

Indução de calos embriogênicos em bastão do imperador *in vitro*

GABRIELEN GOMES DIAS^{1*}; PASQUAL, M.²; CARVALHO, A.C.P.P.³

¹Engenheira Agrônoma, Doutoranda da Pós-Graduação em Fitotecnia/Produção Vegetal, Universidade Federal de Lavras, UFLA. Lavras/MG. E-mail: gabriellen@gmail.com *Autor para correspondência

²Agrônomo, Professor Titular do Departamento de Fitotecnia, Setor de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, UFLA. Lavras/MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

³Bióloga, Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza/CE. E-mail: cristina@cnpat.embrapa.br

RESUMO

A espécie *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, popularmente conhecida como bastão do imperador, é uma planta ornamental com excelente potencial de comercialização. O método de propagação por divisão de rizomas produz pequeno número de mudas. Dessa maneira, protocolos visando à propagação massal *in vitro* dessa espécie, via embriogênese somática, surgem como importantes alternativas. Com o objetivo de obter calos embriogênicos de vários explantes, foram avaliadas diferentes auxinas e posições de inoculação. Foram avaliados rizomas com aproximadamente 0,5cm², obtidos a partir de mudas micropropagadas com três subcultivos, cortados longitudinalmente ao meio e inoculados em tubos de ensaio. Após inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento por 50 dias em tubos de ensaio com 15 mL de meio de cultura, a 25±2 °C, no escuro. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x2, representados por cinco auxinas (ANA; AIB; AIA; 2,4-D e picloram) na concentração de 10µM e uma testemunha (sem auxina) e duas posições do explante (H-horizontal e V-vertical). O experimento foi constituído de cinco repetições com três tubos, cada um contendo um explante. Após 50 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de oxidação e formação de calos. Os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$ e analisados, utilizando-se o programa SISVAR e as médias comparadas pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade. No meio de cultura acrescido de 2,4-D, todos os explantes formaram calos. Os explantes inoculados no meio de cultura contendo picloram não diferiram estatisticamente em relação à posição de inoculação dos explantes, os quais apresentaram 87% (V) e 80% (H) de calos. Para a porcentagem de oxidação, não houve diferença estatística entre os tratamentos; porém, naqueles adicionados de 2,4-D, ANA e AIA na posição vertical não foi constatada oxidação. Assim, o meio MS acrescido de 10µM de 2,4-D e o rizoma inoculado na posição vertical foram os que apresentaram maior porcentagem (100%) de indução de calos embriogênicos.

Palavras-chave: *Etilingera elatior*, *Calogênese in vitro*, Zingiberaceae.

ABSTRACT

Induction of embryogenic calluses in *in vitro* pink torch ginger

The species *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, popularly known as pink torch ginger, is an ornamental plant with an excellent commercialization potential. The propagation method by rhizome division produces a small number of seedlings. Therefore, protocols aiming at *in vitro* mass propagation of that species, via somatic embryogenesis, arise as important alternatives. With the purpose of obtaining embryogenic calluses of several explants, we evaluated different auxins and inoculation positions. We evaluated rhizomes with approximately 0.5 cm², obtained from plantlets micropropagated with three subcultures, longitudinally cut in half and inoculated into test tubes. After inoculation, the cultures were kept in a growth chamber for 50 days in test tubes with 15-mL of culture medium at 25±2 °C in the dark. We used the completely randomized

design, in a factorial scheme 6x2, represented by five auxins (ANA; AIB; AIA; 2,4-D and picloram) at the concentration of 10 μ M, a control (without auxin) and two explant positions (H-horizontal and V-vertical). The experiment consisted of five replicates with three tubes, each one containing one explant. After 50 days of cultivation, the percentage of oxidation and the callus formation were evaluated. The data were transformed to $\sqrt{x+0.5}$ and analyzed by using the SISVAR program, and the means were compared by the Skott-Knott test at 5% of probability. In the culture medium with the addition of 2,4-D, all the explants formed calluses. The explants inoculated in the culture medium containing picloram did not differ statistically in relation to the inoculation position of the explants, which presented 87% (V) and 80% (H) of calluses. For the percentage of oxidation, there were no statistical differences among the treatments, but in those with the addition of 2,4-D, ANA and AIA at the vertical position, oxidation was not observed. Therefore, the MS medium with the addition of 10 μ M of 2,4-D and the rhizome inoculated at the vertical position presented the highest percentage (100%) of induction of embryogenic calluses.

Keywords: *Etiligera elatior*, Callogenesis *in vitro*, Zingiberaceae.

INTRODUÇÃO

O Brasil se consolida no cenário mundial da floricultura, tanto na produção de espécies temperadas quanto em subtropicais. Acredita-se, porém, que é no desenvolvimento da floricultura tropical que o País apresenta suas mais promissoras possibilidades ecológicas, produtivas e comerciais, na consolidação e na comunicação internacional de uma marca e de estilo próprio de viver, produzir, consumir e exportar (TERAO et al., 2005).

Os produtos da floricultura tropical, geralmente classificados como exóticos e constituídos principalmente por helicônias, alpinias, bastões do imperador, costus, abacaxis ornamentais e sorvetões, entre outros, ocupam um nicho especial e ainda reduzido de mercado. No mercado internacional, essas flores são consideradas muito atraentes, dadas as suas diversidade de coloração e aparência pouco conhecida, em especial nos países europeus (TERAO et al., 2005).

As mudas de bastão do imperador são obtidas por propagação vegetativa, por divisão de touceiras ou seccionamento de rizomas (LAMAS, 2002).

Tais métodos de propagação, além de restringirem o número de mudas produzidas, podem ocasionar a disseminação de pragas e doenças, levando ao acúmulo de agentes patogênicos que são transmitidos entre plantios sucessivos.

Para contornar ou minimizar esse problema, tem sido sugerida a utilização da técnica de cultura de tecidos de meristemas e outros tecidos das plantas. Esta técnica tem mostrado ser uma forma rápida de multiplicar uma determinada espécie com características agrônômicas desejáveis, recuperando plantas livres de pragas e doenças e já tem se mostrado opção viável para algumas espécies da família Zingiberaceae (DEBIASE et al., 2004; MELLO et al., 2000; MICHELUZZI, 2004).

A embriogênese somática tem demonstrado ser o melhor método de multiplicação em grande escala. Trata-se de um processo característico das plantas vasculares, pelo qual células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação completa de uma planta, através de uma série de estágios embriogênicos similares àqueles observados em embriões zigóticos (RODRIGUEZ & WETZSTEIN, 1998; WILLIAMS & MAHESWARAN, 1986).

A indução de calos é o desencadeamento de um processo morfo genético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico. A indução envolve o controle da expressão gênica, embora não seja um fenômeno genético, pois não ocorre modificação alélica e/ou genotípica. Em cultura de tecidos a sinalização por um fitormônio ou regulador de crescimento é uma resposta específica a nível celular (GUERRA, 2001).

Características morfológicas de células embriogênicas podem ser observadas pela análise ultraestrutural, por meio de microscopia eletrônica de varredura, como descrito para *Heliconia chartacea* (ULISSES et al., 2010). Miachir et al. (2004), observaram a formação de calos em ápices de açafrão (*Curcuma zedoaria*) utilizando diferentes reguladores de crescimento.

Este tipo de microscopia tem sido descrita em muitos estudos com embriogênese somática, sendo adequado para análise da superfície das células, demonstrando aspectos tridimensionais da morfologia externa das mesmas.

Assim, o objetivo do trabalho foi induzir a formação de calos embriogênicos em bastão do imperador var. Porcelana, em função da posição de inoculação do explante e tipo de auxina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Como fonte de explantes, foram utilizadas mudas pré estabelecidas *in vitro e mantidas com três subcultivos*, a partir de meristemas caulinares de bastão do imperador *Etlingera elatior* (Jack) R. M. Smith var. Porcelana, cedidas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária) Agroindústria Tropical, localizada na cidade de Fortaleza, Ceará.

As mudas foram micropropagadas por subcultivos mensais, sob condições assépticas, em câmaras de fluxo horizontal. Após dois subcultivos sucessivos, a cada 30 dias, as culturas foram transferidas para o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 2,5 mg L⁻¹ de BAP e solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar (AgarGel) e pH ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Rizomas, com aproximadamente 0,5 cm, foram cortados ao meio e transferidos em duas posições (horizontal e vertical) para tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,0 g L⁻¹ de ágar (AgarGel), pH ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 °C, 1,1 atm durante 20 minutos. Ao meio de cultura, foram acrescentados os reguladores de crescimento, ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido 3-indolacético (AIA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropico-línico (picloram) na concentração de 10 μM e, ainda, um tratamento controle, sem adição de regulador de crescimento.

Após a inoculação, os tubos, contendo um explante cada, foram mantidos em sala de crescimento, a 25±2 °C, no escuro. A avaliação foi realizada 50 dias após inoculação, observando-se a porcentagem de explantes que oxidaram e formação de calos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x2, representados por cinco auxinas (ANA; AIB; AIA; 2,4-D e picloram) e uma testemunha (sem auxina) e duas posições do explante (H-horizontal e V-vertical). Os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, e as médias comparadas pelo teste Skott-Knott nos 5% de probabilidade, utilizando-se o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

Para o estudo da análise ultraestrutural, realizada em Maio de 2010 no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) na UFLA, calos de bastão do imperador com 50 dias de cultivo no escuro, foram fixados em solução de Karnovisk (pH = 7,2) por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M (três vezes), por um período de 10 minutos cada e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio 1% por 4 horas em temperatura ambiente.

Após este período, as amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida, foram desidratadas em gradiente de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% por três vezes), por 10 minutos e, posteriormente, por mais três vezes com 100% por 10 minutos cada.

Após a desidratação, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras de calos foram para o aparelho de ponto crítico CDP 0,30, por meio de CO₂ líquido e então, montadas em *stubs* para metalização com ouro. Os espécimes foram observados e

fotografados no Microscópio Eletrônico de Varredura (LEO Evo 40), operando entre 10 e 20 kV, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Para as análises citoquímicas, os calos selecionados provenientes do meio de indução 2,4-D e picloram foram corados com azul de Evans (0,1%) e carmim acético (2%) para visualização de pró-embrião somático (GUERRA & NODARI, 2006). Os calos foram observados e fotografados com o auxílio de um microscópio óptico, localizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve formação de calos quando os explantes foram mantidos em meio de cultura MS, sem a adição de regulador de crescimento e quando suplementados com AIB. Na ausência de regulador de crescimento, os explantes foram induzidos à proliferação de raízes e ao desenvolvimento de brotos apicais nos explantes. Essa tendência também foi observada nos tratamentos acrescidos de AIA.

No meio de cultura adicionado com 2,4-D, todos os explantes formaram calos, só nos tratamentos nos quais os explantes foram inoculados na posição vertical. Para os explantes inoculados na posição horizontal, apenas 53% formaram calos. Ao contrário, Miachir et al. (2004), trabalhando com açafreão (*Curcuma zedoaria*), não verificaram a indução de calos nos explantes testados ao utilizar somente 2,4-D no meio de cultura. Pode-se verificar quanto à posição dos explantes que para o tratamento acrescido com 2,4-D, a posição vertical foi mais favorável na formação de calos, obtendo 100%. Isto se deve provavelmente ao maior contato que a região meristemática do rizoma teve com o meio de cultura. Este comportamento também foi observado por Domingues et al. (1996) quando trabalharam com cultivares de bananeira (*Musa* spp.).

Os explantes inoculados no meio de cultura contendo picloram, não diferiram estatisticamente em relação à posição de inoculação, os quais apresentaram 86,66% (Vertical) e 80% (Horizontal) de calos. Já para os meios de cultura contendo 2,4-D e ANA, diferiram estatisticamente quanto à posição de inoculação do explante (Tabela 1). O picloram é usado para induzir e, ou, manter calos ou culturas de suspensão em plantas arbóreas, ou para induzir a formação de calos embriogênicos (GEORGE, 1993). Os calos induzidos com ANA apresentaram 67% de formação de calos, mas oxidaram com o passar do tempo de exposição ao meio de cultura.

TABELA 1. Interação para porcentagem de explantes com formação de calos em meio de cultura contendo diferentes tipos de auxinas e posições de inoculação do explante.

Fitorreguladores	Posição dos Explantes	
	Vertical	Horizontal
SEM AUXINA	0,00 cA	0,00 cA
AIB	0,00 cA	0,00 cA
AIA	6,66 cA	26,66 bA
ANA	39,99 bB	66,67 aA
PICLORAM	86,66 aA	80,00 aA
2,4-D	100,00 aA	53,33 aB
CV(%) = 18,14		

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade.

A variável coloração de calo tem sido utilizada como indicativo da capacidade regenerativa do material vegetal. Essa relação entre a coloração dos calos e a capacidade regenerativa foi observada por Warrag et al. (1991) e Hervé et al. (2001), como sendo resultante do efeito de diferentes concentrações de fitorreguladores. Pelas observações, os calos formados

foram de coloração branca, considerados calos responsivos e de textura friável (Figura 1). A calogênese ocorreu na região meristemática, devido aos cortes realizados nos explantes, que permitiram o contato desta região com o meio de cultura.

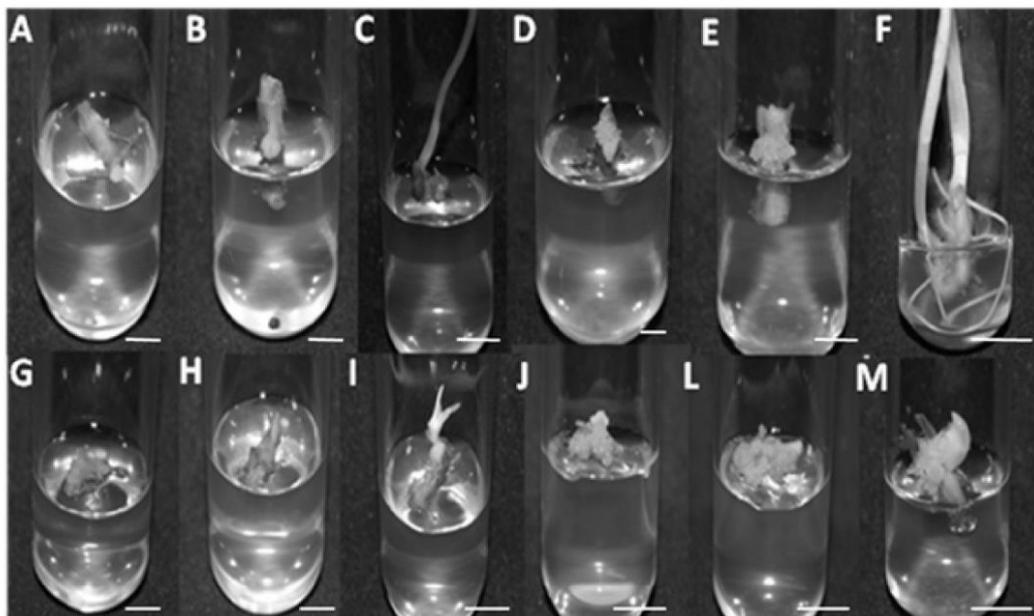


FIGURA 1 - Indução de calos em explantes de bastão do imperador, cultivados em duas posições, vertical (V) e horizontal (H), em meio de cultura contendo diferentes auxinas. A- ANA-V; B- AIB-V; C- AIA-V; D- 2,4-D-V; E- picloram-V; F- MS0-V; G- ANA-H; H-AIB-H; I- AIA-H; J- 2,4-D-H; L-picloram-H e M-MS0-H acrescidos de 10 μ M Barra: 1mm.

Um problema frequentemente encontrado no cultivo *in vitro* é o escurecimento (oxidação) dos tecidos lesionados do explante, causado pela liberação de compostos polifenólicos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Para a porcentagem de oxidação, não houve diferença estatística entre os tratamentos, porém os explantes mantidos no meio de cultura adicionado de 2,4-D, AIA e ANA, na posição vertical, não oxidaram (Tabela 2).

TABELA 2. Interação para porcentagem de explantes oxidados em meio de cultura contendo diferentes tipos de auxinas e posições do explante*.

Fitorreguladores	Posição dos Explantes	
	Vertical	Horizontal
SEM AUXINA	13,33 aA	26,66 aA
AIB	13,33 aA	13,33 aA
AIA	0,00 aA	6,66 aA
ANA	0,00 aA	6,66 aA
PICLORAM	13,33 aA	6,66 aA
2,4-D	0,00 aA	6,66 aA
CV(%) = 28.23		

*Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, em 5% de probabilidade.

As observações em Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram que para todos os tratamentos, exceto os meios sem adição de auxinas e AIB, onde era possível a distinção de regiões em organização esférica, apresentando células com formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular (Figura 2 A, B, C e D), o que segundo Appezzato-da-Glória & Carmelo-Guerreiro (2003), é característico de células meristemáticas.

Os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (TOMES, 1985).

Foram verificadas estruturas semelhantes a embriões somáticos no estágio globular nos calos cultivados em meio contendo 10 μ M de 2,4-D e picloram (Figura 2 A e D).

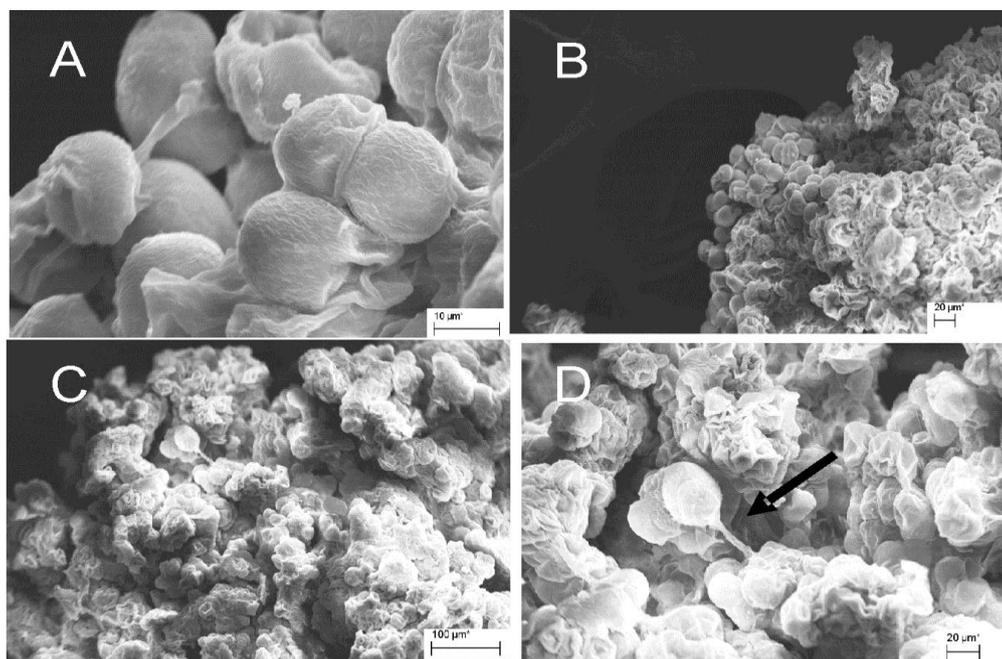


FIGURA 2 - Eletromicrografias de varredura de células de calos de bastão do imperador. A) Calos formados nos explantes, inoculados na posição vertical, mantidos no tratamento com 2,4-D em formato arredondado, B) Estruturas globulares, observadas em calos obtidos no tratamento com 2,4-D, C) Estrutura com aspecto de embrião somático no estágio globular visto de cima e D) Estrutura com aspecto de embrião somático no estágio globular ligado por estruturas semelhantes a um suspensor (seta preta).

A morfologia celular isodiamétrica, observada nos calos induzidos a partir de rizomas neste trabalho, foi semelhante a das células de calos de *Heliconia chartaceae*, para as quais a combinação entre 2,4-D e AIA induziu a formação de calos friáveis com competência embriogênica (ULISSES et al., 2010).

O teste com carmim confirmou a ocorrência de células pró-embriogênicas na massa de calos. Evidenciou que células de calos induzidos a partir de rizomas apresentaram reação positiva ao corante carmim. A reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular (STEINER et al., 2005).

CONCLUSÕES

A indução de calos a partir do cultivo *in vitro* de secções de rizoma de bastão do imperador em meio MS, foi possível mediante a adição de diversas auxinas estudadas.

Maior percentagem de indução de calos ocorreu em segmento de rizoma inoculado na posição vertical, em meio MS acrescido de 10 μ M de 2,4-D e picloram.

Explantes de segmentos de rizomas de bastão do imperador, cultivados *in vitro* apresentam potencial morfogenético para futura formação de embriões somáticos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de auxílio e financiamentos. A EMBRAPA Agroindústria Tropical, pelo material vegetal cedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.
- DEBIASE, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F.C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v.10, n.1, p.61-65, jan./mar. 2004.
- DOMINGUES, E.T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B.M.J. Indução de estruturas embriogênicas em tecidos de rizoma e pseudocaule de bananeira. **Bragantia**, Campinas, v.55, n.1, p.1-8, 1996.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR 5.3. Sistema de análise estatística**. Lavras: UFLA, 2000. 1 CD-ROM.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 6. ed. Hants: Exegetics, 1993. v.1, 575p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics, 1984. 709 p.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: UFSC/CCA, 2006. 41p.
- GUERRA, M. P. **Protocolo para visualização de pró-embrião somático**. Florianópolis: UFSC, 2001. 35 p.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J.N.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of the elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v.161, n.4, p.645-653, 2001.
- JONA, R. Tissue culture of selected tropical fruit plants: handbook on the application of tissue culture to plant propagation. **FAO Plant Production and Protection Paper**, Roma, v. 79, p. 120-124, 1987.
- LAMAS, A. M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 86 p. (Série Empreendedor, 5).
- MELLO, M.O.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Quantifying the micropropagation of *Curcuma zeroaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.703-707, 2000.
- MIACHIR, J.I.; MELO, M.; CROCOMO, O.J.; ROMANI, V.L.; AMARAL, A.F.C. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoria* Roscoe. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, n.4, p.427-432, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.25, n.3, p.473-497, 1962.
- RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenesis cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Protoplasma**, New York, v.204, n.1/2, p.71-83, 1998.

STEINER, N.; VIEIRA, F.N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M.. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, Curitiba, v.48, n.6, p.895-903, 2005.

TERAO, D.; CARVALHO, A.C.P.P. ; BARROSO, T.C.S. **Flores tropicais**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. 225 p.

TOMES, D.T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, Rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.). **Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture**. Boston: Nijhoff/Junk, 1985. p.175-203.

ULISSES, C., CÂMARA, T. R., WILLADINO, L., ALBURQUERQUE, C. C.de, BRITO, J. Z. de. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.1, p.11-18, 2010.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.9, n.10, p.586-589, 1991.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, London, v.57, n.4, p.443-462, 1986.