

CALOGÊNESE EM PLÂNTULAS DE FIGUEIRA

Ester Alice Ferreira¹
Moacir Pasqual²
Juliana Costa de Rezende²

RESUMO

Este ensaio objetivou estudar a calogênese em figueira, cv. Roxo de Valinhos. Em todos os experimentos, foi usado o meio nutritivo MS modificado para a indução de calos. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. As avaliações realizadas após 60 dias de inoculação, consideraram os parâmetros intensidade de crescimento e massa fresca de calos. No primeiro experimento, testaram-se dois tipos de explantes: segmento foliar e segmento caulinar, com 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mgL⁻¹ de 2,4-D adicionados ao meio. Os segmentos foliares se mostraram mais eficientes na indução da calogênese e passaram a ser os mais usados nos demais experimentos. No segundo, foi verificada a formação de calos na presença ou na ausência de luminosidade, nas mesmas doses de 2,4-D. No terceiro e último experimento, buscou-se uma otimização do protocolo, testando-se as mesmas doses de 2,4-D em combinação com cinetina na presença de luz. Os resultados obtidos mostraram que a calogênese em figueira ‘Roxo de Valinhos’ é melhor estimulada pela utilização de segmentos foliares, em ausência de luminosidade, adicionando 2,4-D e cinetina ao meio, ambos na concentração 4 mg L⁻¹.

Palavras-chave: 2,4-D, cinetina, variação somaclonal.

ABSTRACT

CALLOGENESIS IN FIG PLANTLETS

This work aimed to study the callogenesis process in plantlets of fig cultivar ‘Roxo de Valinhos’. MS medium modified for callus induction was used in all experiments. The experiments were arranged in a randomized design in factorial scheme. Evaluation was carried out at 60 days after the inoculation including the following parameters: growth intensity and callus fresh weight. In the first experiment 2 types of explants were tested: leaves and stem segments with 0, 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 mgL⁻¹ of 2,4-D added to the medium. The first experiment showed that leaf segments were more efficient to produce calli and were adopted as explant in the others experiments. The second experiment evaluated callus induction in presence and absence of light with the same 2,4-D doses. The third and last experiment sought a protocol optimization by testing the same 2,4-D doses together with kinetin, using leaf segments as explants in the presence of light. The results showed that callogenesis in fig cultivar ‘Roxo de Valinhos’ is more efficiently induced in leaf explants, in the light adding 2,4-D together with 4 mgL⁻¹ kinetin to the medium.

Key words: growth regulators, breeding

¹ EPAMIG CTP Cx. P. 351. E-mail ester@epamig.br

² DAG UFLA CP.3037 E-mail mpasqual@ufla.br; juliana_ufla@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

No Brasil, somente o cultivar Roxo de Valinhos (*Ficus carica* L.) é plantado comercialmente. Embora apresente alto vigor, rusticidade, boa produtividade e grande aceitação, o referida cultivar apresenta algumas características que podem colocar em risco a atual produção e ainda comprometer a expansão para novas áreas, destacando-se a susceptibilidade ao vírus do mosaico e aos nematóides das galhas e do cisto, que constituem um dos principais problemas da cultura.

Os programas de melhoramento de figueira por métodos convencionais são praticamente inexistentes no Brasil. A pouca variabilidade genética e a dificuldade de obtenção de plantas oriundas de fusão gamética, por não ser encontrada a vespa da espécie *Blastophaga psenes*, responsável pela polinização natural, são os principais entraves encontrados pelos melhoristas (Tulman-Neto et al., 1999).

A biotecnologia destaca-se como uma alternativa que vem auxiliando significativamente os programas de melhoramento genético pela engenharia genética, biologia molecular e cultura de tecidos. Nessa última, são observadas variações entre os tecidos cultivados *in vitro* e a variação somaclonal, que constitui uma fonte adicional de variabilidade (Larkin & Scowcrof, 1981).

O material inicial para variação somaclonal pode ser obtido por meio da calogênese (Evans & Sharp, 1986). Há relatos de que plantas regeneradas a partir de calos apresentam altas taxas de variação genética, que podem ser herdáveis e transmitidas aos descendentes (Handro & Floh, 1990). Os calos, massa de células a partir de um explante, dão suporte aos programas de melhoramento genético na produção de células para manipulações genéticas, como a hibridação somática e a poliploidização. Essa variação em plantas obtidas na calogênese pode chegar até próximo de 100% das plantas, com alguma alteração, dependendo da espécie, da metodologia empregada.

A calogênese é influenciada pelo genótipo, pelo tipo de explante, pela constituição do meio cultura e pelo ambiente de cultivo. Considerando a influência do explante, é recomendada a utilização daqueles que contêm maior proporção de tecido meristemático, ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado, 1990).

A auxina, quando adicionada ao meio em quantidades excessivas, estimula a produção de calos, embora a calogênese ocorra mesmo em baixas concentrações (Grattapaglia & Machado, 1990). Dentre as auxinas mais utilizadas, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem sido largamente empregado em estudos envolvendo calogênese em espécies frutíferas, como banana (Tulman-Neto et al., 1999), maçã (Fortes, 1992), alguns cultivares de *Coffea arabica* L. (Maciel, 2001; Palú, 2002; Araújo, 2004) em plantas medicinais (Artiaga 2004) e, ainda, em espécies florestais de importância econômica, como *Croton urucana* (Lima, 2004).

A formação de calos, normalmente, ocorre no escuro (Camargo et al., 1999), pois a luz pode favorecer a produção de compostos fenólicos que podem comprometer a divisão celular. Entretanto, há relatos de algumas espécies em que a formação de calos foi indiferente à luminosidade (Faria, 1996).

No caso da figueira, a definição de uma metodologia para obtenção de calos com vistas à obtenção de somaclones pode ser uma ferramenta valiosa para o melhoramento da espécie. Isso devido ao fato de somente o cultivar Roxo de Valinhos ser plantado comercialmente no Brasil e também pela escassez de programas de melhoramento pelos métodos convencionais.

Assim, este ensaio teve como objetivo realizar estudos relacionados à indução de calos em figueira, avaliando diferentes tipos de explantes e condições ambientais em combinação com diferentes doses de 2,4-D e cinetina.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras, utilizando plântulas de figueira, cultivar Roxo de Valinhos preestabelecidos *in vitro*, onde foram conduzidos três experimentos, descritos a seguir.

Experimento 1 – foram testados dois tipos de explantes: segmento caulinar com, aproximadamente, 1 cm de comprimento e segmentos de discos foliares com quase 0,5 cm de diâmetro e 2,4-D, nas doses 0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mgL⁻¹. O delineamento usado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5, explantes e doses, respectivamente.

Experimento 2 – a partir do resultado do experimento 1, segmentos foliares circulares com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram avaliados em dois tipos de ambientes: com e sem luminosidade, combinados com as mesmas doses de 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mgL⁻¹). A intensidade luminosa utilizada foi 32 µmol.m⁻².s⁻¹; o fotoperíodo foi de 16 horas; a temperatura foi mantida em aproximadamente 25±1°C. O delineamento usado neste experimento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2, sendo os fatores doses de 2,4-D x ambiente (exposição à luz).

Experimento 3 – utilizaram-se segmentos foliares cultivados em sala de crescimento com temperatura de aproximadamente 25±1°C, fotoperíodo de 16 horas e 32 µmol.m⁻².s⁻¹ de intensidade luminosa. Foram testados meios contendo combinações de 2,4-D e cinetina nas doses 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mgL⁻¹ em esquema fatorial 5x5, seguindo delineamento experimental inteiramente casualizado.

O meio de cultura usado em todos os experimentos foi MS (20) modificado para a indução de calos (3), acrescido de 600 mgL⁻¹ de ácido ascórbico. O pH foi ajustado para 5,7+0,1, antes da autoclavagem a 120°C e 1,2 atm, durante 20 minutos. A inoculação dos explantes em seus respectivos experimentos foi realizada em câmara de fluxo laminar, utilizando tubos de ensaio contendo 15 mL do meio nutritivo.

Todos os experimentos foram conduzidos com 4 repetições, contendo 3 plantas por parcela, 60 dias após a inoculação. Foram avaliadas as características massa fresca de calos (g) e intensidade de crescimento de calos, atribuindo-se notas de 0 a 3, com o seguinte critério: 0 - sem formação de calo; 1 - 25% de calos na superfície do tubo; 2 - 50%; 3 > 50% de calos a superfície do tubo (Flores, 1998) (Figura 1).

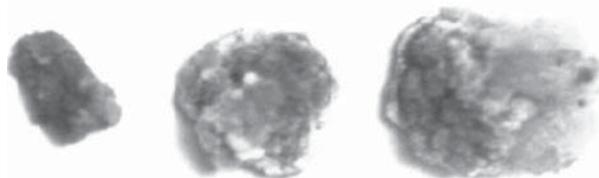


Figura 1. Notas atribuídas à intensidade de crescimento de calos de figueira, provenientes de diferentes explantes, ambiente de cultivo e concentrações de 2,4-D e cinetina.

Foram realizadas também avaliações visuais semanalmente com o objetivo de registrar o início da formação de calos e acompanhar o seu aspecto visual.

Os dados foram analisados por meio de regressão polinomial, utilizando-se o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

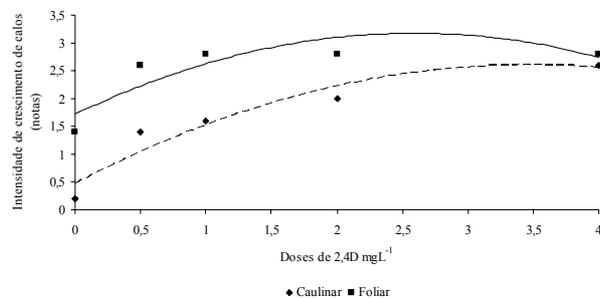
Observou-se formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isentos de auxinas 2,4-D (Experimentos 1 e 2) e cinetina (Experimento 3). A eficiência do 2,4-D na indução de calos, ainda que isoladamente, concorda com os resultados obtidos por Berthouly & Michaux-Ferriere (1996), que relatam a indução da calogênese em meios com concentrações elevadas de 2,4-D e também em baixas concentrações. Por essa razão, o 2,4-D é considerado um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos.

Experimento 1 - Tipos de explantes x 2,4-D

A formação dos calos neste experimento ocorreu entre 25 e 35 dias após a inoculação, para ambos os explantes testados. Na literatura, há relato de grande variação no tempo de início de formação de calos, que pode ocorrer em semanas ou até em 6 meses após a inoculação (Verdeil et al., 1994). Essa variação ocorre em função do explante, do local de incubação e, principalmente, da espécie utilizada.

Nas Figuras 2 e 3, que representam a intensidade de crescimento e acúmulo de massa fresca de calos, respectivamente, observa-se que o uso de segmento foliar se mostrou mais eficiente na indução da calogênese.

Percebe-se, pelas mesmas figuras, que, independentemente do explante utilizado, não houve formação de calos na ausência do 2,4-D e da cinetina. A análise de regressão estima que a maior intensidade de crescimento de calos (3,18g) pode ser obtida na concentração de 2,59 mg L⁻¹. Por sua vez, para o 2,4-D, a concentração de 2,68 mg L⁻¹ pode resultar em maior incremento na massa fresca de calos (2,70 g). Em ambos os casos, a partir desses valores, houve decréscimo no crescimento dos calos.



$$Y_{\text{foliar}} = + 1,7138 + 1,1267x - 0,2174x^2 \quad R^2 = 0,7554$$

$$Y_{\text{caulinar}} = 0,4677 + 1,2288x - 0,1767x^2 \quad R^2 = 0,9179$$

Figura 2. Intensidade de crescimento de calos formados a partir de segmentos caulinares e foliares de figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes concentrações de 2,4-D.

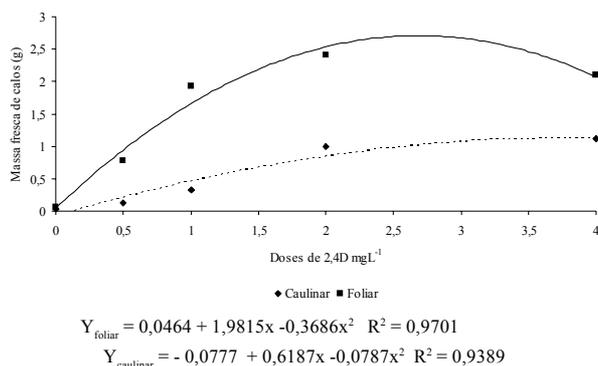


Figura 3. Massa fresca média de calos (g) formados a partir de segmentos caulinares e foliares de figueira ‘Roxo de Valinhos’ em meio com diferentes concentrações de 2,4-D

Experimento 2 - Ambientes x concentrações de 2,4-D

A formação de calos no escuro ocorreu entre 28 e 35 dias após a inoculação, enquanto que, na presença de luz, o início ocorreu somente entre 35 e 48 dias após a incubação.

Semelhantemente ao observado no experimento anterior, o comportamento de ambos os parâmetros analisados apresentou regressão com ajustamento quadrático em função das concentrações de 2,4-D, com pontos máximos estimados de 2,55 e 2,54 mgL⁻¹ para intensidade de crescimento e massa fresca de calos, respectivamente (Figuras 4 e 5).

O fato da formação de calos ter ocorrido mais precocemente no ambiente escuro pode ser responsável pelo maior desenvolvimento e peso de calos e está em concordância com a literatura (Fortes, 1992; Maciel, 2001; Palú, 2002; Araújo, 2004; Artiaga, 2004; Nogueira, 2003; Kouider et al., 1984).

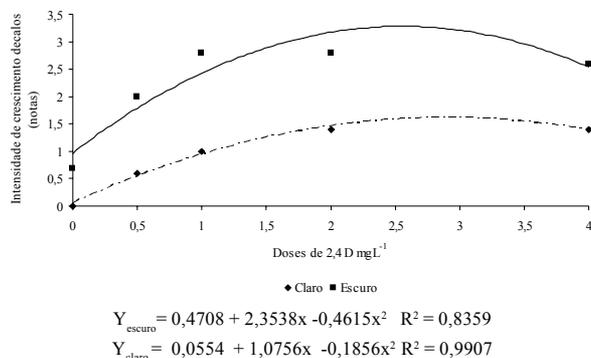


Figura 4. Intensidade de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de figueira ‘Roxo de Valinhos’, em diferentes ambientes e diferentes concentrações de 2,4-D.

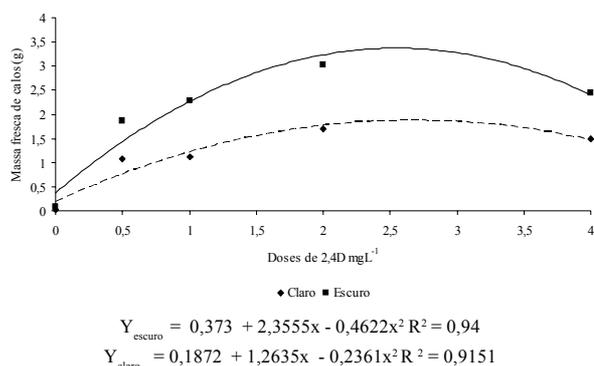


Figura 5. Massa fresca média de calos formados a partir de segmentos foliares de figueira ‘Roxo de Valinhos’ mantidos em diferentes ambientes e concentrações de 2,4-D.

Há relatos da formação de calos na presença de luz em ensaios de micropropagação com figueira na presença fitoregulador BAP (Fráguas, 2003).

Estudos comparativos de calogênese com diferentes cultivares de morangueiro, variando o tempo de permanência no escuro e no claro, verificaram que os diferentes períodos de escuro não diferiram estatisticamente quanto à intensidade de formação de calo no cv. Konvoy-Cascata. Para outro cultivar no mesmo estudo (‘Chandler’), o escuro favoreceu significativamente o crescimento dos calos (Flores et al., 1998).

Estudos envolvendo o efeito do tempo de permanência no escuro na calogênese *in vitro* de macieira, cv. Marubakaido, mostraram que o período de escuro não influencia a percentagem e a intensidade de calos formados (Camargo et al., 1999).

É importante ressaltar o melhor aspecto dos calos desenvolvidos em presença de luz, que se apresentaram com coloração verde, mesmo ao final do experimento, o que pode favorecer o processo de regeneração. Alguns autores verificaram, em material somático de macieira (*Malus domestica*, Borkh.), que os explantes expostos diretamente à luz apresentaram melhor aspecto e, posteriormente, maior percentagem de regeneração (Fortes & Teixeira, 1992). Ensaios com cotilédones sem embrião de macieira, cv. Red Delicious, mostraram que os explantes expostos ao escuro somente por 4 dias e, posteriormente, transferidos para a luz formaram calo compacto e verde, o que favoreceu a diferenciação dos brotos dentro de três semanas (Kouider et al., 1984).

Experimento 3 - Doses de 2,4-D e cinetina

A formação de calos não foi comprometida pela exposição à luz. Observa-se, nas Figuras 6 e 7, que houve

resposta crescente para todas as concentrações de cinetina testadas.

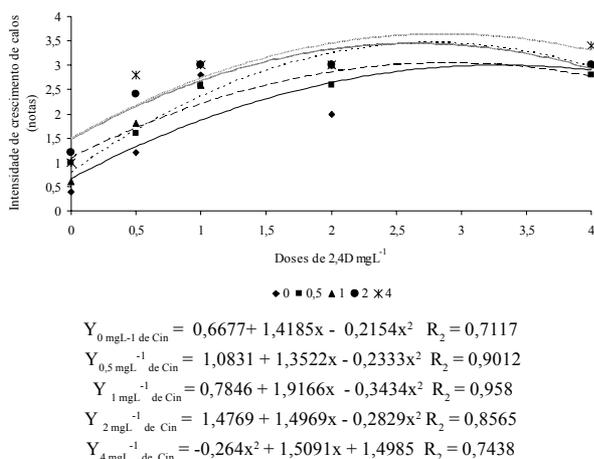


Figura 6. Intensidade de crescimento de calos formados a partir de segmentos foliares de figueira em diferentes combinações de doses de 2,4-D e cinetina.

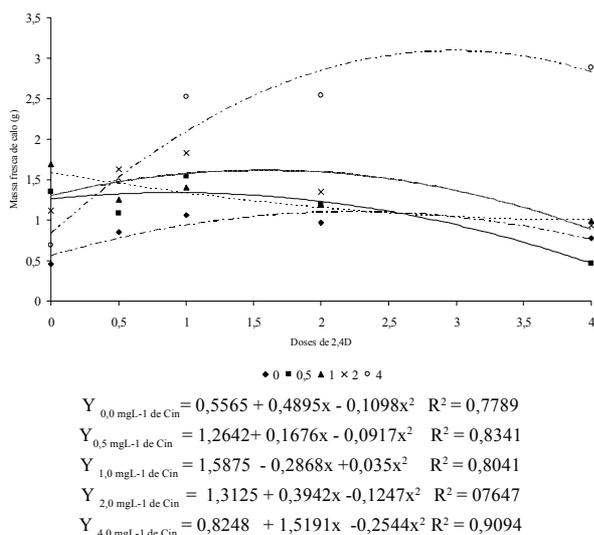


Figura 7. Massa fresca de calos desenvolvidos a partir de segmentos foliares de figueira, em diferentes combinações de doses de 2,4-D e cinetina.

O valor máximo de intensidade de crescimento de calos (3,65g) estimado a partir da equação de regressão foi registrado utilizando a dose 4,0 mgL⁻¹ de cinetina em combinação com 2,85 mgL⁻¹ de 2,4-D. Já para massa fresca, o melhor desempenho (3,10g) estimado foi obtido na dose máxima de cinetina em combinação com 2,98 mgL⁻¹ de 2,4-D.

Os resultados encontrados neste trabalho concordam com os obtidos por Damiano Filho (1995), quando esse autor afirma que a maioria das espécies lenhosas

requer altas concentrações de fitorreguladores no meio de cultura para a formação de calos. Fráguas (2003) também registrou a formação de calos em figueira na dose 4 mgL⁻¹ de cinetina em combinação com meio WPM, quando se dobrou sua concentração (200%).

A influência positiva da combinação auxina/citocinina também foi verificada em ensaios envolvendo calogênese em diversas cultivares de café (Santos *et al.*, 2000). De modo similar, em estudos de calogênese em café testando diferentes doses de 2,4-D e 2,0 mgL⁻¹ de cinetina Maciel (2001) também verificou maior formação de calos primários nodulares à medida em que se aumentou a concentração de 2,4-D.

As auxinas são indispensáveis à formação de calos, uma vez que são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular (Taiz & Zeiger, 2004). Já as citocininas também são necessárias para a divisão celular das plantas com resultado positivos na indução de calo embriogênico (Pasqual, 2001), confirmando que a calogênese observada neste experimento provavelmente foi favorecida pela ação conjunta desses fitorreguladores.

CONCLUSÕES

A calogênese em figueira 'Roxo de Valinhos' é estimulada pela utilização de segmentos foliares em ausência de luminosidade, na presença de 2,4-D e cinetina, ambos na concentração 4 mg L⁻¹.

REFERÊNCIAS

- Artiaga EJ (2004) Calogênese e regeneração de pimenta longa. Tese de Doutorado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 93p.
- Araújo JS de. (2004) Calogênese em anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L. Tese de Doutorado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 41p.
- Berthouly M, Michaux-Ferriere NM (1996) High frequency somatic embryogenesis from *Coffea canephora*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44:169-176,
- Camargo JT Fortes GR De, Silva JB1, Flores R, Centellas AQ, Oliveira MF, Muller NG, Andrade LB (1999) Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese *in vitro* Revista Brasileira de Agrociência, 5:81-83.
- Damião Filho CF (1995) Cultura de tecidos de plantas: micropropagação. Jaboticabal, FUNEP. 25 p.
- Evans DA, Sharp WR (1986) Applications of somaclonal variation. Biotechnology, 4:528-532.

- Faria JTC (1996) Calogênese e organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh.). Dissertação de Mestrado. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas. 51p.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sivar para Windows versão 4.0. In Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., São Carlos. Anais, UFSCar. p.255-258.
- Flores R, Gomes PR, Faria JTC, Centellas AQ, Fortes GR de L, Peters JA (1998) Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. Revista Brasileira de Agrociência, 4:9-14.
- Fortes GRL Calogênese e organogênese 'in vitro' de macieira (*Malus* spp.) afetada por fatores físicos, químicos e biológicos. 1992. Tese de Doutorado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 163p.
- Fortes GRL, Teixeira SL (1992) Calogênese e organogênese de material somático de macieira (*Malus domestica*, Borkh). In: Congresso Ibero Americano, 1, Congresso Latino Americano, 5., Congresso Nacional de Horticultura 4, Mondtevideu. Anais. p.21.
- Fráguas CB (2003) Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 110p.
- Grattapaglia D, Machado MA (1990) Micropropagação. In: Torre, AC, Caldas LS Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, EMBRAPA, CNPH, p.99-169.
- Handro W, Floh EIS (1990) Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, EMBRAPA, CNPH, p.204-212.
- Kouider M, Skirvin RM, Korban SS, Widholm JM, Hauptmann R (1984). Adventitious shoot formation from Red Delicious apple cotyledons "in vitro". Journal of Horticultural Science, 59:295-302.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60:197-214.
- Lima EC (2004) Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d' água (*Croton urucurana* Baill). Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 97p.
- Maciel AL de R. (2001) Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 60p.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum, 15:473-497.
- Nogueira RC (2003) Propagação *in vitro*, análise anatômicas e bioquímicas de Murici-pequeno (*Byrsonima intermèdia* A. Juss). Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 89p.
- Palú EG (2002) Indução *in vitro* de calogênese em anteras e brotações em segmentos nodais de *Coffea arabica* L. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 47p.
- Pasqual M (2001) Meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p. (Textos Acadêmicos).
- Santos ACP, Cordeiro AT, Otoni WC, Zambolim L, Campos MRC (2000) Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 1., Poços de Caldas. Anais, EMBRAPA/CAFÉ. p.156-159.
- Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia vegetal. Porto Alegre, Artmed. 719p.
- Tulman-Neto A, Santos PC Dos, Latado RR. (1999). Aspectos sobre o melhoramento da figueira (*Ficus carica* L.). In: Simpósio brasileiro sobre a cultura da figueira, Ilha Solteira. Anais, UNESP. 259p.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescences coconut (*Cocos nucifera* L.): Evidence for somatic embryogenesis. Plant Cell Reports, 13:218-221.