento em explantes oriundos de folíolos e segmentos radiculares de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*) na décima segunda semana de cultivo em meio de cultura MS e WPM suplementado com diferentes concentrações e reguladores de crescimento.

De todos os tratamentos avaliados, apenas o T2 atingiu a organogênese. 80% de todo o material inoculado apresentou formação organogênica, enquanto que os 20% restantes são potenciais para a organogênese, pode-se observar que para esta espécie, calos monomodulares são antecessores da formação organogênica. Em experimentos com *Annona mucosa* realizados por Barboza et al. (2014) concluíram que a presença de citocininas nos meios de cultura é essencial para que ocorra organogênese, independente do tipo de explante a ser cultivado, dados que

corroboram com os encontrados nesta pesquisa.

Em explantes de folhas cultivados em meio de cultura WPM, todos os tratamentos apresentaram formação de calos monomodulares, com maior incidência para T8 (100%), T7 (90%) e os demais com índices menores ou iguais a 50 pontos percentuais. O único tratamento em que ocorreu formação de calos heteromodulares foi o T4, mas mesmo assim em pouca quantidade, apenas 10%. Ainda na décima segunda semana de cultivo, para explantes de folhas cultivados em meio MS e WPM tiveram muitas

repetições que não houve resposta para formação de calos em todos os tratamentos. Esses resultados são decorrentes provavelmente à grande dificuldade de formação de calos nesta espécie, em se tratar de uma espécie lenhosa e de difícil propagação.

Em explantes de raiz cultivados em meio de cultura MS, o T9 foi o único em que no decorrer de 12 semanas de cultivo não apresentou qualquer tipo de formação calogênica. Supõem-se que isso aconteceu em decorrência da ausência de BAP, afirmando que o meio MS, associado com

5 μM de AIA não é efetivo para formação de calos em explantes de folhas e raiz. Todos os demais tratamentos com este tipo de material vegetal apresentaram formação de calos cicatriciais e monodulares.

Apenas o tratamento 2 atingiu a organogênese em 40% do material inoculado (Figura 4), enquanto que os outros 60% do material variou em não formar calos, calos cicatriais e monodulares. Os tratamentos 11, 12, 13, 14, 15 e 16 também formaram calos heteronodulares em baixos índices, variando de 10 a 20 pontos percentuais.

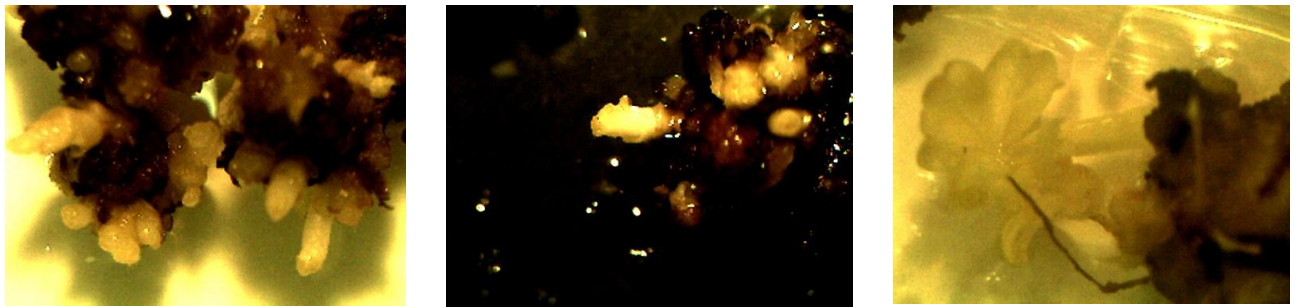


Figura 4. Organogênese indireta em explantes oriundos de folíolos e segmentos radiculares de Jacarandá da Bahia (*Dalbergia nigra*) na décima segunda semana de cultivo em meio de cultura MS e WPM suplementado com 1 μM AIA e 10 μM BAP.

Em explantes de raiz cultivados em meio de cultura WPM todos os tratamentos apresentaram formação de calos cicatriciais, monodulares e/ou heteronodulares, porém em nenhum dos tratamentos ocorreu formação organogênica. Na décima segunda semana de cultivo para explantes de raiz cultivados em meio MS e WPM tiveram alguns

tratamentos em que não houve resposta para formação de calos.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura com AIA sem a presença de BAP, não induzem a formação de calos.

Calos mononodulares são antecessores para organogênese indireta em Jacarandá da Bahia.

Explantos foliares cultivados durante 12 semanas em meio de cultura MS contendo 1 μ M AIA e 10 μ M BAP, são ideais para formação de novos brotos via organogênese indireta.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - Fapemig, pelas bolsas de Pesquisador na Empresa concedidas.

REFERÊNCIAS

BARBOZA, T. J. S.; LAGE, D. A.; MOSS, V. B.; SOUZA, C. A.; ALBARELO, N. **Efeito de diferentes meios nutritivos e fitorreguladores visando à otimização da calogênese de *Annona mucosa* (Jacq.)**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 16:905-911. 2014.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**. Colombo: Embrapa Informações Tecnológicas, 2003. 1035p.

DIAS, P. C.; OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; WENDLING, I. **Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil**. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo, v. 32, p. 72, p. 453-462, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 2002. 368 p.

MOTTE, H.; VEREECKE, D.; GEELLEN, D. WERBROUCK, S. **The molecular path to *in vitro* shoot regeneration**. Biotechnology Advances 32:107 – 121. 2014.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; SOARES, G.A.; SOARES, F.P.; CASTRO, A.H.F.; PAIVA, P.D.O. **Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermédia* A. Juss.)**. Revista Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.31, n.2, p.366-370, mar/abr., 2007.

ROCHA, S. C. da; QUIORIN, M. **Calogênese e rizogênese em explantes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro***. Revista Ciência

Florestal, Santa Maria, v.14, n.1, p.91-101. 2004.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; GUIMARÃES, M. C. M.; LIMA, R. A.; OLIVEIRA, C. L. L. G. **Callogenesis in leaves of Kalanchoe pinnata Lam. by 2,4-D and BA action.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 16:760-764. 2014.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society and Biological Engineers, 2009.

SUGIMOTO, K.; GORDON, S. P.; MEVEROWITZ, E.M. **Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?** Trends in Cell Biology, 2011.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas.** Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).