

## Indução e crescimento de brotações obtidas a partir de calos friáveis de moreira, *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. (Moraceae)

Induction and growth of shoots obtained from friable calluses of *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. (Moraceae)

Guilherme Augusto Canella Gomes <sup>(1)</sup>  
Renato Paiva <sup>(2)</sup>

**Resumo.** Objetivando estabelecer uma metodologia para a micropropagação de moreira, *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud., calos friáveis foram inoculados em meio WPM, suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar e as combinações entre os reguladores de crescimento ANA (0; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) e BAP (0; 0,5; 1,0 mg.L<sup>-1</sup>). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 24°C e intensidade luminosa de 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> por um período de 30 dias. As brotações obtidas *in vitro* foram inoculadas em meio WPM, suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e as seguintes concentrações de GA<sub>3</sub>: 0; 1; 2; 4; 6 mg.L<sup>-1</sup>. Depois de inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> a 24±2°C, durante 20 dias. Independentemente do tipo de explante (folhas ou segmentos nodais) que originou os calos, a mesma resposta *in vitro* foi observada quando os explantes foram submetidos aos tratamentos com ANA, BAP ou GA<sub>3</sub>. A análise dos resultados indicou que a produção máxima de brotações (12 brotações/explante) a partir de calos friáveis pode ser obtida através da utilização de 0,75 mg.L<sup>-1</sup> de ANA associado a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A produção máxima de brotações (5 brotações/explante) a partir de segmentos nodais, pode ser obtida utilizando-se 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA associado a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. O crescimento *in vitro* das brotações foi observado com a utilização de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. **Palavras-chave:** Moreira; brotações *in vitro*; crescimento.

**Abstract.** Friable calluses of *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. were inoculated in WPM medium supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose, 7 g.L<sup>-1</sup> Agar, and combinations between growth regulators NAA (0; 0.01; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) and BAP (0; 0.5; 1.0 mg.L<sup>-1</sup>) to establish a methodology for its micropropagation. After inoculation, explants were kept for a 30-day period within a growth-stimulating room at 24°C and light intensity of 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>. *In vitro* shooting were inoculated in WPM medium supplemented with 3% sucrose, 0.65% Agar, and the following GA<sub>3</sub> concentrations: 0; 1; 2; 4; 6 mg.L<sup>-1</sup>. After inoculation, explants were kept for a 20-day period within a growth-stimulation room at 24±2°C and light intensity of 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>. Regardless of the explant type (leaves or nodal segments) that originated calluses, the same *in vitro* response was observed when explants were submitted to NAA, BAP, or GA<sub>3</sub> treatments. Results have shown that the maximum shooting production (12 shootings/explant) from friable calluses can be obtained with the use of 0.75 mg.L<sup>-1</sup> of ANA associated with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. The maximum shooting production (5 shootings/explant) from nodal segments may be obtained with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of ANA associated with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. *In vitro* shooting growth was observed with the use of 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>. **Keywords:** *Maclura tinctoria*; *in vitro* shooting; growth.

<sup>(1)</sup> Professor adjunto do IFSP campus São Roque. Correspondência: Rod. Pref. Quintino de Lima, 2.100, Paisagem Colonial, São Roque - SP; e-mail: [guilhermecanella@ig.com.br](mailto:guilhermecanella@ig.com.br)

<sup>(2)</sup> Professor adjunto da Universidade Federal de Lavras.

(Recebido em: 10 set. 2013; aceito em: 12 out. 2013; publicado em: 08 jul. 2014).

### 1 Introdução

Para se obter a micropropagação de plantas, após o estabelecimento *in vitro* de explantes através da formação de calos, é necessário estabelecer uma metodologia de indução de formação de brotações (parte aérea) e ou raízes.

O processo de organogênese é uma consequência da interação entre os processos de divisão e diferenciação celular. Tais processos dependem de sinais, principalmente fitormônios, que agindo dire-

tamente ou indiretamente ao nível gênico, desencadeiam processos específicos de síntese proteica, e como consequência, induzem alterações bioquímicas e metabólicas diversas no organismo.

Nos tecidos em cultura, o controle da organogênese é feito através da introdução exógena de reguladores de crescimento. Estas substâncias podem induzir à formação de novas estruturas organizadas, através de um processo morfogenético ou organogenético que ocorra de novo.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para a indução e crescimento de brotações (organogênese) de moreira, *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. (Moraceae), a partir de segmentos nodais e de calos friáveis obtidos a partir de segmentos nodais.

## 2 Material e métodos

Foram utilizados fragmentos de calos friáveis de moreira com tamanho de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>, formados a partir de segmentos nodais.

Os calos foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio WPM (LLOYD & MC COWN, 1980), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar e as seguintes combinações de reguladores de crescimento (T<sub>0</sub> = controle; T<sub>1</sub> = 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>2</sub> = 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>3</sub> = 2,0 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>4</sub> = 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP; T<sub>5</sub> = 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>6</sub> = 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 v ANA; T<sub>7</sub> = 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>8</sub> = 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP; T<sub>9</sub> = 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,01 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>10</sub> = 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> ANA; T<sub>11</sub> = 1,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ANA).

O pH meio de cultura foi ajustado para 6,0 e autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 24°C ± 2°C e sob intensidade luminosa de 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> por um período de 30 dias, quando o número de brotações obtidas foi avaliado.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo que cada repetição continha um explante.

O número de brotações foi considerado como tendo distribuição Poisson (não-normal), e assim optou-se pelo uso do enfoque de modelos lineares generalizados (DEMÉTRIO, 1993). A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na qualidade do ajustamento e se possível na ausência de significância dos desvios de regressão. A detecção de diferenças significativas foi feita através da Análise de "Deviance" (DEMÉTRIO, 1993), considerando a distribuição assintótica de qui-quadrado das diferentes reduções do modelo.

Para a disposição gráfica do modelo linear de regressão, levou-se em conta que:  $f(x) = \exp\{f(X_1 \cdot X_2)\}$ , em que  $f(x)$  é o modelo de regressão ajustado, que é função de  $X_1$  (concentração de ANA) e de  $X_2$  (concentração de BAP).

As brotações obtidas *in vitro* de calos formados a partir de segmentos nodais e também diretamente a partir de segmentos nodais com 20 dias de idade, foram inoculadas em 30mL de meio WPM (LLOYD & MC COWN, 1980), suplementado com 3% de sacarose, 0,65% de ágar e as seguintes concentrações de GA<sub>3</sub> (T<sub>0</sub> = controle; T<sub>1</sub> = 1 mg.L<sup>-1</sup>; T<sub>2</sub> = 2 mg.L<sup>-1</sup>; T<sub>3</sub> = 4 mg.L<sup>-1</sup>; T<sub>4</sub> = 6 mg.L<sup>-1</sup>).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 e autoclavado por 15 minutos a 120°C. Depois de inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa de 13 μmol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à temperatura de 24 ± 2°C durante 20 dias.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, contendo 20 repetições por tratamento.

Como os tratamentos foram avaliados visualmente, não foram realizadas análises estatísticas para a determinação da melhor concentração de GA<sub>3</sub>.

## 3 Resultados e discussão

Não houve formação de brotações em explantes inoculados em meio de cultivo desprovido de reguladores de crescimento ou em meio de cultivo sem a combinação de ANA e BAP, independente da concentração (Fig. 1).

Este fato se confronta ao proposto por Handro (1993) em seus estudos com *Petunia* sp.

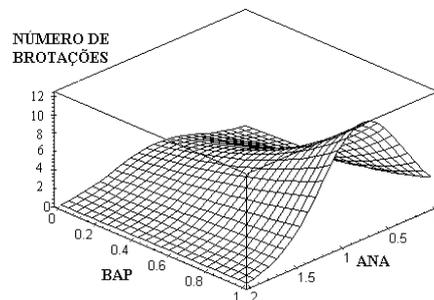


**Figura 1.** Aspecto visual de calos formados a partir de segmentos nodais inoculados em meio WPM na ausência de reguladores de crescimento. Em (1) e (2), ausência de reguladores de crescimento; em (3), presença de ANA; em (4), presença de BAP.

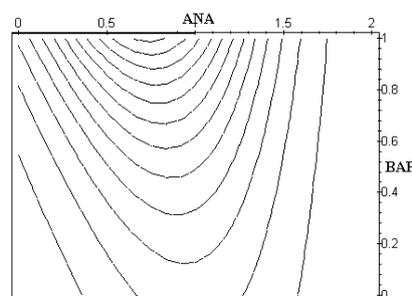
Segundo Moncousin (1991), para a indução de organogênese, algumas espécies lenhosas necessitam da atuação sinérgica entre várias classes de hormônios vegetais durante algumas de suas fases de desenvolvimento e crescimento.

Hee-Ju Yu *et al.* (1997), Bergmann (1997) e Remashiree (1997) em seus estudos com *Lithospermum erythrorhizon*, *Paulownia* sp e *Aristolochia indica*, respectivamente, também observaram a necessidade da combinação entre auxinas e citocininas para a indução de brotações a partir de calos friáveis.

O modelo de superfície de resposta ajustado (Fig. 2) indica que o uso de concentrações superiores a  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA em associação com BAP inibe o processo de formação de brotações. A máxima produção de brotações (12 brotações/explante) pode ser obtida com a utilização de  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA associado a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. O mesmo pode ser observado através do diagrama de contornos correspondente (Fig. 3).



**Figura 2.** Modelo de superfície de resposta ajustada referente ao número de brotações obtidas de moreira a partir de calos friáveis em função de diferentes concentrações de BAP ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e ANA ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Diagrama de contornos correspondente a formação de brotações a partir de calos friáveis de moreira em função de diferentes concentrações de BAP ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e ANA ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Ponto de Máximo =  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP.

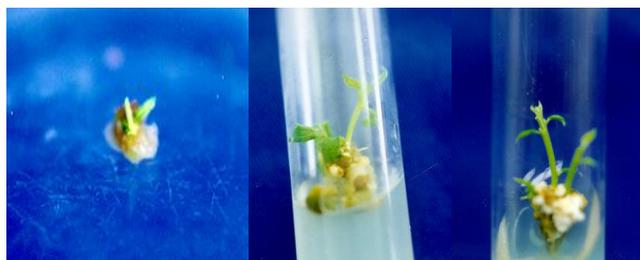
Segundo a análise de “Deviance” (Tab. 1), ficou evidente a alta qualidade do ajustamento matemático utilizado, o qual apresentou uma “Deviance de Desvios” não significativa.

**Tabela 1.** Quadro de análise de “Deviance” para o número de brotações de moreira formadas a partir de calos de segmentos nodais inoculados *in vitro* na presença de ANA e BAP.

Causas de Variação	GL	"Deviance"
Tratamentos	11	52,6107**
Regressão	6	45,9469**
Desvios	5	6,6638NS
Resíduo	108	45,2831

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste qui-quadrado.

O tipo de brotações obtidas em calos formados a partir de segmentos nodais de moreira está demonstrado na Fig. 4.



**Figura 4.** Aspecto geral de brotações obtidas *in vitro* a partir de calos oriundos de segmentos nodais de moreira.

Os resultados dos experimentos relativos ao estudo do comportamento *in vitro* de brotações, obtidas a partir de segmentos nodais e de calos, também obtidos a partir de segmentos nodais de moreira, inoculados na presença de ANA e BAP indicaram que o uso de GA<sub>3</sub> favorece o crescimento e desenvolvimento *in vitro* das brotações.

Na ausência ou presença de 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> não foi observado crescimento das brotações. Na presença de 2 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, as brotações apresentaram um crescimento satisfatório de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, o que tornou possível a sua transferência para o meio de enraizamento (Fig. 5). O uso de 4 mg.L<sup>-1</sup> e 6 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> também induziu crescimento satisfatório, porém o uso destas concentrações houve a formação de calos na base do explante. Segundo George (1996), a formação de calos na base das brotações é indesejável, pois impede a conexão vascular entre o sistema radicular e a parte aérea.

Resultados semelhantes também foram observados por Pattnaik *et al.* (1996), os quais obtiveram crescimento *in vitro* de brotações de *Morus australis* utilizando 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura. Em *Paulownia s.*, o alongamento das brotações foi alcançado utilizando-se 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura (BERGMANN, 1997).

#### 4 Considerações finais

A produção máxima de brotações (12 brotações/explante) formadas a partir de calos friáveis pode ser obtida através da utilização de 0,75 mg.L<sup>-1</sup> de ANA associado a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A produção máxima de brotações (5 brotações/segmento) formadas a partir de segmentos nodais, pode ser obtida utilizando-se 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA associado a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. O crescimento de brotações formadas *in vitro* é possível através da utilização de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> no meio de cultura.



**Figura 5.** Aspecto geral do crescimento de brotações obtidas *in vitro* a partir de segmentos nodais inoculados na presença de GA<sub>3</sub>. (T<sub>0</sub>) controle; (T<sub>1</sub>) 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>; (T<sub>2</sub>) 2 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>; (T<sub>3</sub>) 4 mg.L<sup>-1</sup>; (T<sub>4</sub>) 6 mg.L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>.

## Referências

- BERGMANN, B. A. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 315-319, 1997.
- DEMÉTRIO, C. G. B. Modelos Lineares na Experimentação Agrônômica. **Anais e Resumos**. V Simpósio de Estatística Aplicada à Experimentação Agrônômica, 1993.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 - The Technology**. 2.ed. Edington: Exegetics Limited, 1996.
- HANDRO, W. Effects of some growth regulatros on *in vitro* flowering of *Sterptocarpus nobilis*. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 133-136, 1993.
- HEE-JU, Y.; OH, S. K.; CHOI, D. W.; KWON, Y. M.; KIM, S. G. Plant regeneration from callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 261-266, 1997.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v. 15, p. 416 (abst. 321), 1980.
- MONCOUSIN, C. Peroxidase as a tracer for rooting improvement and expressing rejuvenation during *in vitro* multiplication of *Cynara cardunculus scolymus* L. **Plant Cell Physiology**, v. 39, p. 147-148, 1991.
- PATTNAIK, S. R.; SAHOO, Y.; CHAND, P. K. Micropropagation of a fruit tree, *Morus australis*. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 841-845, 1996.
- REMASHIREE, A. B. *In vitro* organogenesis in *Aristolochia indica*. **Phytomorphology**, v. 47, n. 2, p. 161-165, 1997.

### Como citar este artigo científico

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R. Indução e crescimento de brotações obtidas a partir de calos friáveis de moreira, *Maclura tinctoria* (L.) Don ex Steud. (Moraceae). *Scientia Vitae*, vol. 2, n. 5, ano 2, jul. 2014, p. 3-7. Disponível em: <www.revistaifpsr.com/>; acesso em: \_\_/\_\_/\_\_.