

EFEITO DE 2,4-D E ANA NA FORMAÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE LICHIEIRA¹

Alessandro Carlos Mesquita²

Renato Paiva³

Edson José Artiaga de Santiago⁴

Patrícia Duarte de Oliveira Paiva⁵

Luciano Vilela Paiva⁶

Guilherme Augusto Canella Gomes⁷

Cíntia Guimarães dos Santos⁸

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer, *in vitro*, explantes foliares de lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.). Segmentos foliares foram inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D e ANA e mantidos em sala de crescimento com luz. A maior produção de calos foi obtida inoculando-se segmentos foliares com 2,0 e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Além de induzir calogênese, o uso de 4,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de ANA também induziu à formação de raízes adventícias diretamente nos segmentos foliares. A curva de crescimento de calos apresentou comportamento sigmoidal, porém apenas os calos desenvolvidos na presença de luz e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentaram cinco fases distintas

¹ Aceito para publicação em 24.06.2003. Parte da dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, pelo primeiro autor, para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal.

² Universidade Federal de Lavras, Dep. Biologia, Cx. P. 37, 37200-000, Lavras, MG.

³ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep. de Biologia, Cx. P. 37, 37200-000, Lavras, MG. E-mail: renpaiva@ufla.br

⁴ Doutorando em Agronomia/Fitotecnia (UFLA), Cx. Postal 37; 37200-000, Lavras, MG, e EMBRAPA/Amazônia Oriental, Cx. P. 48, 66095-100, Belém, PA. E-mail: artiaga@cpatu.embrapa.br

⁵ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep. de Agricultura, Cx. P. 37, 37200-000, Lavras, MG. E-mail: pdolivei@ufla.br

⁶ Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep. de Química, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG. E-mail: luciano@ufla.br

⁷ Doutorando em Agronomia/Fitotecnia (UFLA), Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG.

⁸ Bolsista de Apoio Técnico à Pesquisa pela FAPEMIG, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep. de Biologia, Cx. Postal 37, 37200-000, Lavras, MG.

(lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária). Os resultados também indicam que o subcultivo dos calos deve ser efetuado aos 63 dias após a incubação dos explantes.

Palavras-chave: *Litchi chinensis*, propagação *in vitro*.

ABSTRACT

EFFECT OF 2,4-D AND NAA ON CALLUS FORMATION IN LITCHI LEAF EXPLANTS

The objective of this work was to establish *in vitro* leaf explants of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Leaf explants were inoculated in MS medium containing different concentrations of 2,4-D and NAA and maintained in a growth room in the presence of light. Higher production of callus was obtained by inoculating leaf segments in the presence of 2.0 and 6.0 mg L⁻¹ 2,4-D. Besides the induction of calogenesis, the use of 4.0 and 6.0 mg L⁻¹ NAA also induced the formation of adventitious root on explants. The callus growth curve showed a sigmoid shape and only callus developed in the presence of light and 6.0 mg L⁻¹ 2,4-D presented five distinct developmental phases (lag, exponential, linear, deceleration and stationary). The results also indicated that medium replacement should be performed 63 days after explant inoculation.

Key words: *Litchi chinensis*, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.) é uma frutífera que apresenta frutos de bela aparência, além do alto valor nutritivo, sabor e aroma agradáveis (4). O consumo é variado, podendo ser encontrado *in natura* ou em conservas (1, 7). Embora o cultivo no Brasil ocorra há muitos anos, o interesse dos consumidores brasileiros pelos frutos é um fato recente.

A propagação da lichieira pode ser realizada tanto pelo processo assexuado quanto sexuado. Comercialmente, a lichieira é propagada assexuadamente, via alporquia (9), procedimento este que apresenta rendimento relativamente baixo, produzindo pequeno número de mudas por planta-matriz.

O sucesso do cultivo dessa frutífera depende de processos mais viáveis de produção de mudas. A propagação pelos cultivos *in vitro*, por exemplo, pode ser utilizada como um processo alternativo, visando, por meio de suas técnicas, a obtenção de um grande número de mudas a um custo acessível.

O objetivo deste trabalho foi determinar uma metodologia para a indução de calogênese em segmentos foliares de lichieira, visando à posterior obtenção *in vitro* de mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas extraídas de plântulas de lichieira foram utilizadas como fonte de explante. Para a desinfestação, folhas jovens foram imersas em álcool etílico 70% (v/v) por 15 segundos e em hipoclorito de sódio 1% (v/v de i.a.) por 10 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada.

Segmentos foliares com aproximadamente 1 cm² destituídos da nervura central foram utilizados como explantes. Estes foram cultivados em meio constituído dos elementos minerais de MS (5), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. A este meio foram adicionados, ainda, 0; 2; 4; 6 e 8 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou ANA (ácido naftalenoacético). O ágar, previamente fundido, foi incorporado ao meio de cultivo após o ajuste do pH a 5.8. Os meios de cultivo foram distribuídos em alíquotas de aproximadamente 15 mL em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, sendo em seguida tapados com tampa transparente de polipropeno e, subseqüentemente, autoclavados a 121°C, durante 25 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os explantes, um por tubo de ensaio, foram inoculados no meio de cultura. Os tubos de ensaio foram vedados com filme transparente de PVC (Rolopac®) e transferidos para a sala de crescimento, apresentando temperatura de aproximadamente 27°C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 35 µmoles m⁻² s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes de 20 Wats (Osram®, luz do dia especial). O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de quatro tubos de ensaio inoculados com um explante por tubo. A formação de calos foi observada em intervalos de sete dias após a incubação, por um período de 35 dias.

Para a obtenção da curva de crescimento dos calos, os explantes foram cultivados como descrito, exceto que o meio de cultura apresentava 2,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e, na sala de crescimento, os tratamentos, além de serem mantidos no fotoperíodo e irradiância descritos, foram mantidos em condições de escuro contínuo, não alterando a temperatura e umidade relativa. Em intervalos de sete dias (durante 77 dias), os calos foram pesados em balança de precisão. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo a pesagem composta pela média de 12 repetições.

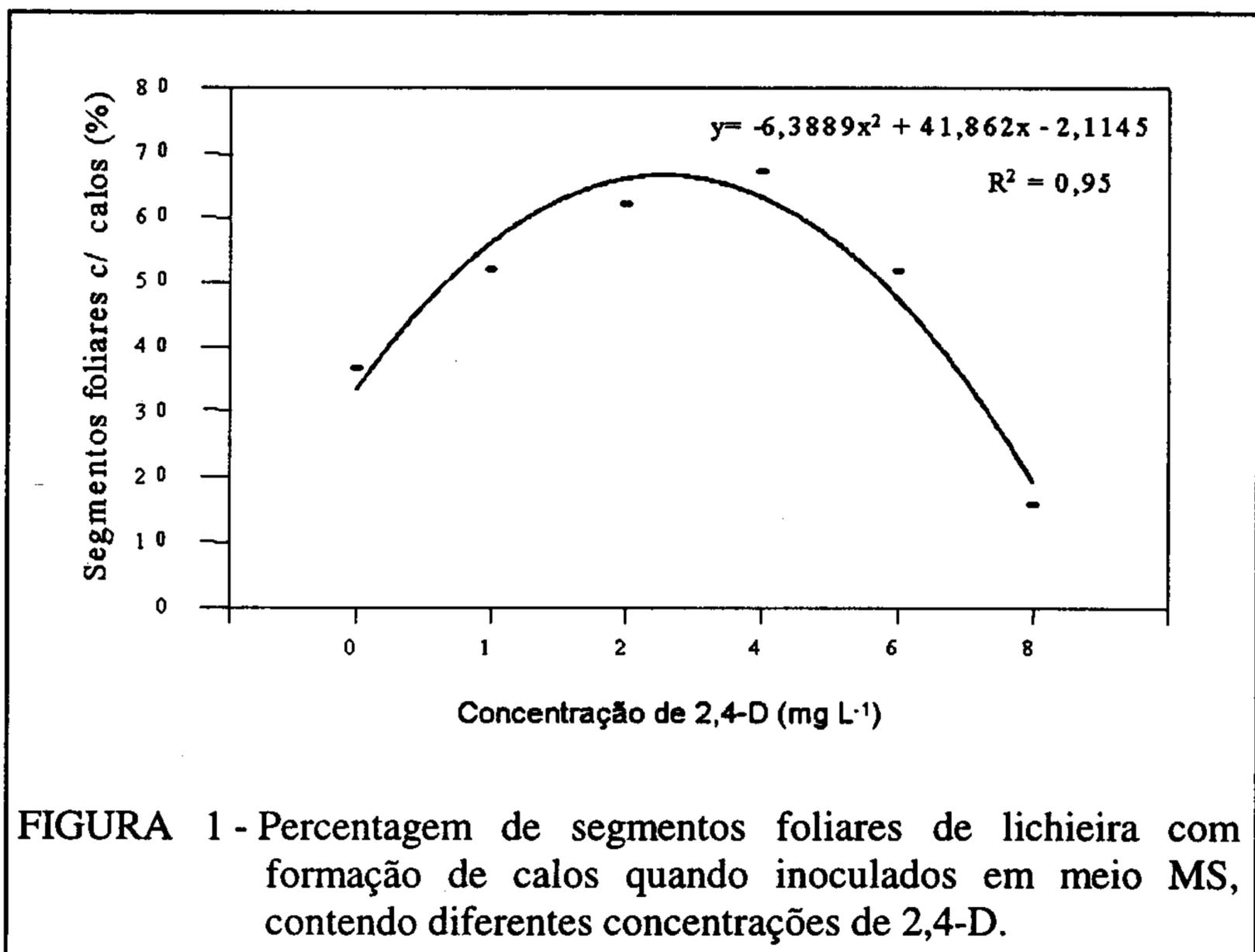
O percentual de crescimento dos calos foi determinado pela equação:

$$\% \text{ de crescimento} = \frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100$$

em que: Pi = peso inicial e Pf = peso final de calos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na ausência de 2,4-D, foi observada a formação de calos em apenas 35% dos explantes inoculados (Figura 1). Embora o uso de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D tenha proporcionado a formação de calos em maior número de explantes (65%), eles eram de tamanho bastante reduzido. Calos de maior tamanho foram obtidos quando se adicionaram ao meio de cultivo concentrações de 2,0 e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Mesmo sendo observada redução no número de explantes que formaram calos (51%), o uso de 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D proporcionou calos maiores. O uso de concentração elevada (8,0 mg L⁻¹) reduziu o número de explantes com formação de calos e o tamanho dos calos.



Segundo Pasqual et al. (6), a auxina mais empregada para iniciar a calogênese é o 2,4-D. Serra et al. (11) também obtiveram a formação de calos em segmentos foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), adicionando ao meio MS, 2,4-D em combinação com BAP. O uso de 2,4-D, isoladamente, ou em combinação com BAP ou TDZ, também induziu à formação de calos em explantes foliares de *Smilax japecanga* (8). A indução de formação de calos também já foi observada em segmentos foliares de cafeeiro (*Coffea arabica*) inoculados em meio MS contendo 2,4-D (2).

A influência do ANA na formação de calos, em explantes foliares de lichieira, está apresentada na Figura 2. Apenas 14,0% dos explantes formaram calos, quando inoculados em meios com ausência de ANA. O uso de 4,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de ANA proporcionou calogênese em, aproximadamente, 32% dos explantes. Não houve diferença significativa no número de segmentos apresentando calos, quando estes foram inoculados em meios contendo 2,0 ou 8,0 mg L⁻¹ de ANA.

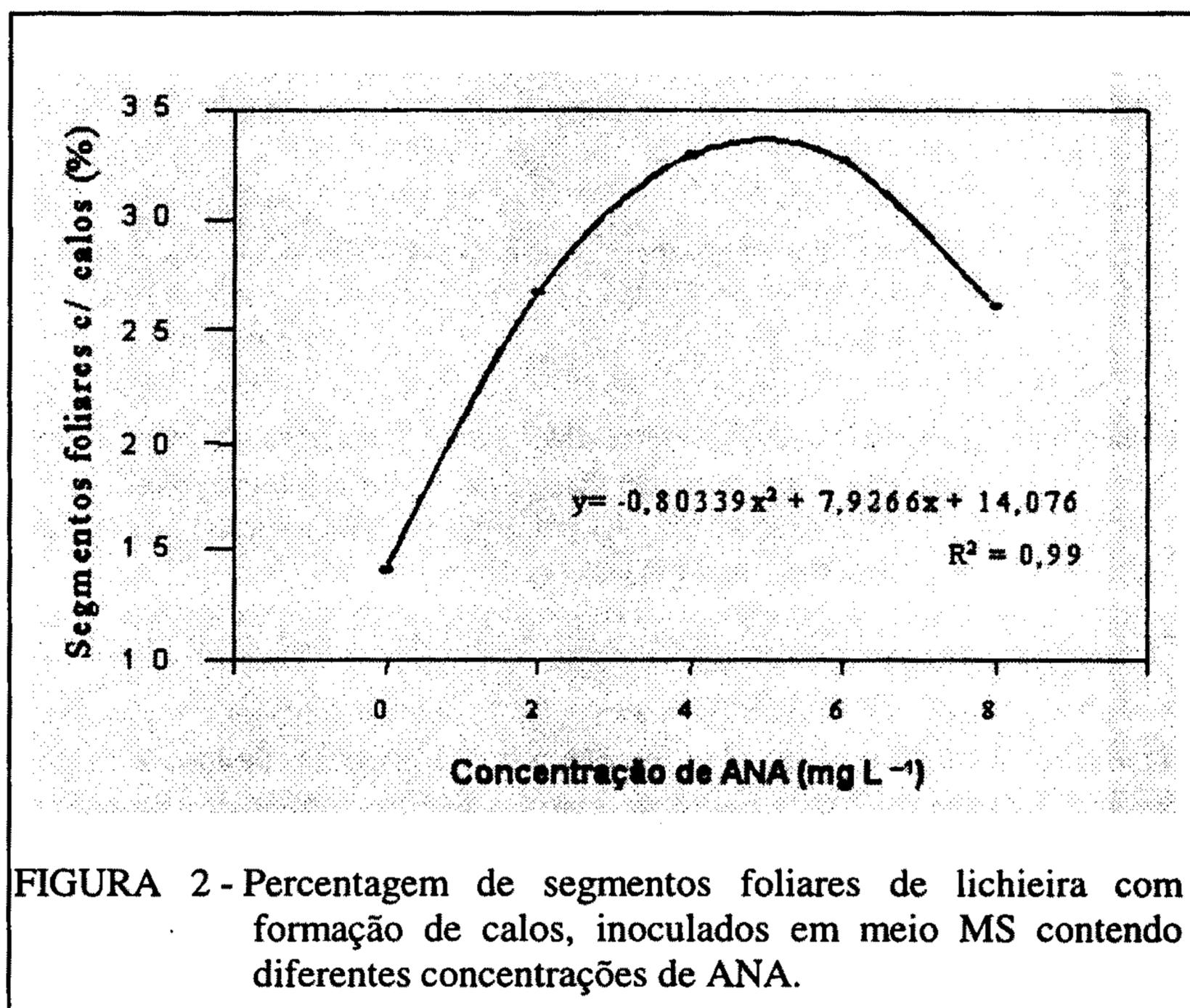


FIGURA 2 - Percentagem de segmentos foliares de lichieira com formação de calos, inoculados em meio MS contendo diferentes concentrações de ANA.

Além de induzir calogênese, o uso de 4,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de ANA também induziu à formação de raízes adventícias diretamente nos segmentos foliares. Segundo Torres e Caldas (14), além de induzir calogênese em explantes, concentrações elevadas de auxinas podem também favorecer o enraizamento. Indução de calogênese e formação de raízes também foram observadas em segmentos foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) inoculados em meios contendo ANA (3).

As curvas de crescimento de calos obtidos a partir de explantes foliares, inoculados em meio MS contendo 2,0 e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, com ou sem luz, são apresentadas na Figura 3.

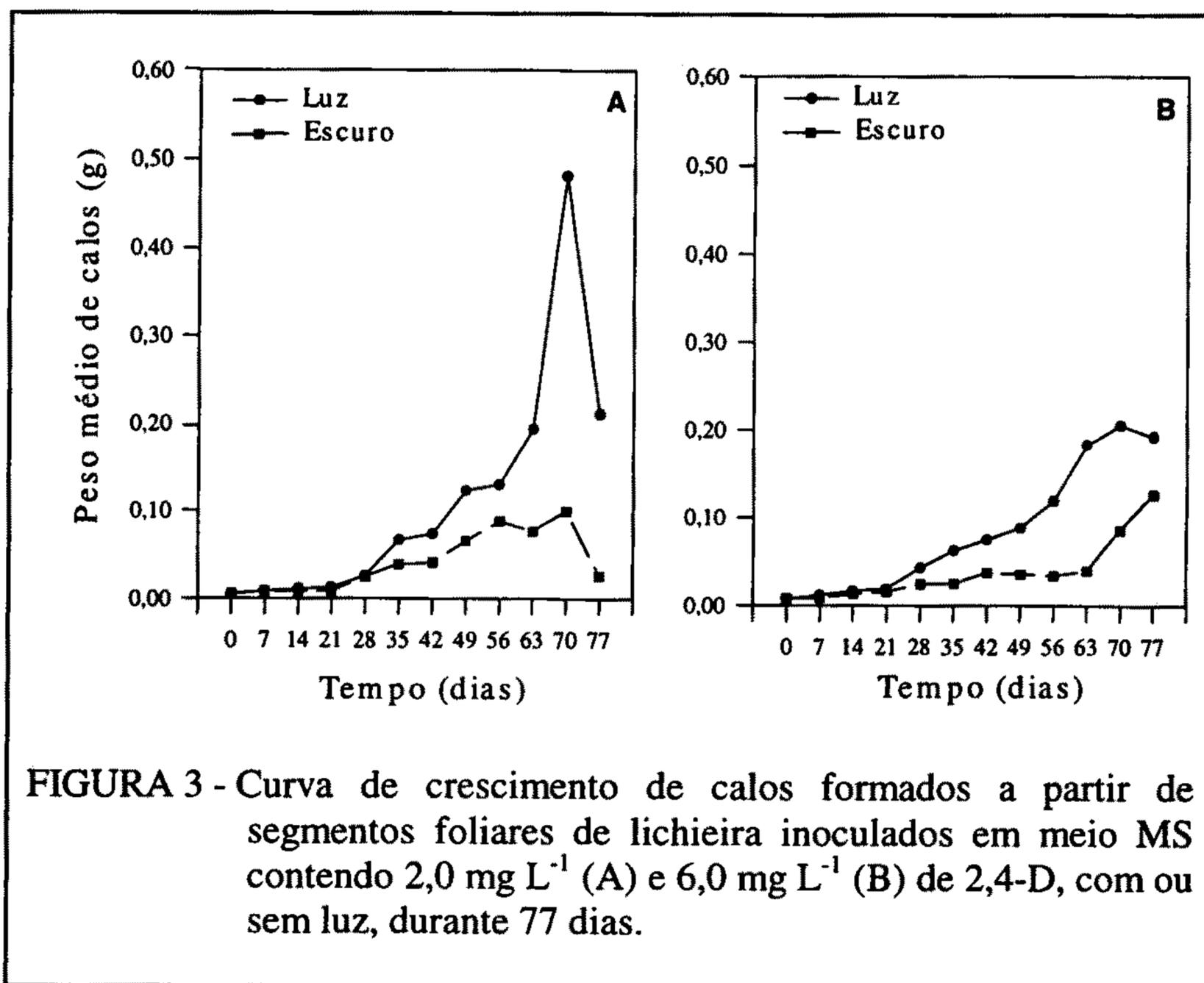


FIGURA 3 - Curva de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de lichieira inoculados em meio MS contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (A) e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ (B) de 2,4-D, com ou sem luz, durante 77 dias.

Observa-se, na Figura 3, a ocorrência de crescimento sigmoidal, indicando distintas fases de crescimento nos tratamentos. Segundo Santos et al. (8), a curva de crescimento de calos, obtidos a partir de segmentos foliares de *Smilax japecanga*, apresenta padrão sigmóide, com cinco fases distintas, predizendo o subcultivo dos calos entre o 36° e 39° dia após a incubação dos explantes.

A fase lag, na qual células do explante preparam-se para a divisão celular e produção de energia, ocorreu até o 21° dia de incubação, em ambos os tratamentos (Figuras 3A e 3B), apresentando maior crescimento de calos (98%) na ausência de luz e com $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Landa et al. (3) verificaram que, em calos obtidos a partir de segmentos foliares de pequi, a referida fase ocorre até o 7° dia após a incubação.

Segundo Shimizu et al. (12) e Scragg e Allan (10), a fase lag caracteriza-se, principalmente, pelo acúmulo de energia, e a fase exponencial, pela divisão celular e síntese de biomassa. A fase de crescimento exponencial, neste trabalho, ocorreu entre o 21° e 49° dia após a incubação. Neste período, o maior crescimento de calos (89%) foi obtido na presença de luz e de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Santos et al. (8) observaram ocorrência dessa fase entre o 16° e o 35° dia de incubação, em calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Annona glabra*. Em segmentos

foliares de pequizeiro, essa fase foi observada entre o 7º e o 35º dia após a incubação (3).

Entre o 49º e 63º dias após a incubação, ocorreu o período de crescimento linear, fase em que os calos diminuem a taxa de divisão celular e aumentam a área celular. Nessa fase, a maior taxa de crescimento de calos (52%) ocorreu na presença de luz e em meio contendo 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Segundo Smith (13), o crescimento e o desenvolvimento celular nessa fase são mais evidentes.

O período de desaceleração ocorreu entre o 63º e o 77º dia após a incubação. Segundo Smith (13), nesse período, as culturas devem ser transferidas para um meio de cultura novo, devido à redução de nutrientes, desidratação do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas. Landa et al. (3) verificaram a ocorrência dessa fase entre o 46º e o 49º dias, em calos obtidos de segmentos foliares de pequizeiro.

A quinta fase, correspondente à fase estacionária, foi observada a partir do 70º dia após a incubação, apenas em calos obtidos em meio contendo 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e mantidos na presença de luz. Segundo Landa et al. (3), essa fase caracteriza-se pela ausência de divisão celular e síntese de biomassa, sendo observada em calos de pequizeiro, aproximadamente 50 dias após a incubação.

Os resultados da curva de crescimento indicam que a repicagem dos calos, formados a partir de segmentos foliares de plantas jovens de lichieira, deve ser efetuada no início do período de desaceleração, ou seja, aos 63 dias após a incubação, exceto em calos obtidos em meio contendo 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e mantidos no escuro (Figura 3B). Durante o período de avaliação, não foi observada a ocorrência da fase de desaceleração, em calos obtidos em meio suplementado com 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e mantidos no escuro.

O processo calogênico foi superior quando os explantes foram cultivados em meio contendo 2,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e inoculados à luz. Segundo Pasqual et. al. (6), em geral, o crescimento e a morfogênese *in vitro* são influenciados pelo comprimento de onda, densidade de fluxo e fotoperíodo. Estes fatores, apesar de serem considerados limitantes para o desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies, as divisões iniciais das células e a formação de calos, podem ser inibidos pela luz.

CONCLUSÕES

1) Calos de maior tamanho formam-se em segmentos foliares de plântulas jovens de lichieira, quando cultivados em meios contendo 2,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e incubados à luz.

2) O uso de 4,0 ou 6,0 mg L⁻¹ de ANA, além de induzir calogênese, também induz à formação de raízes adventícias diretamente nos segmentos foliares.

3) Os calos, a partir de explantes foliares inoculados à luz ou no escuro, em meios contendo 2,0 e 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, apresentam curva de crescimento sigmoidal.

4) O subcultivo dos calos de lichieira obtidos de segmentos foliares deve ser realizado aos 63 dias após a incubação dos explantes.

REFERÊNCIAS

1. CHAN, H.T. & KWOK, S.C.M. Non-volatile acids in lychee. *Journal of Food Science*, 39: 792-3, 1974.
2. FORNI, R.C. & PASQUAL, M. Influência da citocinina (BAP) e concentrações dos componentes do meio MS na micropropagação do café Catuai. *Ciência e Agrotecnologia*, 20: 468-74, 1996.
3. LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. & BUENO FILHO, J.S.S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24 (edição especial): 56-63, 2000.
4. MARTINS, A.B.G. Cultura da lichia. In: Donadio, L.C.; Martins A.B.G. & Valente, J.P. (eds.). *Fruticultura Tropical*. Jaboticabal, FUNEP, 1992. 282p.
5. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97, 1962
6. PASQUAL, M.; HOFFMANN, A. & RAMOS, J.D. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações. Lavras, UFLA/FAEPE, 1997. 159p.
7. PAUL, R.E.; CHEN, N.J.; DEPUTY, J.; HUANG, H.; CHENG, G. & GAO, F. Litchi growth and compositional changes during fruit development. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 109: 817-21, 1984.
8. SANTOS, M.R.A.; PAIVA, R. & BENDADIS, A.K. Cultura de tecidos de *Smilax japecanga* Grisebach: indução e crescimento de calos. *Ciência Agronômica*, 28: 37-43, 1997.
9. SAUCO, V.G. & MENINI, U.G. Litchi cultivation. Roma, FAO, 1989. 136p.
10. SCRAGG, A.H. & ALLAN, E.J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants*. IV. Berlin, Springer-Verlag, 1993. p.249-68.
11. SERRA, A.G.P.; PAIVA, R. & PAIVA, P.D.O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciência e Agrotecnologia*, 24: 833-40, 2000.
12. SHIMIZU, T.; CLITTO, A.; KOMAMINE, A. & FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplatanus* (sycamore) cells in batch suspension culture. *Physiologia Plantarum*, 40: 125-9, 1977.

13. SMITH, R.M. Plant tissue culture: techniques and experiments. San Diego, Academic Press, 1992. 171p.
14. TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990. 433p.