

Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC¹

Influence of auxins and explants types in the induction of friable callus in *Piper hispidinervum* C. DC

Frederico Henrique da Silva Costa², Tatiane da Silva Loureiro³ e Jonny Everson Scherwinski Pereira⁴

Resumo - O trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes auxinas e tipos de explantes na calogênese de *Piper hispidinervum* C. DC., visando ao cultivo de células em suspensão. Como fonte de explantes utilizaram-se segmentos foliares e internodais provenientes de plântulas germinadas *in vitro*. O meio de cultura básico foi constituído pelos sais e vitaminas de MS. Como auxinas foram testadas, isoladamente, ANA, AIB, AIA e 2,4-D nas concentrações de 0; 2,5 e 5 mg L⁻¹. Os explantes foram dispostos em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio, sendo os segmentos foliares inoculados com a face abaxial em contato com o meio. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto de cinco repetições com seis explantes por parcela. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 25±2 °C por três semanas, quando se procedeu a avaliação referente à formação de calo. Verificou-se que o tipo de explante influenciou significativamente a formação de calos. Explantes foliares foram mais responsivos que explantes internodais e para ambos os tipos de explantes a formação de calos foi maior quando cultivados em meio adicionado de ANA.

Palavras-chave: Pimenta longa. Calogênese. Cultura de células. Fitorreguladores.

Abstract - The objective of this work was to evaluate the influence of auxins and explants types in the callogenesis of *Piper hispidinervum* C. DC. in cultivation of cells in suspension. As explant source was used leaf and internode segments obtained from plantlets germinated *in vitro*. The basal medium constituted of the salts and vitamins of MS. As auxins were tested NAA, IBA, IAA and 2,4-D in concentrations of 0; 2.5 and 5 mg L⁻¹. The explants were disposed in 250 mL flasks with 30 mL medium, being the leaf segments inoculated with the abaxial side in contact with the medium. Six explants per treatment were arranged in a completely randomized design with five replications. Cultures were maintained in the dark in a growth room at 25±2 °C for three weeks, when the callus formation was evaluated. It was verified that the explant type significantly influenced the callogenesis. Foliar explants were more responsive than internodes and for both explants the callus formation was larger when to the culture medium was added NAA.

Key words: Pimenta longa. Callogenesis. Cells culture. Phyto regulators.

¹ Recebido para publicação em 15/02/2006; Aprovado em 07/01/2008

² Eng. Agrônomo, Doutorando em Fitotecnia/UFLA, Caixa Postal 3037, Campus Universitário, CEP: 37.200-000, Lavras, MG. fredericohenrique@yahoo.com.br

³ Bióloga, Mestranda do Curso de Biotecnologia/UFAM, Manaus, AM, tathiloureiro@hotmail.com

⁴ Eng. Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Núcleo de Recursos Genéticos, CP 02372, CEP: 70 770-900, Brasília, DF. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, jonny@cenagen.embrapa.br

Introdução

A pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), pertencente à família Piperaceae, é uma planta arbustiva nativa da região Amazônica, de cujas folhas e ramos finos obtêm-se um óleo essencial utilizado para a extração de safrol, um metabólito secundário com grandes potencialidades de uso comercial por empresas de cosméticos e inseticidas (SÁ; PIMENTEL, 2001; WADT, 2001). Contudo, por se tratar de uma espécie em fase de domesticação (SOUSA et al., 2001) e praticamente desconhecida do ponto de vista científico, pesquisas envolvendo métodos mais eficientes de propagação, que possibilitem avanços no melhoramento vegetal dessa espécie ou ainda favoreçam a síntese de safrol se fazem necessárias.

Nesse sentido, o emprego de técnicas de cultura de tecidos vegetais, em especial a cultura de calos e o cultivo de células em suspensão são de relevante importância às pesquisas envolvendo diferenciação celular, biologia molecular, assim como para produção de metabólitos secundários na área industrial (HAYASHI et al., 2002; VALLE, 2003). Para tanto, a formação de calos a partir de um explante (calogênese) representa uma etapa fundamental no processo, necessitando primeiramente de estudos acerca da concentração ideal, tipos de fitoreguladores e fonte de explantes a serem utilizados (MORALES et al., 1999). De acordo com George e Sherrington (1984) o tipo de explante e a constituição do meio de cultura, assim como a idade fisiológica e ontogenética do órgão e o tamanho do explante (THORPE; PATEL, 1984) exercem grande influência no tipo, grau de diferenciação e potencial morfo genético dos calos formados em um determinado genótipo. Estudando a influência do tipo de explante na indução e crescimento de calos em *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew., Dhar e Joshi (2005) observaram significativa influência do tipo primário de explantes sobre a taxa de formação de calos.

Em relação aos reguladores de crescimento vegetal, a indução de calos friáveis é geralmente favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, assim como pela adição de outros componentes ao meio de cultivo ou mesmo pelo genótipo empregado (PESCADOR et al., 2000). Dentre as auxinas existentes, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA) são as mais freqüentemente empregadas, sendo que o 2,4-D tem sido mais utilizado na indução de calos e em culturas em suspensão, enquanto o ANA é usado quando a organogênese é requerida. Porém, altas concentrações desta auxina podem induzir a calogênese (GASPAR et al., 1996). Segundo Caldas et al. (1990) as diferentes respostas exercidas pelas

auxinas se devem a diferenças no metabolismo e estabilidade das mesmas, sugerindo a possibilidade de outros tipos de auxinas poderem promover resultados similares àquelas rotineiramente utilizadas.

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a influência dos tipos de auxinas e explantes sobre a formação de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC., visando futuramente o cultivo de células em suspensão dessa espécie.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Ramos reprodutivos de *Piper hispidinervum* C. DC. foram depositados como exsiccatas no Herbário do Parque Zoobotânico (PZ) sob nº 6.749. As sementes de *P. hispidinervum* C. DC. foram desinfestadas superficialmente com imersão por 1 minuto em álcool (70%), seguida de 20 minutos em água sanitária comercial (50%). Posteriormente, foram lavadas por três vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, foram colocadas para germinar em meio constituído pelos sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 anteriormente a adição do agente geleificante, sendo em seguida autoclavado a 121 °C e 1,3 kgf cm⁻² por 15 minutos para esterilização.

Após oito semanas de cultivo, plântulas com altura entre 3 e 5 cm foram selecionadas para servirem como matrizes para o fornecimento de material vegetal à indução da calogênese. Com o auxílio de pinça e bisturi assépticos foram retirados segmentos foliares e internodais de aproximadamente 0,5 cm, os quais foram utilizados como explantes. Imediatamente após a extração dos explantes, os mesmos foram inoculados em meio de cultura contendo os sais e vitaminas de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), preparados como descrito anteriormente, suplementado com ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido indolilacético (AIA) ou 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nas concentrações de 0; 2,5 e 5 mg L⁻¹.

Os explantes foram cultivados em frascos de 250 mL de capacidade contendo 30 mL de meio, sendo vedados com filme plástico transparente. Os segmentos foliares foram inoculados com face abaxial em contato com o meio.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e seis

explantes por parcela. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz e à temperatura de 25 ± 2 °C.

Após três semanas da inoculação foi efetuada a avaliação do experimento considerando-se: a porcentagem de explantes formando calo friável, não desenvolvidos ou mortos e apresentando a formação de raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dentro de cada tratamento comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados expressos em porcentagem (X) foram transformados em arco seno $(X/100)^{0.5}$. Utilizou-se, nas análises, o programa de Análise Estatística SANEST (ZONTA; MACHADO, 1984).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os dados referentes ao percentual de calos formados, explantes mortos/não desenvolvidos e explantes com raízes em cada tratamento.

Verificou-se que a adição da auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5 mg L⁻¹ possibilitou os maiores percentuais de formação de calos friáveis (Figura 1A) e que o tipo de explante usado teve forte influência sobre esta variável. Nessas concentrações de ANA, a formação de calos observada com a utilização de segmentos foliares foi de 83,2% a 91,6%, valores significativamente superiores àqueles observados para os internodais que foram de 43,1% e 49,6%. Flores et al., (2006), estudando a indução de calos em explantes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.), verificaram que explantes de origem foliar foram os que proporcionaram os melhores resultados, semelhantemente aos resultados obtidos por Dhar e Joshi (2005), que trabalhando com tipos de explantes na indução e crescimento de calos em *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew., observaram significativa influência do tipo primário de explantes (hipocótilo, raízes, cotilédones e folhas) sobre a taxa de formação de calos, tendo sido as folhas a melhor fonte com 100% de calogênese.

A obtenção de calos friáveis é de grande importância quando se almeja o cultivo de células em suspensão

Tabela 1 - Efeito do tipo de explante e auxinas sobre as variáveis percentual de calos friáveis, explantes mortos/não desenvolvidos e explantes com raízes em *Piper hispidinervum* C. DC

Auxinas (mg L ⁻¹)	Formação de calo		Explantes mortos		Explantes com raízes	
	Folha	Entrenó	Folha	Entrenó	Folha	Entrenó
ANA	(%)					
0	0,0bA	0,0bA	13aA	0,0bB	0,0aB	65,5aA
2,5	83,2aA	43,1aB	0,0bB	15,8aA	0,0aA	0,0bA
5,0	91,6aA	49,6aB	0,0bA	0,0bA	0,0aA	0,0bA
AIA	(%)					
0	0,0bA	0,0aA	0,7aA	0,0bA	4,1bB	79,9aA
2,5	4,1abA	0,7aA	0,7aB	28,8aA	30,6aA	8,0bB
5,0	6,0aA	0,7aA	8,0aB	31,3aA	10,3abA	28,1bA
AIB	(%)					
0	0,0aA	0,0bA	2,7aA	0,0aA	0,7aB	95,7aA
2,5	0,0aA	2,7bA	0,0aB	5,6aA	0,0aB	71,5bA
5,0	0,0aB	31,8aA	0,0aA	0,7aA	0,0aB	49,8bA
2,4-D	(%)					
0	0,0aA	0,0aA	0,7bA	0,0bA	0,0aB	60,2aA
2,5	0,0aA	0,0aA	53,5aA	13,0aB	0,0aA	2,3bA
5,0	0,0aA	0,0aA	63,5aA	22,3aB	0,0aB	13,0bA

Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada auxina testada, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

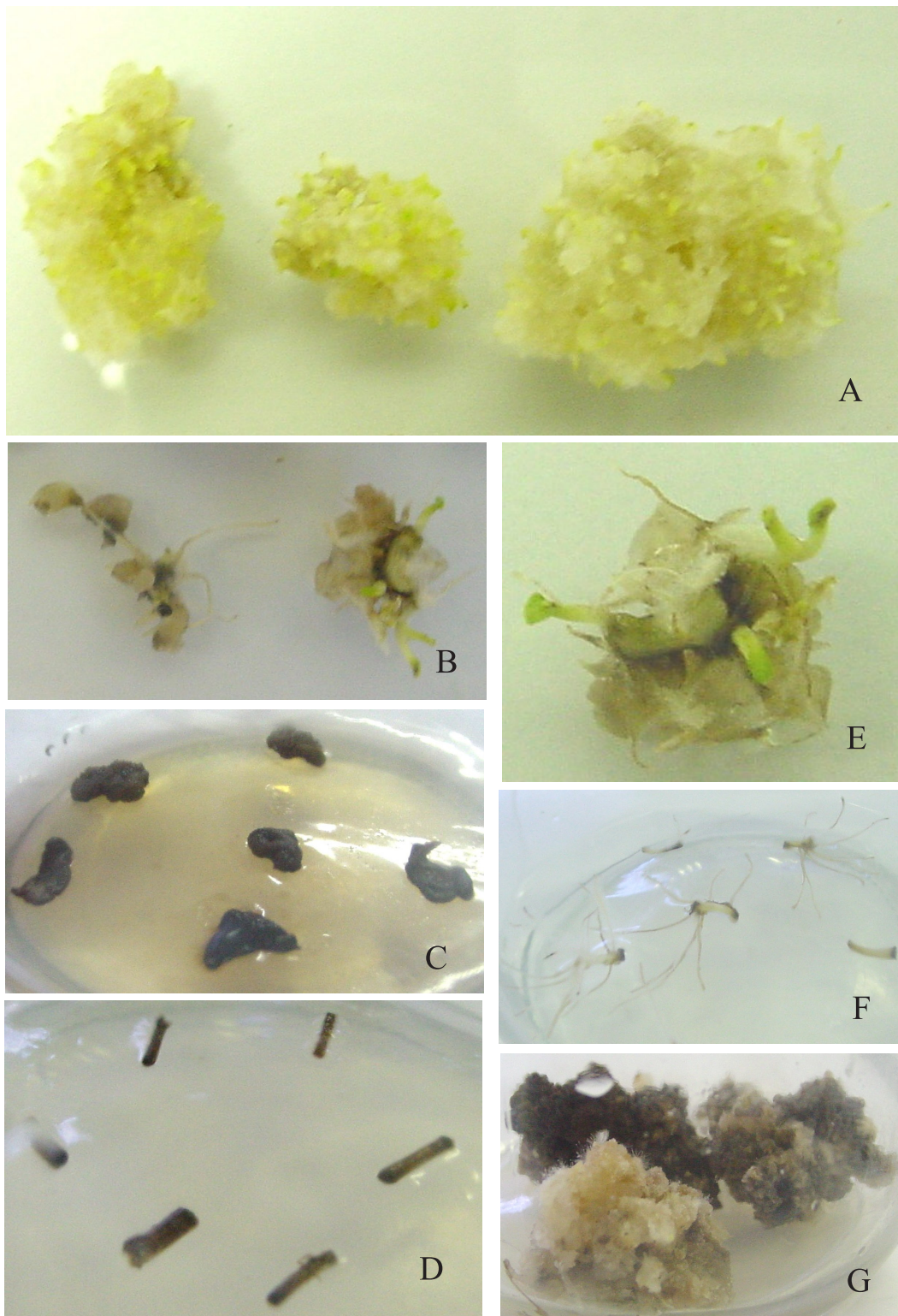


Figura 1 - Calogênese em explantes de *Piper hispidinervum*. (A) Aspecto geral dos calos formados a partir de explantes foliares cultivados em meio com 5 mg L^{-1} de ANA (Barra = 2 cm); (B) calos obtidos em meio contendo 5 mg L^{-1} de AIB (Barra = 1 cm); (C) (Barra = 2 cm) e (D) aspecto geral da morte dos tecidos em meio contendo 2,4-D (Barra = 1 cm); (E) regeneração direta de brotações em calos cultivados com AIB (Barra = 0,5 cm); (F) formação de raízes em meio desprovido de auxinas (Barra = 1 cm); (G) aspecto geral da oxidação e senescência dos calos formados (Barra = 1 cm)

(CID, 1992), haja vista que as células se dividem rapidamente e se dispersam facilmente no meio de cultura, o que dificilmente ocorre nos calos compactos, onde as células estão aderidas (NARAYANASWAMY, 1977).

Ainda quanto à formação de calos, foi constatado que explantes foliares cultivados em meio acrescido de 5 mg L⁻¹ de ANA formaram calos friáveis maiores e por todo o explante quando comparado com a concentração de 2,5 mg L⁻¹ e em relação ao mesmo tratamento, porém utilizando internódios. No tratamento onde se utilizou o AIB, a formação de calos também foi verificada (entre 2,7% a 31,8%), contudo, foram observados apenas em explantes internodais, sendo caracterizados pelo tamanho menor. Porém, com o uso desse regulador, em alguns casos observou-se a regeneração direta de brotos a partir dos calos formados (Figura 1B, E).

Estudando a influência de diferentes combinações de auxina e citocinina sobre a formação de massa celular (calo) em explantes foliares de *Piper hispidinervum*, Valle (2003) verificou que a formação de calo foi notadamente afetada pelo tratamento hormonal utilizado. Além disso, o cultivo desses explantes em meio composto com 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 10,2 mg L⁻¹ de BAP proporcionou a melhor formação de calos friáveis de coloração verde intensa e pequena diferença da massa celular formada em explantes foliares, significando que houve conversão de grande parte do explante em calo, favorecendo assim a redução do número de operações a ser realizada na transferência para o meio líquido e, dessa forma, diminuindo o risco de contaminação. Contudo, esses resultados foram possivelmente em virtude da alta concentração de citocinina usada, em combinação com o 2,4-D, fato que pode ter anulado o efeito tóxico do 2,4-D, visto que neste trabalho, o emprego de 2,4-D isoladamente promoveu alta mortalidade dos explantes (Figura 1C, D), sendo significativamente superior nos explantes foliares que nos internodais. Silva et al. (2003), verificando a influência da concentração de sais e fitoreguladores sobre a indução de calos em ápices caulinares de Carqueja (*Baccharis trimera*), observaram que a adição de ANA individualmente na concentração de 10 µM, tanto em meio MS 50% (sais, vitaminas e inositol) quanto em MS 100%, proporcionou maior biomassa fresca de calos, apesar do meio MS 50% ter proporcionado resultados superiores. Estes autores observaram ainda que a maior indução e crescimento de calos ocorreu em meio MS 50% suplementado com 15,0 µM de ANA individualizado, ou nas concentrações de 10,0 e 15,0 µM em combinação com 1,25 ou 2,50 µM de cinetina (CIN) e, que entre as auxinas testadas, o ANA foi mais eficiente quando comparada ao

2,4-D individualizado ou em conjunto com CIN ou thidiazuron (TDZ) em todas as concentrações avaliadas.

Com relação à formação de raízes, observou-se que todas as raízes foram emitidas a partir da extremidade dos explantes internodais e que os maiores percentuais de raízes foram verificados em meio desprovido de auxinas (Tabela 1; Figura 1F), levando a inferir sobre uma possível reserva endógena natural de auxinas nesse tipo de explantes. Além disso, constatou-se que das auxinas empregadas, o AIB foi o que favoreceu o maior desenvolvimento de raízes, principalmente na concentração de 2,5 mg L⁻¹ (75,1%), havendo ainda tendência à regeneração direta de plântulas em explantes internodais (Figura 1E).

Formação de raízes simultaneamente a de brotos também foi observada por Valle (2003). Porém, como não foi constatada uma relação entre tipo e concentração de reguladores de crescimento com a formação de brotos e raízes, é possível que esse efeito esteja relacionado com a concentração endógena de hormônios dos próprios explantes.

Quanto ao percentual de explantes mortos/não desenvolvidos, a utilização da auxina 2,4-D, em ambas as concentrações (2,5 e 5 mg L⁻¹) associado a explantes foliares, promoveu os maiores percentuais de explantes mortos quando comparado com entrenós, tendo sido de 63,5% na concentração de 5 mg L⁻¹. Foi observado ainda que em explantes internodais a morte do tecido se deu a partir das extremidades e que explantes foliares foram mais sensíveis às concentrações de 2,4-D estudadas. Possivelmente, a concentração testada desta auxina tenha causado efeito fitotóxico para esta espécie.

Uma vez formados, os calos apresentaram rápida degeneração e morte, independente da auxina, fato este caracterizado pelo elevado grau de oxidação dos mesmos (Figura 1G). Foi observado que a partir de 40 dias de cultivo os calos iniciaram um processo de degradação acentuado, caracterizado pelo escurecimento da massa celular, com conseqüente senescência do calo. Arnaldos et al. (2001) atribuíram essas mudanças à formação de compostos pigmentados em resposta ao estresse surgido frente a um possível déficit de hormônios, nutrientes ou água, condições estas que provocam um aumento em radicais livres. Resultados semelhantes a este trabalho foram verificados por Valle (2003), em que a adição de 5 e 7,5 mg L⁻¹ de 2,4-D associado a 0,5 mg L⁻¹ de cinetina promoveu total necrose dos tecidos. Desta forma, cuidados devem ser observados com relação à restrição de tempo entre o calo estar formado e o início da degeneração das células que o formam, uma vez que esse período é de no máximo 10 dias (VALLE, 2003).

Conclusões

1. O maior percentual de calos friáveis formados em *Piper hispidinervum* é obtido em explantes foliares cultivados em meio acrescido de ANA;
2. A adição de 2,4-D ao meio, em altas concentrações (2,5 e 5 mg L⁻¹), causa fitotoxicidade aos explantes e;
3. Calos de *Piper hispidinervum* possuem elevada sensibilidade à degeneração e senescência após 40 dias de cultivo em meio indutor.

Referências

- ARNALDOS, T. L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x Ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 113, p. 315-322, 2001.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. S.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa – CNPH, 1990. p. 37-70.
- CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, Lavras, n. 18, p. 02-07, 1992.
- DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, New York, v. 24, p. 195-200.
- GASPAR, T. et al. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology – Plant**, Columbia, v. 32, p. 272-289, 1996.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 709 p.
- HAYASHI, T. K. et al. Tratamento de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L., Caryophyllaceae) com nitrogênio e calogênese *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 59, n. 01, p. 47-52, 2002.
- MORALES, C. F. G. et al. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 05, n. 03, p. 174-177, 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 03, p. 473-497, 1962.
- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J., BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, 1977. p. 179-248.
- PESCADOR, R. et al. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 18-23, 2000.
- SÁ, C. P. de; PIMENTEL, F. A. **Viabilidade financeira da exploração da Pimenta longa em sistemas de cultivo racional e extrativismo no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, Dez./2001. 2 p. (Comunicado Técnico, 136).
- SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 03, p. 541-547, 2003.
- SOUSA, M. de M. M.; LÉDO, F. J. da S.; PIMENTEL, F. A. Efeito da adubação e do calcário na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta longa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 03, p. 405-409, 2001.
- THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v. 01, cap. 7, p. 49-60.
- VALLE, R. de C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- WADT, L. H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.), visando seu uso e conservação**. 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Genética), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: UFPel; SEI, 1984; 138 p.