



GABRIELLEN DE MARIA GOMES DIAS

**INDUÇÃO DE CALOS E POTENCIAL
EMBRIOGÊNICO EM BASTÃO DO
IMPERADOR**

LAVRAS - MG

2010

GABRIELEN DE MARIA GOMES DIAS

**INDUÇÃO DE CALOS E POTENCIAL EMBRIOGÊNICO EM BASTÃO
DO IMPERADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS - MG
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Dias, Gabrielen de Maria Gomes.

Indução de calos e potencial embriogênico em bastão do
imperador / Gabrielen de Maria Gomes Dias. – Lavras : UFLA,
2010.

101 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Moacir Pasqual.

Bibliografia.

1. Zingiberaceae. 2. *Etilingera elatior*. 3. Calos *in vitro*. 4.
Auxinas. 5. Propagação de plantas. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 631.531

GABRIELEN DE MARIA GOMES DIAS

**INDUÇÃO DE CALOS E POTENCIAL EMBRIOGÊNICO EM BASTÃO
DO IMPERADOR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de agosto de 2010.

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho	EMBRAPA
Dra. Franciane Tavares Braga	EPAMIG
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	PNPD/EMBRAPA

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

LAVRAS – MG
2010

*Dedico este trabalho a minha família, meus pais **Dias & Gaby** e aos meus irmãos **João Paulo, Adolfo e Giorgina**, por me ajudarem a superar, a acreditar e que apesar da distância sempre estiveram presentes.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre e por tudo!

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A EMBRAPA Agroindústria Tropical, pelo material vegetal cedido.

Ao meu orientador Prof. Moacir Pasqual por acreditar no meu trabalho e pela liberdade no desenvolvimento da minha dissertação.

Aos membros da banca examinadora: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Franciane Tavares Braga e Leila Salles Pio que gentilmente aceitaram o convite de avaliação deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Fitotecnia/Produção Vegetal pelas discussões e por todos os ensinamentos repassados.

A todos dos laboratórios de Microscopia Eletrônica (DFP-UFLA); Cultura de Tecidos II (DAG-UFLA) e Citogenética (DBI-UFLA).

Meus agradecimentos em especial a “Cida” e ao Filipe que estiveram sempre ao meu lado contribuindo no desenvolvimento do meu trabalho, me dando total apoio no decorrer destes anos.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II, pelas viagens, bancadas, discussões científicas, chás e cafês.

A todos os alunos de iniciação científica, em especial a Roseneide (Rose), que compartilharam comigo o trabalho, as dúvidas, as discussões e as descobertas.

À minha irmã de república, Ana Luiza, pela amizade sincera, por estar comigo nos momentos mais difíceis. Em especial, pela ajuda e ideias concedidas para a realização deste trabalho.

Ao André (Carioca), pela ajuda concedida nas análises dos dados estatísticos.

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

*“Fiz a escalada da montanha da vida
removendo pedras e plantando flores.”*

Cora Coralina

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 propagação massal *in vitro* dessa espécie, via embriogênese somática, surgem como importantes alternativas. O objetivo deste trabalho foi propor metodologias para o cultivo *in vitro* de bastão do imperador, por meio da indução de embriogênese somática. Para o primeiro trabalho foram testados segmentos de rizoma e posições deste no meio de cultura, e inoculados em meio suplementados com 10 μ M de ANA, AIA, AIB, picloram, 2,4-D e sem auxina. Foram avaliados aos 50 dias quanto a porcentagem de indução de calos. Os resultados indicaram que o meio MS acrescido de 10 μ M de 2,4-D e o rizoma inoculado na posição vertical foram os que apresentaram maior porcentagem (100%) de indução de calos embriogênicos. No segundo trabalho, os explantes constituíram-se de segmentos de rizoma, folhas e raízes, e foram inoculados em meio suplementado com 2,4-D e picloram nas concentrações (0,0; 0,05; 0,10; 0,20 μ M). Aos 120 dias a avaliação foi realizada com relação a porcentagem de indução de calos. Os resultados indicaram que o meio de cultura com 2,4-D proporcionou a indução de calos com características embriogênicas em explantes de segmentos de rizomas. O uso de 2,4-D e picloram resultaram na formação de calos nos diferentes explantes, mas verificou-se maior quantidade de embriões somáticos nos meios suplementados com 2,4-D. Na análise ultraestrutural dos calos com características embriogênicas, verificou-se que as células possuíam formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular e na análise citoquímica, pôde-se confirmar a presença na massa do calo de células pró-embriogênicas nos explantes cultivados nos meios de cultura contendo ambos reguladores. Esses calos foram posteriormente analisados no citômetro de fluxo aos 160 dias, onde constatou que os calos induzidos pelo regulador de crescimento 2,4-D menos mixóplóides em relação ao picloram. Os resultados indicam uma variação no nível de ploidia de calos gerados a partir de explantes de segmentos de rizoma. Assim, a fonte de explante, e a integridade deste tem relação direta na variação mitótica dos calos de bastão do imperador.

Palavras-chave: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. Calos *in vitro*. Auxinas.

ABSTRACT

The species *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, popularly known as torch ginger, is an ornamental plant with excellent marketing potential. The method of division propagation by rhizome division produces a small number of seedlings. In this manner, protocols aiming at the *in vitro* massal propagation via embryogenesis, appear as important alternatives. The objective of this work was to propose methodologies for the *in vitro* cultivation of torch ginger, by means of the somatic embryogenesis induction. For the first work, rhizome segments and their position in the culture medium and inoculated in a medium supplemented with 10 μ M of ANA, AIA, AIB, picloram, 2,4-D and without auxin were tested. They were evaluated at 50 days as to the percentage of callus induction. The results pointed out that the MS medium added of 10 μ M of 2,4-D and the inoculated rhizome at the upright position were those which presented the highest percentage (100%) of embryogenic callus induction. In the second work, the explants consisted of rhizome, leaf and root segments and were inoculated in medium supplemented with both 2,4-D and picloram at the concentrations of (0.0; 1.0; 2.0; 4.0 mg L⁻¹). At 120 days, the evaluation was performed with relation to the percentage of callus induction. The results pointed out that the culture medium with 2,4-D provided the induction of calluses with embryogenic characteristics on rhizome segment explants. Use of 2,4-D and picloram resulted into the formation of calluses on the different explants, but increased amount of somatic embryos in the media supplemented with 2,4-D was found. In the ultrastructural analysis of the calluses with embryogenic characteristics, it was found that the cells possessed isodiametric shape similar to somatic embryos at the globular stage and the cytochemical analysis, the presence of the mass of the proembryogenic-celled callus on the explants grown in the culture media containing both regulators could be confirmed. Those calluses were later analyzed in the flux cytometer at 160 days, where it was found that the calluses induced by the growth regulator 2,4-D minus mixoploids in relation to picloram. The results indicate a variation in the level of ploidy of calluses generated from rhizome segment explants. So, the source of explant and the integrity of this have a direct relationship in the mitotic variation of the torch ginger.

Keywords: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. *In vitro* calluses. Auxins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Inflorescências de bastão do imperador e suas variadas cores21
- Figura 2 Explantes de plântulas de bastão do imperador, mostrando segmentos de rizoma cortados ao meio em duas partes, e inoculados em tubos de ensaio nas posições Vertical e Horizontal..... 41
- Figura 3 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..... 45
- Figura 4 Eletromicrografia 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) 47
- Figura 5 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos formados a partir de explantes de rizomas de bastão do imperador, cultivados, na posição vertical em meio de cultura contendo: A- picloram 10 μ M e B- 2,4-D 10 μ M (Barra = 10 μ m) 48
- Figura 6 Diferentes fontes de explantes, segmentos de folhas, raízes e do rizoma seccionado em três partes R1, R2 e R3, obtidos de mudas micropropagadas de bastão do imperador 58
- Figura 7 Formação de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos em explantes de bastão do imperador cultivados em meio suplementado com 2,4-D. (A e B) - estruturas globulares em segmentos de rizoma R1 cultivados em meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. (C) - prováveis embriões somáticos formados em segmentos de rizoma R1 mantidos em meio de cultura adicionado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. (D e E) - estruturas radiculares formados em segmentos radiculares, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Barra= 1 mm 69
- Figura 8 Calos embriogênicos formados a partir de segmentos de rizomas R2 em meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (A) aos 30 dias iniciando a formação de calos (seta), (B) 60 dias formação mais adiantada de calos (seta), (C) 120 dias mostrando a massa de calos

	coabrindo todo o explante e (D) detalhe de estruturas globulares no explante R2 (seta). Barra = 1 mm.....	70
Figura 9	Eletromicrografia de varredura de células de calos de bastão do imperador com estruturas globulares. (A, B e C) estrutura de embriões somáticos em estágio globular em explantes de segmentos de rizomas desenvolvidos em meio de cultura contendo 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D (seta). (D) estruturas calosas formadas em explantes de segmentos de folhas mantidos em meio de cultura adicionado de 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, detalhe do estômato (seta). (E) estruturas globulares em explantes de segmentos radiculares crescidos em meio de cultura suplementado como 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D. (F, G, H, I e J) estruturas globulares unidas por cera em explantes de segmentos de rizoma, folhas e raízes em meio de cultura acrescido de 4,0 mg L ⁻¹ de picloram.....	73
Figura 10	Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos de a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, B- rizoma R2 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, C- rizoma R3 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, D- rizoma R1 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram, E- rizoma R2 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram e F- rizoma R3 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram (Barra: 1mm).....	75
Figura 11	Análise citoquímica com lugol em calos embriogênicos de a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, B- rizoma R2 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, C- rizoma R3 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, D- rizoma R1 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram, E- rizoma R2 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram e F- rizoma R3 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram....	77
Figura 12	Análise citoquímica com Sudan IIII em calos embriogênicos de bastão do imperador a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, B- rizoma R2 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, C- rizoma R3 em 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D, D- rizoma R1 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram, E- rizoma R2 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram e F- rizoma R3 em 4,0 mg L ⁻¹ de picloram	78
Figura 13	Procedimento adaptado para a obtenção de núcleos isolados a partir de calos para a citometria de fluxo.....	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R1) de bastão do imperador, cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de inoculação <i>in vitro</i> no escuro.....	64
Gráfico 2	Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R2) de bastão do imperador cultivado em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> , no escuro.....	65
Gráfico 3	Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R3) de bastão do imperador cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> no escuro.....	66
Gráfico 4	Porcentagem de formação de calos em segmentos de raiz de bastão do imperador cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> , no escuro.....	67
Gráfico 5	Histogramas de citometria de fluxo em bastão do imperador. A- Planta matriz; B- Planta <i>in vitro</i> ; C- Calo estável e D- Calos mixoplóides.....	92

LISTA DE TABELAS

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	44
Tabela 2	Interação para porcentagem de explantes oxidados em meio de cultura contendo diferentes tipos de auxinas e posições do explante*	46
Tabela 3	Estimativas das quantidades de DNA para plantas e calos e bastão do imperador, analisados por citometria de fluxo	91
Tabela 4	Porcentagem de calos estáveis e mixoploides nos reguladores de crescimento 2,4-D e picloram de bastão do imperador	93

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	16
1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	<i>Etilingera elatior</i>	19
2.2	Propagação	22
2.3	Propagação <i>in vitro</i>	22
2.4	Reguladores de crescimento	24
2.5	Explantos	25
2.6	Embriogênese somática	26
2.7	Técnicas utilizadas para estudos de embriogênese somática	28
2.7.1	Microscopia eletrônica	28
2.7.2	Análises citoquímicas	28
2.7.3	Citometria de fluxo	29
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 2 Indução de calos embriogênicos em bastão do imperador, em função do tipo de auxina e da posição de inoculação do explante	36
1	INTRODUÇÃO	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Indução de calos embriogênicos a partir de rizomas de bastão do imperador	40
2.2	Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
2.1	Indução de calos embriogênicos a partir de rizomas de bastão do imperador	43
	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
	CAPÍTULO 3 Potencial embriogênico de calos em bastão do imperador	52
1	INTRODUÇÃO	54
2	MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1	Indução de calos embriogênicos a partir de explantes de folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador	57
2.2	Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador	59
2.3	Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans	60
2.4	Análise citoquímica com Lugol	61
2.5	Análise citoquímica com Sudan III	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63

3.1	Indução de calos embriogênicos a partir de explantes de folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador	63
3.2	Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador	72
3.3	Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans	74
3.4	Análise citoquímica com Lugol.....	76
3.5	Análise citoquímica com Sudan III	77
	CONCLUSÕES.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	CAPÍTULO 4 Análise da ploidia por citometria de fluxo em calos embriogênicos de bastão do imperador	85
1	INTRODUÇÃO.....	87
2	MATERIAL E MÉTODOS	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXOS.....	98

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A floricultura, em seu sentido mais amplo, abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. É um setor agrícola altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas, conhecimento técnico pelo produtor e, principalmente, um sistema eficiente de distribuição e comercialização de seus produtos (SILVEIRA, 1993).

Apesar de ser uma atividade recente, e até o final da década de 50, pouco expressiva, tanto econômica como tecnologicamente, a produção brasileira vem se desenvolvendo rapidamente com o surgimento e a adoção de novas tecnologias, tanto nos sistemas de produção quanto de pós-colheita. Além disso, as extraordinárias condições de produção do nosso país, dotado de diversidade de solo e clima, permitem o cultivo de um infinito número de espécies de flores e plantas ornamentais de comprovada qualidade e beleza, conferindo ao produto brasileiro, como as flores tropicais, condições de conquistar espaço e se firmar também no mercado mundial (GRAZIANO, 2003).

As exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais somaram, em 2009, US\$ 31.137 milhões, valor que representou uma queda substancial de 12,30% em relação ao desempenho do ano anterior. Tal resultado era aguardado, tendo em vista os efeitos da crise econômica e financeira internacional que abalou sensivelmente os principais mercados importadores da floricultura

nacional, como os EUA, os países da União Européia e o Japão (JUNQUEIRA; PEETZ, 2010).

Embora nos países desenvolvidos o consumo per capita seja elevado, a maioria apresenta limitações para o cultivo de flores tropicais devido às condições climáticas desfavoráveis ou exigüidade do território, o que vem incentivando cada vez mais a produção destas flores no Brasil, principalmente nas regiões Nordeste, Norte e Sul pelo clima, disponibilidade de terra, água, energia e mão-de-obra (FERREIRA et al., 2002).

Em Minas Gerais, o mercado de produção e de comercialização de flores, tanto de clima temperado quanto de clima tropical, é bastante promissor, devido à sua diversidade climática. A produção está distribuída em todas as regiões do estado, porém, para as flores tropicais, duas se destacam, a região Norte e a Zona da Mata (LUZ et al., 2010; LANDGRAF; PAIVA, 2005).

As principais espécies de flores tropicais cultivadas no Brasil pertencem às famílias Araceae, Heliconiaceae, Musaceae e Zingiberaceae, que vegetam naturalmente ou são exploradas em plantios convencionais na faixa tropical da América, Ásia e Pacífico Oeste (ASSIS et al., 2002). São plantas herbáceas, rizomatosas, perenes de reduzido porte ou arborescentes, caracterizadas por suas brácteas de cores e formas variadas, maior durabilidade pós-colheita, de grande beleza, utilizadas para a ornamentação de ambientes.

Dentre estas plantas, destaca-se a propagação e cultivo do gênero *Etilingera*, pertencente à família Zingiberaceae, destacando-se o bastão do imperador *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith. Sua propagação ocorre, basicamente, por divisão de touceiras rizomatosas e sementes. Devido ao uso desta prática de propagação vegetativa tradicional, é preocupante a disseminação de pragas e doenças, causadas por agentes fitopatogênicos (LINS; COELHO, 2004).

A utilização da propagação *in vitro* em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo. Os laboratórios comerciais surgiram, em grande maioria, agregados aos viveiros como iniciativa das próprias companhias produtoras de mudas. Com objetivo de atender às necessidades internas de material de propagação livre de doenças, ou de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Na busca de novas tecnologias para o constante aprimoramento da clonagem de plantas, vem se utilizando, como forma de propagação *in vitro*, a embriogênese somática, que tem despertando interesse especial por parte de instituições de pesquisa e empresas brasileiras, que possuem avançados programas de melhoramento genético e de clonagem (TITON et al., 2007). Além disso, este sistema vem sendo bastante utilizado para a propagação massal de plantas elites, apresentando grande potencial, pois possibilita elevadas taxas de multiplicação (GUPTA et al., 1993).

Com base no exposto, a embriogênese somática é uma alternativa viável e segura para a produção em larga escala de mudas isentas de patógenos. Além de ampliar a possibilidade de estudos para o melhoramento genético, como também, a obtenção de novas variedades.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Etilingera elatior*

A espécie *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith, popularmente conhecida como bastão do imperador, foi descrita, pela primeira vez, por Giseke (1972). Na época, houve certa contradição em relação ao gênero ao qual pertencia, recebendo várias classificações, como: *Alpinia*, *Phaeomorpha*, *Nicolaia* e *Elettaria*. Segundo Smith (1981), do Botanic Gardens Real Edinburgh, no Reino Unido, incluiu a espécie no gênero *Etilingera*. Desde então, o pesquisador Axel Dalberg Poulsen, do National Herbarium of the Netherlands, na Holanda, dedicou os seus estudos a esta planta, relatando a existência de pelo menos 70 espécies, muitas ainda não descritas, que estão distribuídas desde a Índia até as Ilhas do Pacífico (POULSEN, 2006).

Também conhecido por gengibre-tocha ou flor-da-redenção, o bastão do imperador é uma planta ornamental com excelentes perspectivas de comercialização, principalmente como flor para corte, podendo também ser utilizado na composição paisagística. Consta que a variedade vermelha era usada nas festas religiosas do Peru. Quanto à flor rósea, existem relatos de que ela foi ofertada à Princesa Imperial D. Isabel de Bragança, logo após assinar a Lei Áurea, em 13 de maio de 1888, cujo fato deu a origem ao seu nome popular, bastão do imperador (LAMAS, 2002).

Devido à beleza de sua inflorescência, o bastão do imperador tem sido comercializado como flor de corte, com grande aceitação tanto no mercado nacional quanto internacional, e para utilização na ornamentação de jardins, praças e bosques (CASTRO, 1998). Segundo Terao, Carvalho e Barroso (2005), esta espécie tem sido cultivada tanto como flor de corte quanto para o paisagismo. Apresenta inflorescências cônicas, formadas em hastes diretamente

do solo, que podem atingir até 2 metros de altura. As hastes vegetativas apresentam folhagem grande e vistosa, com coloração que varia de verde a marrom avermelhada, com porte de 3 a 6 metros de altura.

As flores e os brotos, também são comestíveis e fazem parte da culinária de diversos países asiáticos, onde são fatiados finamente e somados a vários pratos, dando um sabor picante pungente, diferente do gengibre comercial (LAMAS, 2002). Já para Joly (1998), a espécie *Etilingera elatior* pode ser considerada como planta ornamental e medicinal, sendo indicada na medicina popular para o tratamento de dores musculares e reumatismo.

As flores, de coloração vermelha, rosa, branca e amarela e combinações dessas cores, que se abrem no interior das brácteas das inflorescências (Figura 1), tornam esse gênero um dos mais bonitos da família Zingiberaceae (BEZERRA et al., 2005).



Figura 1 Inflorescências de bastão do imperador e suas variadas cores

As variedades de *E. elatior* podem ser distinguidas pela coloração. Segundo Eksomtramage et al. (2001), o número de cromossomos da *Etilingera elatior* var. Porcelana, é de $2n=48$. Para Eksomtramage et al. (2002), o número de cromossomos da *E. elatior* var. Branca, também é de $2n=48$. Sugerindo que essas duas variedades de *Etilingera* podem diferir-se apenas por um gene de codificações de cores. Já para Fereol, Luc-Cayol e Guitteaud (2010), plantas de

E. elatior var. Porcelana têm o número de cromossomos igual a $2n= 4x= 48$ (Tetraplóide).

A demanda interna e externa pelo bastão do imperador, como flor de corte, tem sido crescente e a cada dia se sedimenta no mercado internacional em função do aumento da área de produção nos países das Américas Central e do Sul, proporcionando uma maior oferta do produto e sua divulgação (CASTRO, 1995).

2.2 Propagação

A propagação das espécies do gênero *Etilingera* pode ser por sementes, formadas em cápsulas arredondadas ou alongadas nas inflorescências, que se rompem quando estão maduras e prontas para dispersão (BEZERRA et al., 2005).

Normalmente, a propagação adotada é por divisão de touceira, garantindo que a futura planta será igual à que lhe deu origem. Nas condições do Nordeste brasileiro, com menos de um ano após o plantio do rizoma, a planta inicia o florescimento, que ocorre durante todo o ano, principalmente nos meses mais quentes (BEZERRA et al., 2005).

Estes sistemas de propagação vegetativa, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis, apresentam sérios riscos de disseminação de pragas e doenças que podem comprometer a produção e, conseqüentemente, a comercialização do produto final (CASTRO, 1995).

2.3 Propagação *in vitro*

As plantas ornamentais formam, por excelência, o grupo de plantas em que a aplicação da propagação *in vitro* teve uma expressão significativa no

mundo científico, com repercussão direta na economia. O incentivo para esse crescimento fundamenta-se no alto valor agregado ao produto final (BOSA et al., 2003), visto que as ornamentais, em especial o bastão do imperador, são acometidas por diversas doenças, levando a prejuízos na produção, por se tratar de um produto cuja aparência é o principal fator.

De acordo com Lins e Coelho (2004), os agravantes para a disseminação de doenças em plantas ornamentais são o clima quente e úmido e as frequentes precipitações, além da utilização de mudas não certificadas, aumentando, assim, a incidência e a severidade dos problemas fitossanitários na região Nordeste.

A propagação *in vitro* apresenta-se como uma técnica alternativa para solucionar estes problemas. É uma modalidade da cultura de tecidos vegetais bem difundida e concentra-se na produção comercial de plantas, possibilitando sua multiplicação rápida, mantendo a identidade genética do material propagado, com elevada qualidade fitossanitária e em períodos de tempo e espaço reduzidos. Na área de plantas ornamentais, predominam plantas híbridas, e a clonagem *in vitro* tem permitido a uniformização de características, tais como: época de floração, coloração, tamanho, forma das flores, entre outras (FUZITANI; NOMURA, 2004).

Recentemente, diversas técnicas de biotecnologia são utilizadas em trabalhos de melhoramento com flores tropicais, podendo-se destacar a micropropagação *in vitro*, através de germinação de sementes, resgate de embriões zigóticos, cultivo de ápices caulinares e viabilidade de grãos de pólen em espécies da família Zingiberaceae. Segundo Rescarolli e Zaffari (2009), é possível a multiplicação *in vitro* de *E. elatior*, a partir de gemas laterais, visando a produção massal de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, como fonte de matéria-prima para utilização terapêutica.

2.4 Reguladores de crescimento

As auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Tem sido sugerido que são necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Entre as auxinas, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tende a estimular a formação de calos, mesmo em baixas concentrações, enquanto que o ácido indolbutírico (AIB) é uma auxina muito eficaz para a indução de enraizamento. O ácido 3-indolacético (AIA) é, de todas, a auxina menos estável em condições de meio de cultura devido à fotoxidação e à ação da AIA oxigenase nos tecidos do explante. Em virtude dessa característica, o AIA pode ser indicado para uso no início do cultivo, pois ele poderia suprir as necessidades iniciais do explante sem, contudo, ter um efeito excessivamente prolongado, que resultaria na formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

O ácido naftalenoacético (ANA) é bastante utilizado em meios de isolamento dos explantes, porém, se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligrama, tende a estimular a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Segundo Titon et al. (2007), a auxina ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) foi promissor no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para *Eucallyptus*.

Por estas razões, esses reguladores de crescimento são investigados com frequência em espécies de importância econômica como indutores de embriogênese somática.

2.5 Explantes

Explantes de mudas desenvolvidas *in vitro* apresentam algumas vantagens do ponto de vista experimental na determinação de um protocolo de propagação para uma espécie, quando comparados com aqueles obtidos de plantas propagadas vegetativamente *in vitro*. A grande disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores dos tecidos juvenis permitem à condução de inúmeros testes de meios nutritivos e condições ambientais de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Em geral, quase todas as partes da planta podem ser usadas na indução da embriogênese somática, como: ápices caulinares, hipocótilos, discos e segmentos foliares, inflorescências, raízes dentre outras. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), a fonte de variação do crescimento *in vitro* entre os explantes pode estar relacionada com o seu tamanho e com a sua posição, quando seccionado do explante de origem.

Em batata-doce, cultivar White Star, os ápices caulinares são excelentes explantes para indução da embriogênese somática, por apresentarem alta frequência de produção de calos embriogênicos (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998). Domingues, Tulmann Neto e Mendes (1996), relatam que, regiões situadas próximas ao meristema apical (constituídas de tecidos do rizoma e pseudocaule) de plântulas de bananeira responderam melhor à indução de estruturas embriogênicas. Uma vantagem adicional desse explante (meristema apical) é a possível manutenção da identidade genética do material a ser propagado (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

2.6 Embriogênese somática

Culturas embriogênicas são geralmente iniciadas a partir de explantes cotiledonares, juvenis ou maduros cultivados em meios semi-sólidos, contendo altos níveis das auxinas ANA, 2,4-D, e Picloran com ou sem uma das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilamonopurina (CIN) e 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia (Tidiazuron) . Em modelos diretos, a primeira expressão morfo genética é o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas que correspondem a embriões somáticos globulares. Em modelos indiretos, inicialmente há a diferenciação de calo e o surgimento neste de setores friáveis, normalmente brancos e translúcidos, convencionalmente designados de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos , os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

As citocininas podem favorecer a produção de calo embriogênico mas, em algumas famílias, elas parecem não ser necessárias. Entretanto, baixas concentrações destes reguladores de crescimento são necessários para a indução de embriogênese somática na maioria das culturas de células (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Dentre as técnicas de propagação *in vitro* destacam-se a embriogênese somática utilizando explantes de mudas obtidas *in vitro*, como alternativa viável para contornar o problema de contaminação endofítica (ATEHORTUA et al., 1999).

A embriogênese somática, também conhecida como embriogênese adventícia ou assexual, é o processo pelo qual células haplóides ou somáticas se desenvolvem através de diferentes estádios embriogênicos dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (WILLIANS; MAHESWARAN, 1986).

De modo geral, os processos de indução e iniciação de embriões somáticos são realizados no escuro, tendo em vista que a luz afeta o desenvolvimento dos embriões somáticos somente após a iniciação. Esforços para induzir a embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico, em que as metodologias utilizadas envolvem mudanças na composição do meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento e outras condições de cultura, como a densidade de células, nutrientes e iluminação (SILVA JÚNIOR, 2007).

Contudo, o sucesso da produção em larga escala depende do ajuste de um protocolo adequado para cada uma das técnicas e, conseqüentemente, para cada espécie ou variedade a ser multiplicada *in vitro* (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

Na literatura não existem relatos de embriogênese somática em *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith. Os trabalhos mais realizados até o presente momento são os de, contagem de cromossomos (EKSOMTRAMAGE et al., 2001), viabilidade polínica (OLIVEIRA, 2007), obtenção de protoplastos (SILVA JÚNIOR, 2007), análise de óleos essenciais (JAAFAR et al., 2007), antracnose (FERRARI, 2008), aclimatização (ASSIS et al., 2009), produção de mudas *in vitro* (RESCAROLLI; ZAFFARI, 2009) e deficiência nutricional (FRAZÃO et al., 2010) entre outros.

Considerando a crescente importância das espécies do gênero *Etilingera* e as vantagens das técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, torna-se necessária a realização de estudos que avaliem essas técnicas de propagação *in vitro*, na tentativa de solucionar o problema da demanda de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith var. Porcelana com alta qualidade fitossanitária.

2.7 Técnicas utilizadas para estudos de embriogênese somática

2.7.1 Microscopia eletrônica

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi introduzido como instrumento de pesquisa por volta de 1950 e sua utilização trouxe contribuições significativas ao conhecimento humano ao possibilitar a visualização de detalhes jamais antes visualizados nas áreas biológica e da ciência de matérias. Na mesma época surge a microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qual causou uma segunda revolução no estudo do mundo microscópico, devido à alta profundidade de campo, conferindo aspecto tridimensional às imagens (ALVES, 2004).

Características morfológicas de células embriogênicas são observadas pela análise ultraestrutural, por meio de MEV. Esta análise tem sido descrita em estudos de embriogênese somática para diferentes espécies, como em murici-pequeno, *Byrsonima intermédia*, helicônia (*Heliconia chartaceae*) (NOGUEIRA et al., 2007; ULISSES et al., 2010). Este tipo de microscopia bastante adequado para análise da superfície das células, demonstrando aspectos tridimensionais da morfologia externa das mesmas.

Muitas estruturas celulares e macromoléculas que possuem dimensões na casa dos nanômetros, como por exemplo, mitocôndrias, membranas, entre outras podem ser visualizados em MET, como em murici-pequeno (NOGUEIRA et al., 2007).

2.7.2 Análises citoquímicas

Células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético. Em estudos citoquímicos, o carmim acético é utilizado para detectar

glicoproteínas, cromatina e DNA (DURZAN, 1988), macromoléculas abundantes nas células embriogênicas. Neste sentido, avaliações histológicas são úteis para caracterizar a ontogenia dos embriões, verificar a origem dos mesmos, constatar a presença de embriogênese repetitiva e as possíveis causas da falta de conversão dos embriões em plantas.

Esta distinção é possível, pois células embriogênicas que apresentam citoplasma denso são isodiamétricas e reativas ao carmim acético, resultando em coloração avermelhada. Associa-se a essa reação com a competência celular para o desenvolvimento embriogênico e a integridade cromossômica (DURZAN, 1988; MUNHOZ et al., 2008; STEINER et al., 2005).

Testes com outros corantes como lugol e sudan III são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica em *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith (OLIVEIRA, 2007) e em outras espécies como a *Leymus chinensis* (HUANG et al., 2004).

2.7.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas, etc.) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (DOLEZEL, 1997). Essas partículas intersectam uma a uma, um feixe de laser ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Esse princípio pode ser usado, por exemplo, para medir a quantidade de DNA de uma célula (DOLEZEL; BARTOS, 2005). Em plantas, é possível obter milhões de núcleos em suspensão a partir de poucas gramas de tecido foliar em um procedimento relativamente simples que envolve a maceração desse tecido em um tampão que mantém a integridade nuclear (GALBRAITH et al., 1983). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídio, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, entre elas, estimativa do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidias, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

A citometria de fluxo é uma ferramenta importante nesta área, uma vez que a estimativa do nível de ploidia, por meio da contagem de cromossomos é muitas vezes de difícil realização, como em culturas *in vitro*, que são normalmente caracterizadas por baixa atividade mitótica (DOLEZEL, 1997). A maioria dos estudos é focada sobre o efeito das condições de cultivo e o envelhecimento na estabilidade do nível de ploidia dos regenerantes, a fim de atestar a adequação de um protocolo em larga escala, na propagação de genótipos selecionados (LOUREIRO, 2007).

A análise do nível de ploidia também é importante na genética de experimentos de transformação, ou seja, para seleção de explantes adequados e para minimizar a formação de transformantes poliplóides (CHEN et al., 2001; ELLUL et al., 2003).

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2004. 43 p.
- ASSIS, A. M. et al. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009.
- ASSIS, S. M. P. et al. **Doenças e pragas de helicônias**. Recife: UFRPE, 2002. 102 p.
- ATEHORTUA, L. et al. *Heliconia* tissue culture. **Bulletin of Heliconia Society Internacional**, Miami, v. 9, n. 4, p. 16-17, Apr. 1999.
- BEZERRA, F. C. et al. **Flores tropicais (Tropical flowers)**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p. 86-101.
- BOSA, N. et al. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 514-519, jul./set. 2003.
- CASTRO, C. E. F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 4, n. 1/2, p. 1-46, mar. 1998.
- CASTRO, C. E. F. de. **Helicônia para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: [s.n.], 1995. 44 p. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16).
- CHEN, L. F. O. et al. Transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italica) with isopentenyltransferase gene via *Agrobacterium tumefaciens* for post-harvest yellowing retardation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.7, n. 3, p. 243-257, Sept. 2001.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

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.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops.

Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, Newcastle Upon Tyne, v. 6, n. 11, p. 341-378, 1988.

EKSOMTRAMAGE, L. et al. Chromosome counts of some Zingiberaceous species from Thailand. **Short Communication**, Hat Yai, v. 24, n. 2, p. 312-319, Apr./June 2002.

EKSOMTRAMAGE, L. et al. Chromosome numbers of some monocot species from Ton-Nga-Chang Wildlife Sanctuary, Southern Thailand. **Thai Forest Bulletin (Botany)**, Bangkok, v. 29, p. 63-71, Jan. 2001.

ELLUL, P. et al. The ploidy level of transgenic plants in agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 2/3, p. 231-238, Feb. 2003.

FEREOL, L.; LUC-CAYOL, F.; GUITTEAUD, M. Use of intergeneric hybridization and mutagenesis to go ahead to new colours of alpinia purpurata (Ginger lily). In: INTERNATIONAL EUCARPIA SYMPOSIUM, 23., 2010, Leiden. **Anais...** Leiden: ISHS, 2010. p. 131-136.

FERRARI, J. T. Antracnose em bastão do imperador. **Documentos Técnicos**, São Paulo, n. 003, p. 1-6, ago. 2008. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/docs/dt/antracnose.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2010.

FERREIRA, A. et al. Diagnóstico da floricultura em Pernambuco. In: _____. **Floricultura em Pernambuco**. Recife: SEBRAE, 2002. p. 21-59. (Série Agronegócio).

FRAZÃO, J. E. M. et al. Deficiência nutricional em bastão-do-imperador (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith): efeito na produção de matéria seca e índices biométricos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 294-299, mar./abr. 2010.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.10, n.1/2, p.14-17, 2004.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GISEKE, P. D. **Praelectiones in ordines naturales plantarum**. Hamburg: Paulus, 1972. v. 8, p. 32.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. A. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-200.

GRAZIANO, T. T. Melhoria de plantas ornamentais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1 CD-ROM.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAP, 1999. v. 2, p. 533-568.

GUPTA, P. K. et al. Forestry in the 21st century. **Nature Biotechnology**, New York, v. 11, n. 4, p. 454-459, Apr. 1993.

HUANG, Z. et al. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, London, v. 93, n. 3, p. 295-301, Mar. 2004.

JAAFAR, F. M. et al. Analysis of essential oils of leaves, stems, flowers and rhizomes of *etlingera elatior* (Jack) R. M. Smith. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, Malaysia, 11, n. 1, p. 269-273, Apr. 2007.

JOLY, A. B. **Botânica: uma introdução à taxonomia vegetal**. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira: balanço 2009 e perspectivas 2010. In: _____. **Horticultura consultoria e treinamento**, São Paulo, 2010, p. 1-7. Disponível em: <<http://www.hortica.com.br/artigos/2010_Analise_Conjuntural_do_Comercio_Exterior.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

LAMAS, A. da M. **Floricultura tropical: técnicas de cultivo**. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 86 p. (Série Empreendedor, 5).

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. de O. Produção e comercialização de flores em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 7-11, 2005.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 332-335, maio/jun. 2004.

LOUREIRO, J. C. M. **Flow cytometric approaches to study plant genomes**. 2007. 268 p. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Avieiro, Portugal, 2007.

LUZ, P. B. da et al. **Cultivo de flores tropicais**. Disponível em: <http://www.artigocientifico.com.br/uploads/artc_1166065542_47.pdf>. Acesso em: 25 maio 2010.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, jun. 2008.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Bysonima intermédia* a. Juuss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, jul. 2007.

OLIVEIRA, J. F. **Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

POULSEN, O. D. ***Etilingera* of Borneo**. Borneo: Natural History, 2006. 263 p.

RESCAROLLI, C. L. S.; ZAFFARI, G. R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 190-195, 2009.

SILVEIRA, R. B. de A. **Floricultura no Brasil**: pesquisa na UESB. 1993. Disponível em: <<http://www.uesb.br/flower/florbrasil.html>>. Acesso em: 17 abr. 2009.

SILVA JÚNIOR, J. M. [***Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith**]: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos. 2007. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SMITH, R. M. **Synoptic keys to the genera of zingiberaceae pro parte.** Edinburgh: Royal Botanic Garden, 1981. p. 28.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

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

TITON, M. et al. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-116.

ULISSES, C. et al. 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, Jan./Feb. 2010.

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, Apr. 1986.

CAPÍTULO 2

Indução de calos embriogênicos em bastão do imperador, em função do tipo de auxina e da posição de inoculação do explante

RESUMO

Com o objetivo de obter calos embriogênicos, foram avaliadas diferentes auxinas e posições de inoculação dos explantes. Rizomas, com aproximadamente 0,5cm, obtidos a partir de mudas micropropagadas, foram cortados longitudinalmente ao meio e inoculados em tubos de ensaio, contendo 10mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5,5 g L⁻¹ de ágar, pH ajustado para 5,8 e autoclavados a 121 °C, 1,1 atm durante 20 minutos. Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento, 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 de 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 foram constatados 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: Zingiberaceae. *Etiligera elatior*. Propagação *in vitro*.

ABSTRACT

With the purpose of obtaining embryogenic calluses, different auxins and inoculation position of the explants were evaluated. Rhizomes of about 0.5cm obtained from micropropagated seedlings were cut lengthwise at half and inoculated in test tubes containing 10mL of MS medium, supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, 5.0g L⁻¹ of agar, pH adjusted to 5.8 and autoclaved at 121 °C, 1.1 atmosphere for 20 minutes. After inoculation, the cultures were kept in growth room at 25±2°C in the dark. 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 10µM and a control (without auxin) and two explant positions (H-horizontal and V-vertical). The experiment was constituted of five replicates with three tubes each containing one explant. After 50 days' cultivation, both the percentage of oxidation and callus formation were evaluated. The data were transformed to $\sqrt{x+0.5}$ and studied by utilizing the SISVAR program and the means compared by the Skott-Knott test at 5% of probability. In the culture medium added of 1,4-D, all the explants formed calluses. The explants inoculated in the culture medium containing picloram did not differ statistically with 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 statistic difference among the treatments, but on those added of 2,4-D, ANA and AIA at the upright position, no oxidation as found. So, the MS medium added of 10µM of 2,4-D and the rhizome inoculated at the upright position were the ones which presented highest percentage (100%) of embryogenic callus induction.

Keywords: Zingiberaceae. *Etiligera elatior*. *In vitro* propagation.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil se consolida no cenário mundial da floricultura, tanto na produção de espécies temperadas quanto na de 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, CARVALHO; BARROSO, 2005).

Os produtos da floricultura tropical, geralmente classificados como exóticos e constituídos principalmente por helicônias, alpínias, 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; CARVALHO; BARROSO, 2005).

As mudas de bastão do imperador são obtidas por propagação vegetativa pelo processo de divisão de touceiras ou por 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 determinadas espécies com características agronômicas desejáveis, recuperando plantas livres de pragas e doenças e já tem se mostrado opção viável para algumas espécies da família Zingiberaceae (DEBIASE; FELTRIN; MIACHIR, 2004; MELLO; AMARAL; MELO, 2000; MICHELUZZI, 2004).

As técnicas de cultura *in vitro* são importantes, uma vez que podem ser aplicadas em estudos de melhoramento de plantas por meio de hibridação somática e obtenção de plantas transgênicas (JONA, 1987).

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 morfogênético 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.

Assim, o objetivo desse trabalho foi induzir a formação de calos embriogênicos em *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith var. Porcelana, em função da posição de inoculação do explante e do tipo de auxina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos embriogênicos a partir de rizomas de bastão do imperador

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Como fonte de explantes, foram utilizadas mudas estabelecidas *in vitro* a partir de meristemas caulinares de bastão do imperador *Etilingera 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. Após 2 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. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Rizomas, com aproximadamente 0,5 cm, foram cortados ao meio e inoculados em 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, 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 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro. A avaliação foi realizada 50 dias após inoculação, observando-se a porcentagem de explantes que oxidaram e com a formação de calos.

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

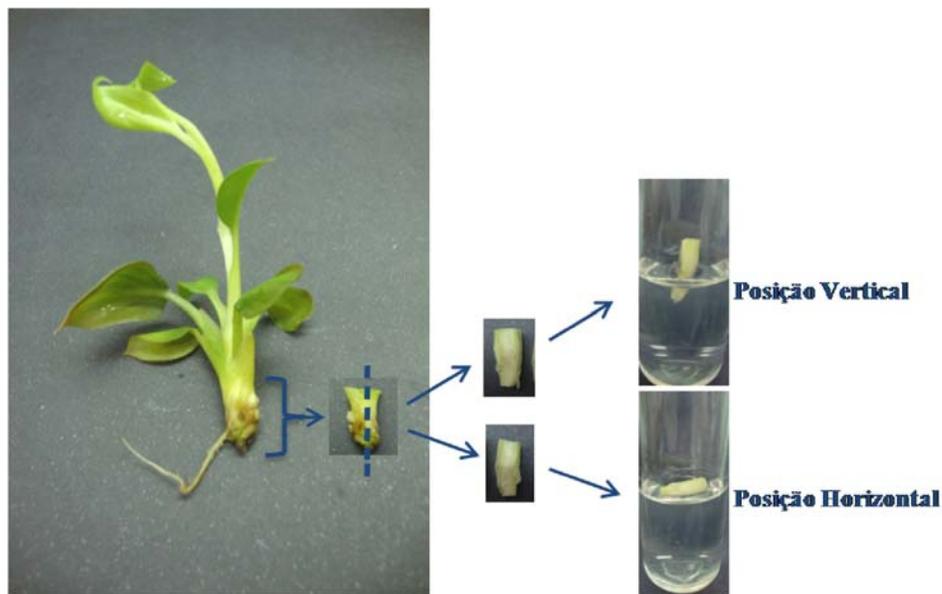


Figura 2 Explantes de plântulas de bastão do imperador, mostrando segmentos de rizoma cortados ao meio em duas partes, e inoculados em tubos de ensaio nas posições Vertical e Horizontal

2.2 Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador

Para a realização de análise ultraestrutural, 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.

Já 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, no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Indução de calos embriogênicos a partir de rizomas de bastão do imperador

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. Já para os explantes inoculados na posição horizontal, apenas 53% formaram calos. Ao contrário, Miachir et al. (2004) trabalhando com açafrão (*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, Tulmann Neto e Mendes (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, Lesney e Rockwood (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 3). A calogênese ocorreu na região meristemática, devido aos cortes realizados nos explantes, que permitiram o contato desta região com o meio de cultura.

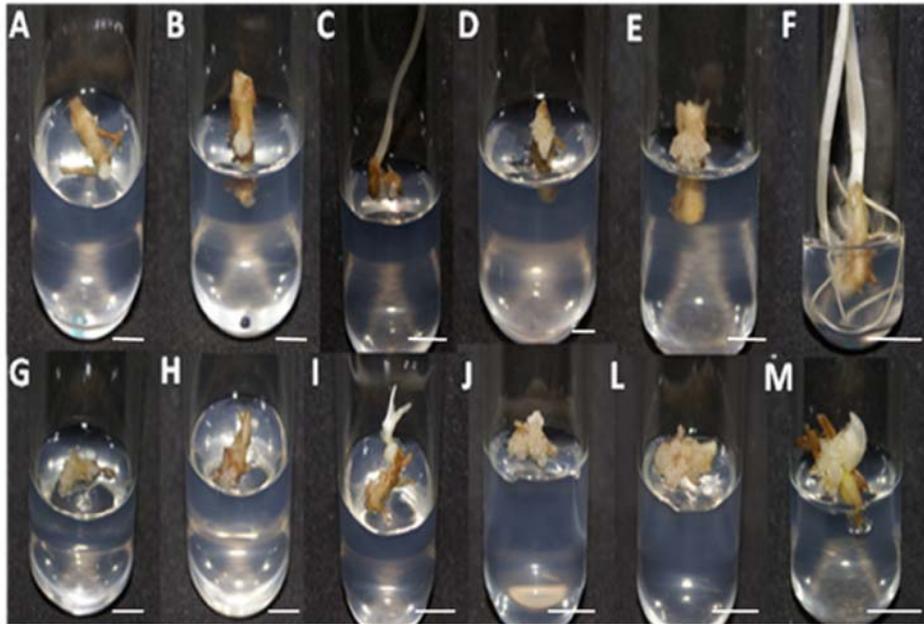


Figura 3 Indução de calos em explantes de bastão do imperador, cultivados em duas posições, vertical (V) e horizontal (H), em meio de cultura contendo diferentes auxinas. A- ANA-V; B- AIB-V; C- AIA-V; D- 2,4-D-V; E- picloram-V; F- MS0-V; G- ANA-H; H-AIB-H; I- AIA-H; J- 2,4-D-H; L-picloram-H e M-MS0-H 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

2.2 Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador

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 4 A, B, C e D), o que segundo Appezzato-da-Glória e 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 4 A e D).

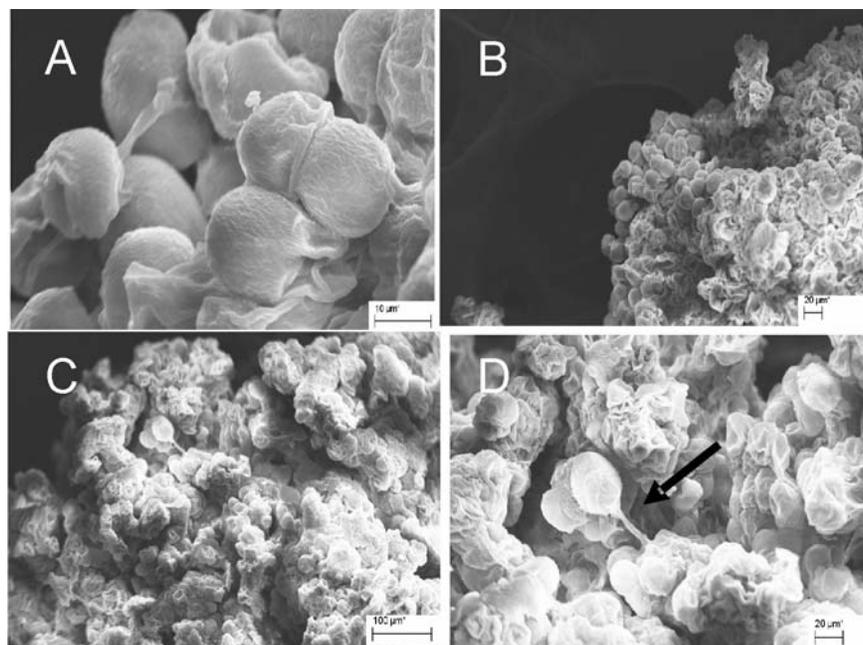


Figura 4 Eletromicrografia de varredura de células de calos de bastão do imperador. A) Calos formados nos explantes, inoculados na posição vertical, mantidos no tratamento com 2,4-D em formato arredondado, B) Estruturas globulares, observadas em calos obtidos no tratamento com 2,4-D, C) Estrutura com 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. Na figura abaixo, células de calos induzidos a partir de rizomas apresentaram reação positiva ao corante carmim (Figura 5). A

reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular (STEINER et al., 2005).

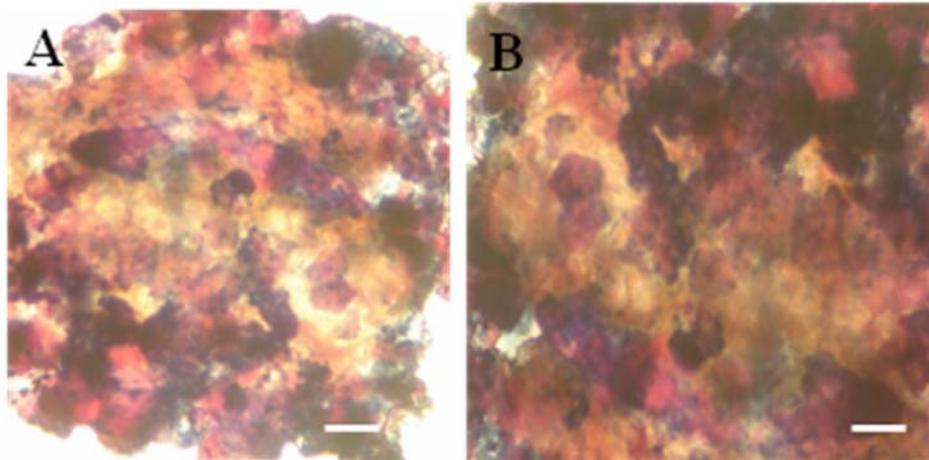


Figura 5 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos formados a partir de explantes de rizomas de bastão do imperador, cultivados, na posição vertical em meio de cultura contendo: A- picloram 10 μ M e B- 2,4-D 10 μ M (Barra = 10 μ m)

Como indicadores de uma segunda fase de experimentos, sugere-se novamente o uso dos melhores reguladores de crescimento por serem os que obtiveram os melhores resultados na formação de calos embriogênicos.

3 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 das auxinas ANA, AIA, 2,4-D e picloram.

O meio MS acrescido de 10µM de 2,4-D e picloram, e o segmento de rizoma inoculado na posição vertical são os que apresentaram maiores porcentagens de indução de calos.

Explantos de segmentos de rizomas de bastão do imperador, cultivados *in vitro* os 50 dias, apresentam potencial morfogenético para a formação de embriões somáticos.

REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

DEBIASE, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de 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, 575 p.

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. 41 p.

GUERRA, M. P. **Protocolo para visualização de pró-embrião somático**. Florianópolis: UFSC, 2001. 35 p. Apostila.

HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite eucalyptus *gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, Sept. 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, Feb. 1987.

LAMAS, A. da 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, oct./dez. 2000

MIACHIR, J. I. et al. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoria* Roscoe. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 427-432, July/Aug. 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, July 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, Mar. 1998.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROSO, T. C. da 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. et al. 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, Jan./Feb. 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, Dec. 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, Apr. 1986.

CAPÍTULO 3

Potencial embriogênico de calos em bastão do imperador

RESUMO

O bastão do imperador *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith é uma planta tropical herbácea, rizomatosa e perene que possui inflorescências belas e vistosas em diferentes tonalidades, possuindo um grande apelo ornamental. Um grande problema para o seu cultivo está na produção de mudas, em grande quantidade, que, feita convencionalmente por divisão de touceiras, acarretando elevados custos e problemas fitossanitários. Não existe relato na literatura de estudos sobre a indução de calos, nesta espécie. O presente trabalho teve por objetivo estudar a indução de calos embriogênicos, visando posterior regeneração de plantas como uma alternativa para a produção de mudas de bastão do imperador. Foram utilizados como explantes segmentos de rizomas, folhas e raízes provenientes de mudas *in vitro*. Os diferentes explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com ágar e duas auxinas, em diferentes concentrações. Estudou-se o efeito do 2,4-D e picloram nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. Foram realizadas análises ultra-estruturais por meio de microscopia de varredura e citoquímicas, por meio de teste com carmim, lugol e sudan III, para os calos com características embriogênicas formados nos diferentes explantes. Os resultados indicam que o meio de cultura com 2,4-D proporcionou a indução de calos com características embriogênicas em explantes de segmentos de rizomas. O uso de 2,4-D e picloram resultaram na formação de calos nos diferentes explantes, mas verificou-se maior quantidade de embriões somáticos nos meios suplementados com 2,4-D. Na análise ultraestrutural dos calos com características embriogênicas, verificou-se que as células possuíam formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular e na análise citoquímica, pôde-se confirmar a presença na massa do calo de células pró-embriogênicas nos explantes cultivados nos meios de cultura contendo ambos reguladores.

Palavras-chave: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. Viabilidade.

ABSTRACT

Torch ginger *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith is a tropical herb-like, rhizome-like and perennial plant which possesses inflorescences both pretty and showy at different shades, possessing a great visual appeal. A great problem to its cultivation is in seedling production in great amount, which, done conventionally by division of tussocks, bringing about high costs and phytosanitary problems. There is no report in the study literature on callus induction in this species. The present work was intended to study the induction of embryogenic calluses, aiming at the later regeneration of plants as an alternative for production of torch ginger seedlings. Segments of rhizomes, leaves and roots coming from *in vitro* seedlings were utilized as explants. The different explants were inoculated in MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose, solidified with agar and two auxins at different concentrations. The effect of 2,4-D and picloram at the concentrations of (0.0; 1.0; 2.0; 4.0 mg L⁻¹) were studied. Ultrastructural analyses were performed by means of scanning microscopy and the cytochemical ones by means of test with carmine, lugol's iodine and sudan III for the calluses with embryogenic characteristics formed on the different explants. The results point out that the culture medium with 2,4-D enabled the induction of calluses with embryogenic characteristics on explants of rhizome segments. Use of 2,4-D and picloram resulted into callus formation on the different explants, but increased amount of somatic embryos in the media supplemented with 2,4-D was found. In the ultra structural analysis of the calluses with embryogenic characteristics, it was verified that cells possessed isodiametric shape similar to somatic embryos at globular stage and in the cytochemical analysis; one could confirm the presence in the mass of the callus of pro-embryogenic cells on the explants cultivated in the culture media containing both regulators.

Keywords: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. Viability.

1 INTRODUÇÃO

Na embriogênese somática, a compreensão dos estímulos e das condições necessárias para a produção e o controle desses processos é ainda limitada. Segundo Guerra, Torres e Teixeira (1998), a possibilidade de manipulação desse sistema para fins tecnológicos depende do domínio preciso da fisiologia do desenvolvimento e dos aspectos relacionados à morfogênese (integração entre os processos decorrentes de divisão e diferenciação celular), incluindo processos de determinação celular (processo pelo qual o potencial de desenvolvimento de uma célula se torna limitado a uma rota específica); competência celular (capacidade das células reagirem a sinais específicos de desenvolvimento reguladores de crescimento) e epigênese (ativação seletiva e diferencial de genes, envolvendo células receptivas ou tecidos responsivos). A sinalização entre células com diferentes funções também é requerida para a iniciação da embriogênese somática (HARADA, 1999).

Em geral, as auxinas, entre elas o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), são consideradas as substâncias responsáveis por desencadear os processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Os hormônios exercem suas funções por meio do reconhecimento de receptores específicos, presentes nessas células, traduzindo sinais hormonais em eventos bioquímicos e fisiológicos (HARADA, 1999).

Em relação ao regulador de crescimento, a auxina ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram), como indutora de embriogênese somática, tem sido investigada com frequência em espécies de interesse agrônomo. A formação direta de embriões somáticos em milheto (*Paspalum scrobiculatum*) ocorreu

com a utilização de altos níveis de picloram, isoladamente ou em combinação com 6-furfurilamonopurina, Cinetina (KAUR; KOTHARI, 2004).

A resposta a determinado hormônio pode ser alterada por mudanças no número e na afinidade dos receptores e no nível de outras substâncias endógenas (FIRN, 1986). Esse conjunto de aspectos analisados explica porque determinados explantes são competentes para a embriogênese somática e outros não e também porque explantes de mesma origem coletados em diferentes períodos apresentam respostas distintas à indução embriogênica (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1998). Sendo assim, a embriogênese somática é o resultado da ativação de células responsivas contendo receptores para determinado regulador de crescimento. Essas células seriam re-diferenciadas para novas rotas morfogênicas, gerando células-mães embrionárias competentes, que podem originar populações clonais de células embriogênicas (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1998).

De maneira geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas, tornando assim, uma célula somática competente para originar uma linhagem de células-filhas que irão formar embriões somáticos. Entre os fatores que podem afetar esse processo estão: o tipo de explante, o pH e a composição e a concentração osmótica do meio nutritivo, os tipos e as concentrações dos reguladores de crescimento, e a luz (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Na fase de indução, as análises histológicas permitem caracterizar as alterações celulares. As células embriogênicas caracterizam-se por serem pequenas, com citoplasma denso, nucléolo grande, pouca vacuolização e pequenos grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE; DUBLIN; SCHWENDIMAN, 1992). O desenvolvimento dessas células não é sincronizado, variando conforme as condições do meio de cultura, sendo capazes de se dividirem ou se envolverem na formação de embriões. As células que não formam pró-embriões começam o processo de diferenciação, ou seja, a

vacuolização, a diminuição em volume do nucléolo e o acúmulo ou o desaparecimento de grânulos de amido (MICHAUX-FERRIÈRE; DUBLIN; SCHWENDIMAN, 1992).

A adequação do meio de cultura torna-se essencial para a expressão do potencial embriogênico dessas células. Os embriões somáticos podem iniciar-se em diferentes tempos durante o desenvolvimento dos calos, variando de poucas semanas a vários meses de cultura (MICHAUX-FERRIÈRE; DUBLIN; SCHWENDIMAN, 1992).

A embriogênese somática é um método importante na propagação de plantas elite *in vitro*. Também é uma estratégia que permite que estádios iniciais embrionários sejam manipulados experimentalmente, de forma a realizar estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (YEUNG, 1995). Atualmente, vem sendo utilizada com sucesso para produção de plantas transgênicas (GAMA, 1993; PRAKASE; VARADARAJAN, 1992).

Diante do exposto, o presente trabalho tem com objetivo avaliar diferentes tipos de explantes e concentrações de reguladores de crescimento na indução de calos embriogênicos em bastão do imperador *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith var. Porcelana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos embriogênicos a partir de explantes de folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de LAVRAS (UFLA).

Como fonte de explantes foram utilizadas mudas estabelecidas *in vitro* a partir de meristemas caulinares de bastão do imperador, cedidas pela Unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (EMBRAPA), localizada em Fortaleza, Ceará.

As mudas foram micropropagadas por subcultivos mensais, sob condições assépticas. E depois cultivadas a cada 30 dias em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 2,5 mg L⁻¹ de 6-benzilamonopurina (BAP) e solidificado com ágar, na concentração de 5,5 g L⁻¹. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

Como fontes de explantes foram utilizadas segmentos de folhas (0,7 cm²), segmentos de raízes (1,0 cm), e segmentos de rizomas (0,5 cm), de plantas micropropagadas. Os rizomas foram seccionados longitudinalmente em três segmentos correspondentes às posições R1 (porção apical) e R2 (porção mediana) e R3 (porção basal) (Figura 6), e transferidos para tubos de ensaio contendo meio MS e suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e picloram (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹).

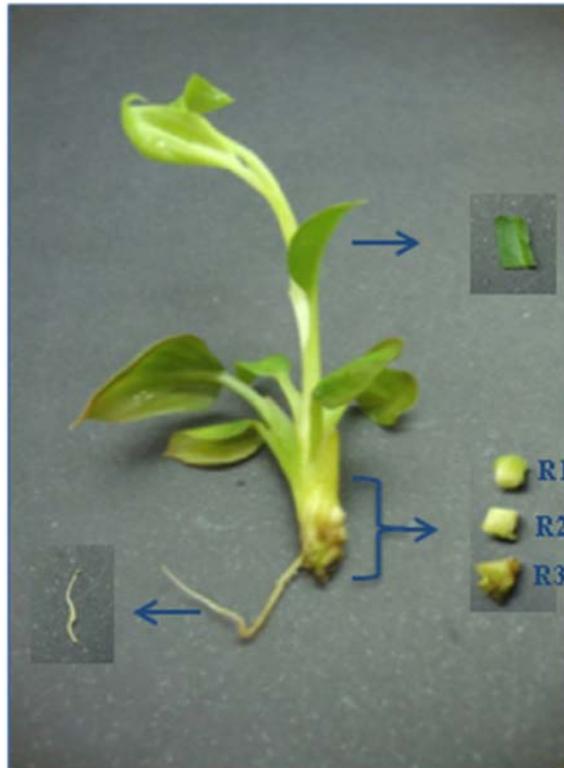


Figura 6 Diferentes fontes de explantes, segmentos de folhas, raízes e do rizoma seccionado em três partes R1, R2 e R3, obtidos de mudas micropropagadas de bastão do imperador

Logo após, os explantes foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS e, posteriormente, mantidos em ausência total de luz em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 120 dias após a inoculação, foi determinada a porcentagem de formação de calos nos diferentes tipos de explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por 2 tubos de ensaio, com um explante por tubo. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão no programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

2.2 Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador

Para a realização da análise ultraestrutural dos calos, objetivando constatar a presença de células com características embriogênicas, induziu-se a calogênese nos explantes de segmentos de folhas, rizomas e raízes, obtidos a partir de mudas micropropagadas de bastão do imperador *in vitro*. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D e picloram (1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). Após 120 dias, coletaram-se as amostras constituídas de calos, as quais foram imersas em solução fixadora Karnovsky (pH 7,2) por um período de 24 horas sob refrigeração. Posteriormente, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,056 M (três vezes) por um período de 10 minutos cada e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M por 4 horas em temperatura ambiente.

Após este período, as amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e, em seguida, foi realizada a desidratação em gradiente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), por 10 minutos e três vezes com 100%, por um minuto cada.

Após a desidratação, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO₂ líquido e, então, montadas em *stubs* para metalização com ouro. Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (LEO Evo 040), operando entre 10 e 20 kV, localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

2.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans

A coloração consiste em tratar o material em soluções de corantes ou reagentes. Assim o material poderá apresentar uma, duas ou mais cores diferentes, ou então apenas algumas estruturas do material analisado ficarão coradas (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para a realização do teste de carmim visando à confirmação de que se haveria células pró-embriogênicas nos calos, induziu-se calos utilizando-se como fonte de explantes folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador. Após 120 dias de cultivo coletaram-se as amostras constituídas de 100 mg de calos, as quais foram adicionadas de 3 a 5 gotas de corante azul de Evans (0,1%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos em uma lâmina.

Após este período, retirou-se o excesso do azul de Evans e adicionou-se de 3 a 5 gotas de corante carmim acético (2%) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. Retirou-se o excesso do corante, adicionando-se, em seguida, uma a duas gotas de glicerina. As amostras foram cobertas com uma lamínula, submetendo-se as lâminas prontas a leves batidas com um bastão de vidro, visando espalhar o material ao longo da lâmina. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX 50 e analisadas visualmente.

Outros corantes que possuem afinidades por outros componentes celulares também podem ser utilizados para auxiliar na identificação de células com potencial embriogênico. Considerando que células embriogênicas acumulam amido e lipídeos, como o lugol (que possuem afinidade ao amido) e Sudam III (que possuem afinidade por lipídeos).

2.4 Análise citoquímica com Lugol

Para a realização do teste de Lugol visando à confirmação de que se haveria células pró-embriogênicas nos calos, através da presença de amido, induziu-se calos utilizando-se como fonte de explantes folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador. Após 120 dias de cultivo coletaram-se as amostras constituídas de 100mg de calos, as quais foram adicionadas quantidades suficientes de Lugol para cobrir todo o material por 35 a 40 minutos em uma lâmina.

Após este período, retirou-se o excesso de corante e em seguida, as amostras foram cobertas com uma lamínula, submetendo-se as lâminas prontas a leves batidas com um bastão de vidro, visando espalhar o material ao longo da lâmina. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX 50 e analisados visualmente.

2.5 Análise citoquímica com Sudan III

Para a realização do teste com Sudan III visando à confirmação de que se haveria células pró-embriogênicas nos calos, através da presença de lipídios, induziu-se calos utilizando-se como fonte de explantes folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador. Após 120 dias de cultivo coletaram-se as amostras constituídas de 100 mg de calos, as quais foram adicionadas de 3 a 5 gotas de álcool etílico 50% por um minuto em uma lâmina.

Após este período, retirou-se o excesso de álcool etílico e adicionou-se o corante Sudan III, em quantidade suficiente para cobrir todo o material por 45 minutos. Retirou-se o excesso do corante, adicionando-se, em seguida, uma a duas gotas de álcool etílico por mais um minuto e depois se retirou o excesso. As amostras foram cobertas com uma lamínula, submetendo-se as lâminas prontas a

leves batidas com um bastão de vidro, para espalhar o material ao longo da lâmina. A seguir, as amostras foram fotografadas em microscópio óptico de luz Olympus BX 50 e analisados visualmente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos embriogênicos a partir de explantes de folhas, rizomas e raízes de bastão do imperador

Não houve formação de calos em nenhum dos cinco explantes testados quando não foram acrescentados reguladores de crescimento no meio de cultura MS. Rahim, Jabeen e Ilahi (2003), trabalhando com eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) constataram que os segmentos nodais inoculados no meio sem adição de reguladores de crescimento, não formaram calos e morreram.

O uso dos reguladores de crescimento 2,4-D e picloram foram eficiente para a indução de calos embriogênicos nos diferentes explantes testados. Pôde-se verificar, após 120 dias da inoculação *in vitro*, a formação de calos friáveis nos explantes de bastão do imperador. Ao contrário, Miachir et al. (2004) não verificaram a indução de calos em nenhum tipo de explante de açafão (*Curcuma zedoaria*) ao utilizar somente 2,4-D no meio de cultura após 50 dias de cultivo. Observaram-se variações nos resultados comparando-se as concentrações utilizadas para 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e picloram. Sendo que a maior porcentagem de calos formados, 100%, foi na superfície do explante de rizoma R1 para as concentrações 1,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mg L⁻¹ de picloram (Gráfico 1).

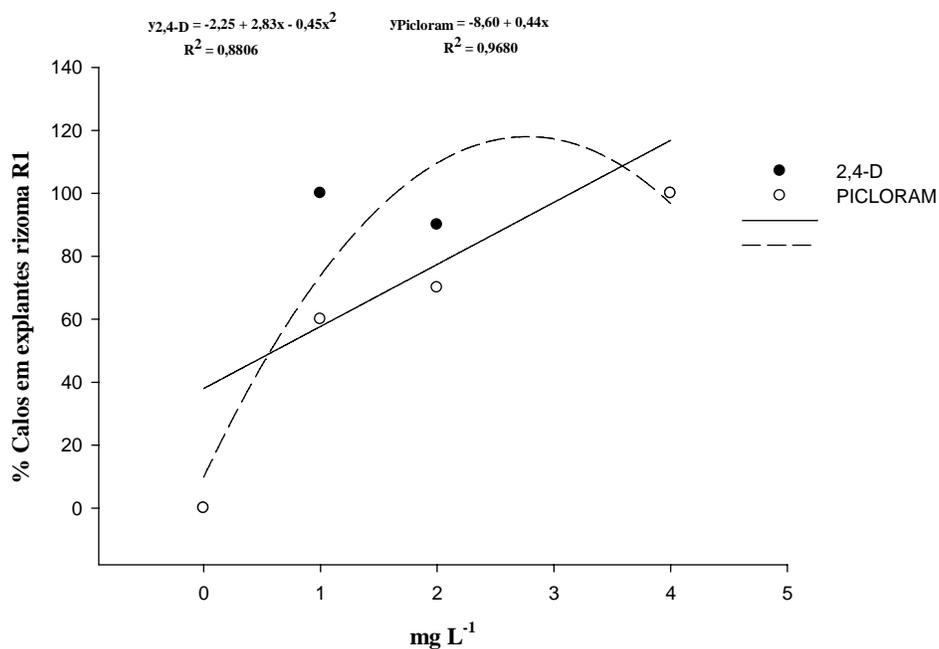


Gráfico 1 Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R1) de bastão do imperador, cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de inoculação *in vitro* no escuro

Entre os tratamentos utilizados para a formação de calos nos rizomas R2, houve diferença estatística, sendo que a maior formação de calos na superfície do explante foi proporcionada pelas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mg L⁻¹ de picloram, com 100% nas três concentrações (Gráfico 2). Roopadarshini (2010), trabalhando com açafreão (*Curcuma longa* L.) e utilizando gemas vegetativas *in vitro* e diferentes concentrações de 2,4-D, obtiveram maior porcentagem de calos na concentração de 3,0 mg L⁻¹ (86%) e menor formação na concentração de 0,5 mg L⁻¹ (38%).

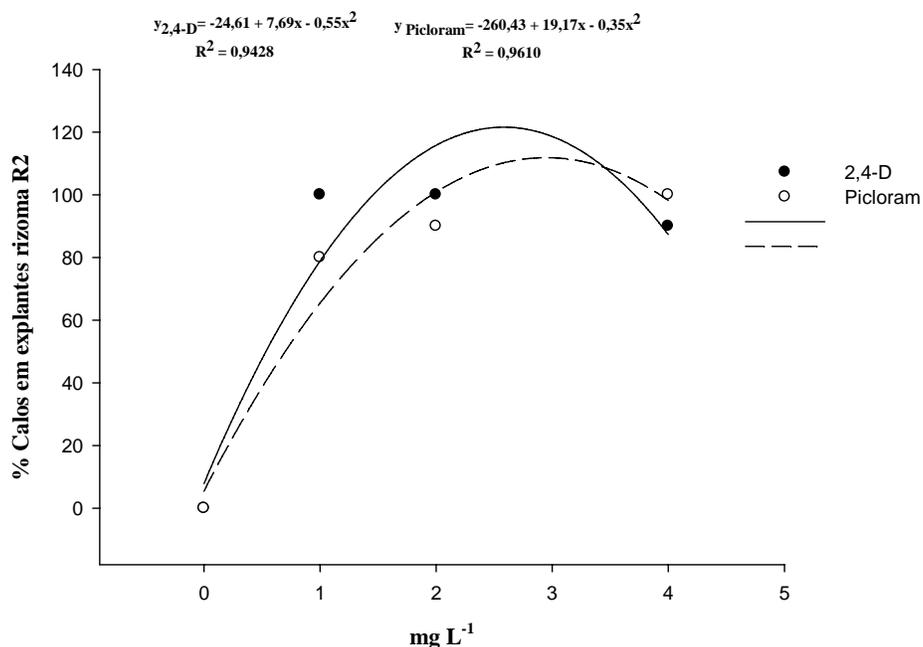


Gráfico 2 Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R2) de bastão do imperador cultivado em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo *in vitro*, no escuro

Pela análise de variância, houve diferença significativa para os diferentes tratamentos utilizados na formação de calos em explantes de rizoma R3. A concentração de 4,0 mg L⁻¹ de picloram proporcionou a melhor resposta (Gráfico 3). Já nos meios de cultura adicionados com 2,4-D, a formação de calos se mostrou similar até 2,0 mg L⁻¹ (90%), ocorrendo um decréscimo em 4,0 mg L⁻¹ (60%). Ao contrário, dos resultados obtidos por Reis, Lameira e Cordeiro (2007), os autores não constataram diferença estatística para segmentos apicais de paricá (*Schizolobium parahyba*) entre o controle (sem regulador de crescimento) (90%) e os tratamentos com 2,0 mg L⁻¹ (71%) e 4,0 mg L⁻¹ (85%) de 2,4-D.

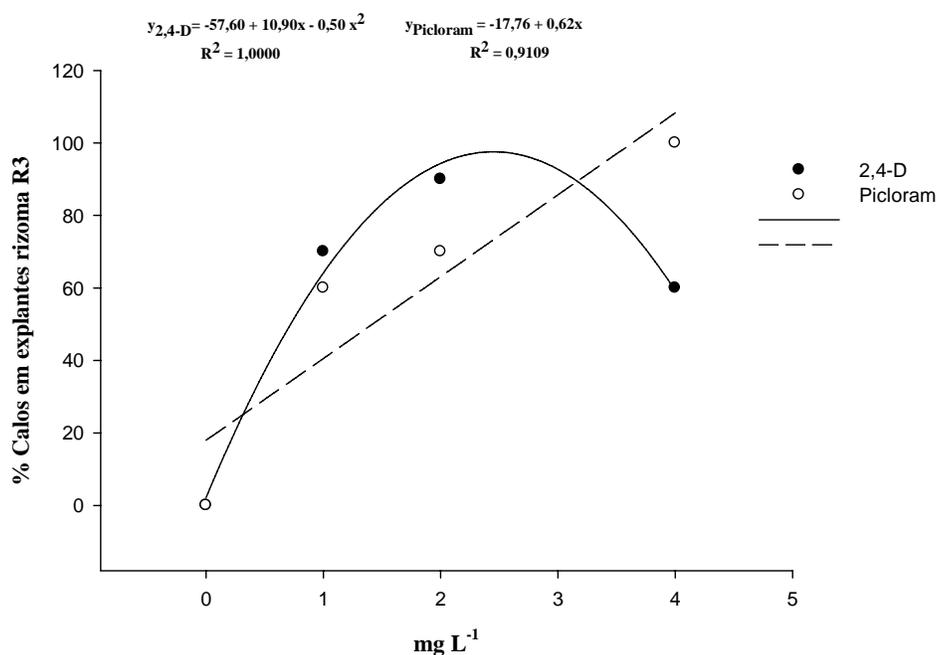


Gráfico 3 Porcentagem de formação de calos em segmentos de rizoma (R3) de bastão do imperador cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo *in vitro* no escuro

Pela análise de variância, houve diferença significativa para os diferentes tratamentos utilizados na formação de calos em segmentos radiculares. A concentração de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mg L⁻¹ de picloram, apresentaram 100% de formação de calos (Gráfico 4). Miachir et al. (2004), não constataram formação de calos em segmentos de raízes em açafraão (*Curcuma zedoaria*) quando utilizou 2,4-D. Já Porto (2009) não observou diferença na indução de calos em ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba*), em folhas e raízes com o regulador de crescimento 2,4-D e picloram. Ferreira et al. (2005) observaram a emissão de raízes e a formação de massa calosa de cor branca em partes dos explantes de raiz cultivados em meio de cultura contendo ácido naftalenoacético (ANA) e Cinetina. No presente trabalho, constatou-se que o

meio acrescido de 2,4-D promoveu a formação de calos maiores, com aumento distinto do tamanho do explante.

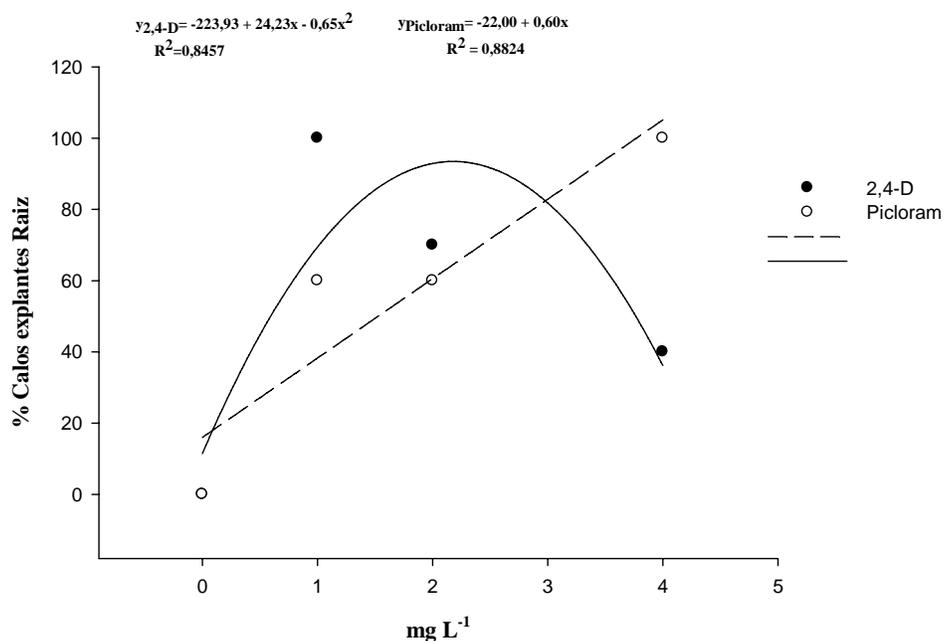


Gráfico 4 Porcentagem de formação de calos em segmentos de raiz de bastão do imperador cultivados em meio de cultura MS, acrescidos de diferentes concentrações de 2,4-D e picloram, após 120 dias de cultivo *in vitro*, no escuro

Pela análise de variância, não houve diferença significativa para os diferentes tratamentos utilizados na formação de calos em segmentos foliares. Não foi detectada formação de calos nas concentrações 0,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e picloram. Já nas concentrações 1,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e picloram, verificou-se 20% de formação de calos. Segundo Sahoo, Patitnaik e Chand (1997), concentrações entre 0,5 a 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D não foram eficientes para a formação de calos em explantes foliares de amoreira (*Morus indica*). Ao contrário, em murici-pequeno (*Byrsonima intermédia*), a concentração de 1,0 mg

L^{-1} de 2,4-D apresentou a maior percentagem de área coberta de calos, 90% Nogueira (2003). Da mesma forma, Soares (2003) verificou que explantes de segmentos foliares de ingazeiro (*Inga vera*) apresentaram maior percentagem de área do explante coberta por calos (40%) na presença de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

De acordo com Jiménez (2005), 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução de embriões somáticos, cuja eficiência depende das concentrações utilizadas, tipo de explante, condições de cultivo e genótipo. Já para George (2008), o picloram é usado para induzir e/ou manter calos em culturas em suspensão de plantas arbóreas, ou para induzir a formação de calos embriogênicos, podendo ser mais efetivo que o 2,4-D. A concentração requerida, em torno de $0,01-1,0 \text{ mg L}^{-1}$, é, geralmente menor que a necessária para outros tipos de auxinas. Contradizendo os resultados obtidos nesse trabalho, para todos os segmentos utilizados (exceto de folhas), o picloram mostrou-se mais eficiente com o aumento da concentração. Já para o 2,4-D, as menores concentrações foram mais eficientes na indução de calos.

Os calos formados nas concentrações testadas de 2,4-D apresentaram coloração branca-amarelada, sem oxidação, com um aspecto friável, podendo ser observada a formação de estruturas, semelhantes a embriões globulares na maioria dos explantes (Figura 7). Estas estruturas são características da primeira fase de diferenciação do tecido, sendo o primeiro indício de sucesso num protocolo que vise à obtenção de embriogênese somática.

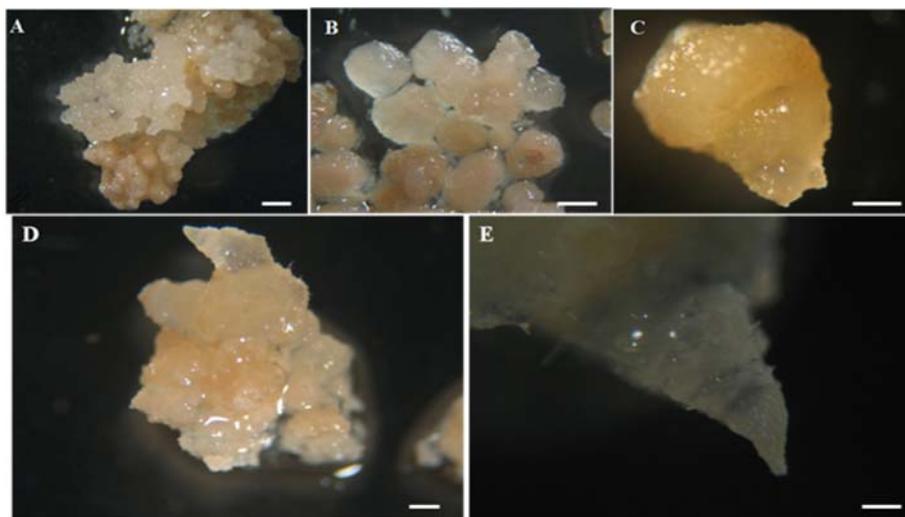


Figura 7 Formação de estruturas globulares semelhantes a embriões somáticos em explantes de bastão do imperador cultivados em meio suplementado com 2,4-D. (A e B) - estruturas globulares em segmentos de rizoma R1 cultivados em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. (C) - prováveis embriões somáticos formados em segmentos de rizoma R1 mantidos em meio de cultura adicionado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. (D e E) - estruturas radiculares formados em segmentos radiculares, desenvolvidos em meio de cultura suplementado com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Barra= 1 mm

Constatou-se em todos os segmentos de rizoma o início de formação de calos na região onde continha o meristema apical (Figura 8). Já nos tratamentos sem a presença de regulador de crescimento, observou-se a formação de brotos alongados. Domingues, Tulmann Neto e Mendes (1996), observaram diferenças nas respostas dos explantes de bananeira (*Musa spp*) às diversas concentrações de (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) Dicamba, de acordo com a posição de origem, os explantes constituídos apenas de tecidos do rizoma não se mostraram adequados. Os explantes obtidos logo abaixo da posição do rizoma meristemático, envolvendo tecido do rizoma e do pseudocaule, bem como os explantes englobando o ápice meristemático e que apresentaram boa formação de estruturas globulares e calos. Comprovando neste trabalho, que as estruturas

dos rizomas utilizadas apresentavam o meristema apical e grande formação de calo e estruturas embriogênicas, apresentando um total de (R1) 69%, (R2) 70% e (R3) 56% na formação de calos.

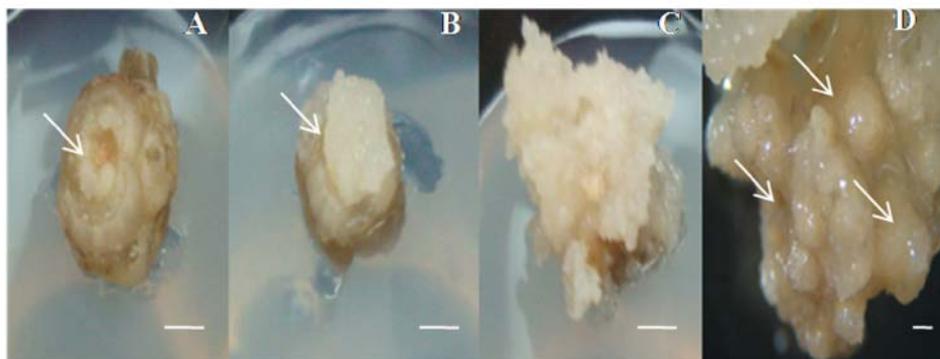


Figura 8 Calos embriogênicos formados a partir de segmentos de rizomas R2 em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (A) aos 30 dias iniciando a formação de calos (seta), (B) 60 dias formação mais adiantada de calos (seta), (C) 120 dias mostrando a massa de calos cobrindo todo o explante e (D) detalhe de estruturas globulares no explante R2 (seta). Barra = 1 mm

Os calos formados na presença de picloram possuíam textura friável e consistente, sem a presença de oxidação, apresentando estruturas globulares. Carvalho (2007) não recomenda o uso de picloram para a regeneração de calos em eucalipto (*Eucalyptus spp*), devido à textura compacta formada. Xavier e Comerio (1996) também constataram que os calos de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) induzidos na presença de picloram, tornaram-se compactos e oxidados, conforme o passar de tempo de permanência *in vitro*.

Com desempenho similar e textura mais friável, destacaram-se os calos cultivados nas concentrações de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Como os explantes nessas duas concentrações apresentaram efeitos muito semelhantes, recomenda-se o uso de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, no intuito de reduzir os custos. A mesma

dosagem desta auxina é recomendada por Nogueira et al. (2007) para murici-pequeno (*Byrsonima intermédia*).

Estruturas semelhantes a raízes foram observadas na massa calosa formada nos segmentos de raízes suplementados com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 8). Reis et al. (2007), evidenciaram que as raízes originadas dos calos cultivados em 6,0 mg L⁻¹ de 2,4-D de paricá (*Schizolobium parahyba*), não apresentavam comunicação vascular com o explante. O uso de 2,4-D isoladamente na concentração de 6,4 mg L⁻¹ induziu calogênese e rizogênese em explantes foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), produzindo calos de aspecto friável e coloração amarelada (PAIVA NETO, 1996).

Os explantes de segmentos de folhas, não superaram 10% na formação de calos, mostrando-se inadequados para a indução de calos, na cultivar de bastão do imperador estudada. Costa, Loureiro e Pereira (2008), também observaram que ao utilizar 2,4-D nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, em explantes foliares em pimenta longa (*Piper hispidinervum*), promoveu os maiores percentuais de explantes sem resposta morfogenética, sem formação de calos. Possivelmente, a concentração testada desta auxina tenha causado efeito fitotóxico para esta espécie.

O efeito das concentrações de 2,4-D e picloram foi estudado na embriogênese somática de *Cleome rosea* Vahl por Simões et al. (2010). Os autores observaram que os dois reguladores foram eficientes na formação de calos, mas que só o 2,4-D resultou em calos embriogênicos.

Para Kerbauy (1999), a utilização de substâncias reguladoras de crescimento tem-se mostrado de importância fundamental para o estabelecimento da competência e determinação de células.

3.2 Análise ultraestrutural de calos de bastão do imperador

Pelas análises em MEV pode-se observar que as massas celulares desenvolvidas sob influência de 2,4-D possuíam formato arredondado para os cinco tipos de explantes testados rizoma (R1, R2 e R3), segmentos de folha e de raiz. Foi possível a distinção de regiões em organização esférica, apresentando células com formato isodiamétrico semelhantes a embriões somáticos em estágio globular (Figura 8), o que, segundo Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2003), é característico de células meristemáticas. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ulisses et al. (2010), com a utilização de 2,4-D para a indução de calos em helicônia (*Heliconia chartaceae*), obtendo células arredondadas e em divisão celular. Segundo Zuo, Niu e Frugis (2002), o 2,4-D exerce a função de indutor da embriogênese somática. Nogueira et al. (2007), também constataram que foi possível, em MEV, a visualização nítida de mudança do formato celular ao longo do tempo de exposição em segmentos foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermédia*) no 2,4-D, indicando que a presença desta auxina é um fator crucial para a sinalização de desdiferenciação celular, e conseqüente retomada de características meristemáticas, favorecendo a embriogênese somática.

As massas celulares sob a influência de picloram apresentaram células mais unidas e em formato arredondado, demonstrando a capacidade morfogenética de ambas auxinas utilizadas, uma vez que células com formato isodiamétrico são características de formações embriogênicas (STEINER et al., 2005). Observou-se também que os calos formados nos tratamentos contendo picloram apresentavam células envolvidos por uma camada fina, que provavelmente pode ser de cera (Figura 9). Segundo Santos (2010), estas características são típicas de células que permaneceram pouco tempo em contato com o regulador de crescimento, isto é, que ainda estão no início de formação.

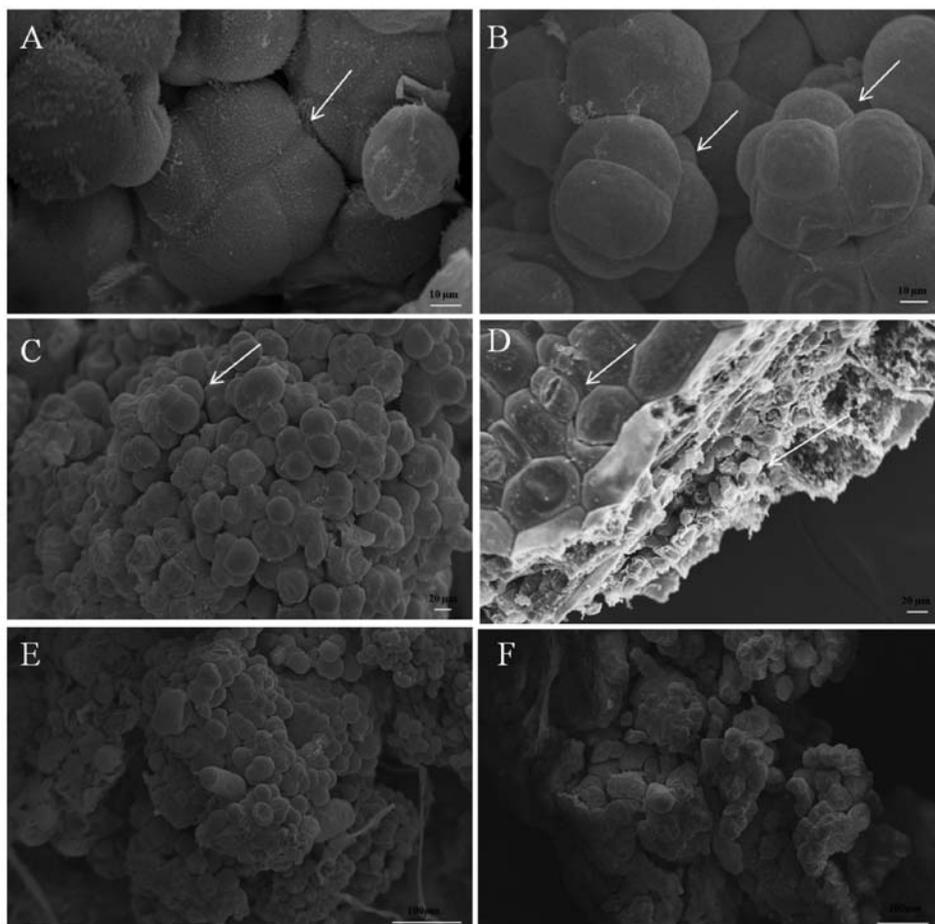
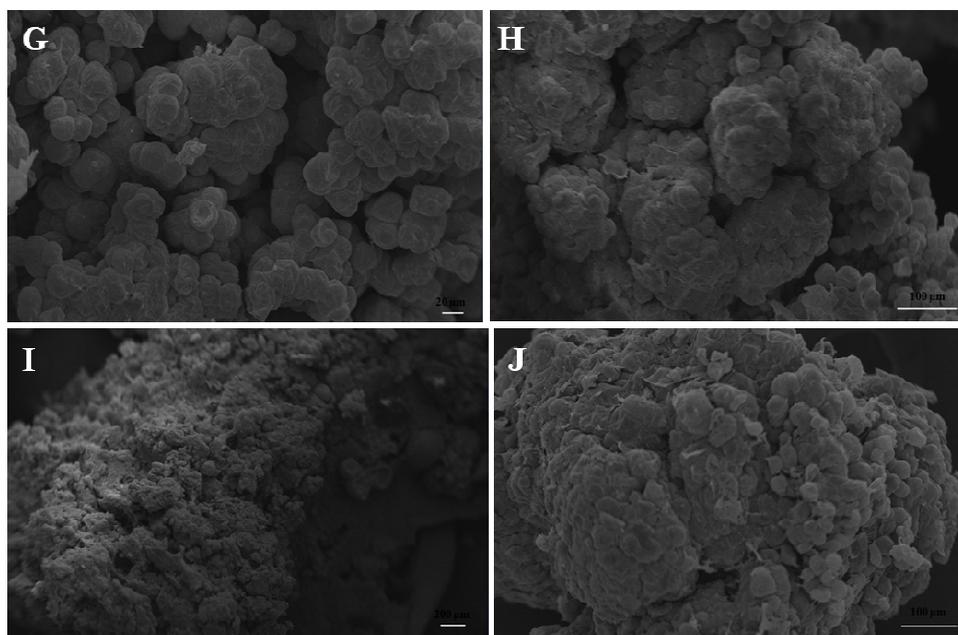


Figura 9 Eletromicrografia de varredura de células de calos de bastão do imperador com estruturas globulares. (A, B e C) estrutura de embriões somáticos em estágio globular em explantes de segmentos de rizomas desenvolvidos em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (seta). (D) estruturas calosas formadas em explantes de segmentos de folhas mantidos em meio de cultura adicionado de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, detalhe do estômato (seta). (E) estruturas globulares em explantes de segmentos radiculares crescidos em meio de cultura suplementado como $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. (F, G, H, I e J) estruturas globulares unidas por cera em explantes de segmentos de rizoma, folhas e raízes em meio de cultura acrescido de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram

(...continua...)



As análises ultra-estruturais, em MEV, são ferramentas que contribuem para a identificação da capacidade morfogênica de explantes cultivados *in vitro*. Com base nos resultados obtidos, por esta técnica, no presente trabalho, ratifica-se o potencial embriogênico dos explantes de segmentos de rizoma de bastão do imperador da var. Porcelana.

3.3 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans

Foram observadas que para todos os calos originados de 2,4-D e picloram, apresentaram reação positiva ao carmim acético confirmando a presença de células pró-embriogênicas nestes tratamentos (Figura 10). De acordo com Guerra (2001), massas calosas e pró-embriônicas reagem fortemente ao carmim acético e fracamente ao azul de Evans. Para Steiner et al. (2005), a reação positiva ao carmim acético está associada à competência da

célula para o desenvolvimento celular. Observamos também que ocorreram dois tipos de células nas culturas embriogênicas. Para o 2,4-D, as células eram mais desagregadas, já para o picloram as células apresentavam agregadas.

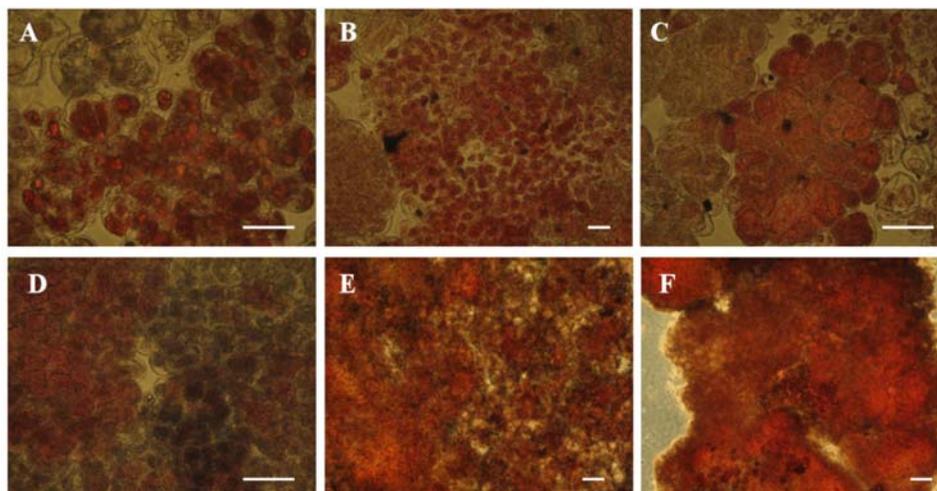


Figura 10 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos de a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, B- rizoma R2 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, C- rizoma R3 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, D- rizoma R1 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram, E- rizoma R2 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram e F- rizoma R3 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram (Barra: 1mm)

Valente (2007) e Silva (2009), também utilizaram da dupla coloração de carmim acético e azul de Evans para a identificação de massas calosas com potencial embriogênico em pinheiro (*Araucaria angustifolia*) e murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*).

Assim, a análise realizada em bastão do imperador indica que não houve diferença entre os explantes com relação à formação de células embriogênicas após a indução dos calos. E ambos reguladores de crescimento demonstraram reação positiva ao carmim acético.

3.4 Análise citoquímica com Lugol

A análise de presença de amido em células embriogênicas foi detectada em ambos reguladores de crescimento (2,4-D e picloram). Os grãos de amido se acumularam principalmente nas células da parte interna, tornando-os mais evidentes (Figura 11). Segundo Moura (2007), o acúmulo de amido, seja nas células embriogênicas ou em células adjacentes, parece ser um fenômeno ligado à aquisição de competência embriogênica. Em Oliveira, (2007), utilizou o corante lugol para a detecção de grãos de amido em bastão do imperador (*Etilingera elatior*), determinando a viabilidade polínica dos grãos de pólen. Em estudos, Pescador et al. (2008), comparando a embriogênese somática e zigótica de goiabeira serrana (*Acca sellowiana*) apontou diferenças marcantes nos carboidratos não estruturais, sendo geralmente encontrados valores mais baixos de açúcares solúveis e maior conteúdo de amido nos embriões somáticos, em relação aos zigóticos.

Entretanto, o possível papel do amido no processo de embriogênese somática ainda não está claro.

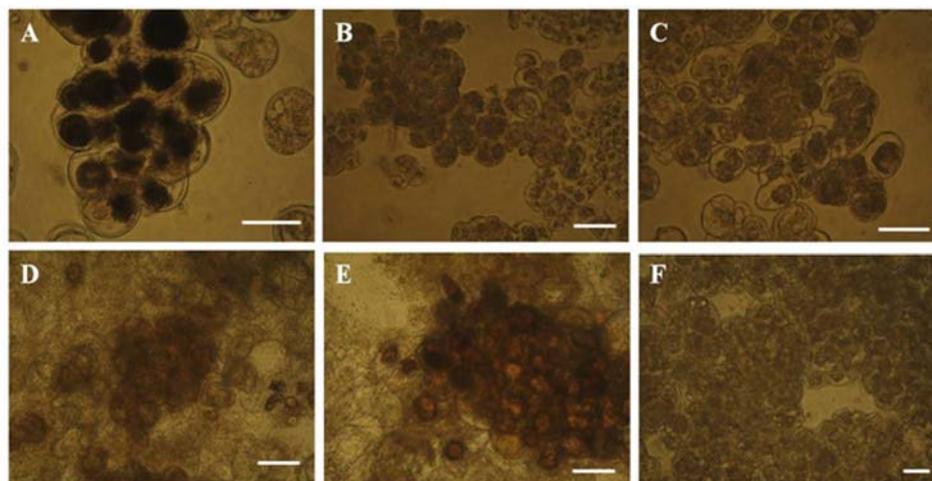


Figura 11 Análise citoquímica com lugol em calos embriogênicos de a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, B- rizoma R2 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, C- rizoma R3 em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, D- rizoma R1 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram, E- rizoma R2 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram e F- rizoma R3 em $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram

3.5 Análise citoquímica com Sudan III

O corante Sudan III possui grande afinidade por lipídios, evidenciando-os na cor laranja-escuro (Figura 12). Segundo Guerra (2001), o corante é um dos protocolos de comprovação se uma cultura é embriogênica, visualizando lipídios em células embrionárias. Assim, comprovando nesse trabalho a presença de corpos lipídicos em células embrionárias de bastão do imperador.

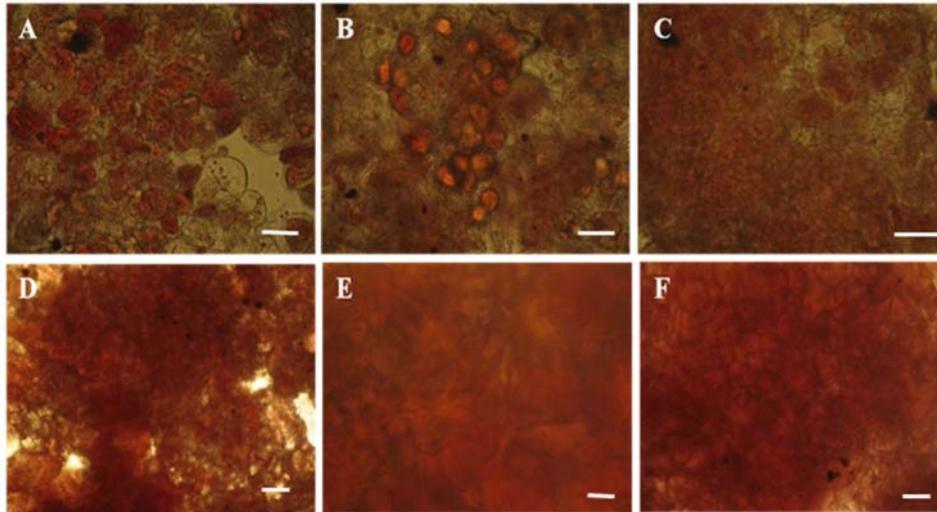


Figura 12 Análise citoquímica com Sudan III em calos embriogênicos de bastão do imperador a partir de segmentos de rizoma. A- rizoma R1 em 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, B- rizoma R2 em 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, C- rizoma R3 em 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, D- rizoma R1 em 4,0 mg L⁻¹ de picloram, E- rizoma R2 em 4,0 mg L⁻¹ de picloram e F- rizoma R3 em 4,0 mg L⁻¹ de picloram

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicaram que as auxinas 2,4-D e picloram são promissoras no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática em bastão do imperador.

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 2,4-D, utilizando-se explantes de segmentos de rizoma de plântulas *in vitro*, onde apresentaram maiores evidências de embriões somáticos.

Estudos mais detalhados devem ser desenvolvidos com o objetivo de obter embriões somáticos de bastão do imperador com melhor qualidade, sendo eficiente na conversão de plantas.

REFERÊNCIAS

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

CARVALHO, E. C. S. **Antioxidantes, reguladores de crescimento e estresse térmico na embriogênese somática de eucalyptus spp.** 2007. 1022 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

COSTA F. H. da S.; LOUREIRO, T. da S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 269-274, abr./jun. 2008.

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.

FERREIRA, M. das G. R. et al. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

FIRN, R. D. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 67, n. 3, p. 267-272, July 1986.

GAMA, M. J. S. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos por meio de *Agrobacterium tumefaciens***. 1993. 130 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Hants: Exegetics, 2008. v. 1, 501 p.

GUERRA, M. P. **Protocolo para visualização de pró-embrião somático**. Florianópolis: UFSC, 2001. 35 p. Apostila.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEXEIRA, S. J. B. **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, p. 533-568.

HARADA, J. J. Signaling in plant embryogenesis. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 2, n. 2, p. 23-27, Feb. 1999.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on invitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 91-110, Jan. 2005.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de planta. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p. 520-521.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. p. 17.

KAUR, P.; KOTHARI, S. L. *In vitro* culture of Kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with Kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p. 73-79, Apr. 2004.

MICHAUX-FERRIÈRE, N; DUBLIN, P. S.; SCHWENDIMAN, J. Etude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explantas foliaires de Coffea Arabica L. **Café CaçãO Thé**, Paris, v. 31, p. 103-111, July/Sept. 1987.

MIACHIR, J. I. et al. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoria* Roscoe. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 427-432, July/Aug. 2004.

MOURA, E. F. **Embriogênese somática em macaúba: indução, regeneração e caracterização anatômica**. 2007. 83 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

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, July 1962.

NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Bysonima intermédia* a. Juuss.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 48-50, jul. 2007.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. 2003. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OLIVEIRA, J. F. **Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

PAIVA NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. 1996. 33 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

PESCADOR, R. et al. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 44, n. 4, p. 289-299, Aug. 2008.

PORTO, M. P. **Potencial embriogênico e organogênico em explantes de ipê-branco**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PRAKASH, C. S.; VARADARAJAN, U. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed.). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee: Tuskegee University, 1992. p. 27-37.

RAHIM, F.; JABEEN, M. ; ILAHI, I. Mass propagation in eucalyptus camaldulensis Dehn. **Asian Journal of Plant Sciences**, Pakistan, v. 2, n. 2, p. 184-187, 2003

REIS, I. N. R. de S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 498-500, jul. 2007.

ROOPADARSHINI, V. High frequency shoot multiplication and callus regeneration of turmeric. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, Cairo, v. 6, n. 5, p. 723-733, 2010

SAHOO, Y.; PATTNAIK, S. K.; CHAND, P. K. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 69, n. 1/2, p. 85-98, Mar. 1997.

SANTOS, D. N. dos. **Caracterização de massas pró-embriogênicas em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2010. 117 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SILVA, L. C. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno**. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

SIMÕES, C. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* vahl. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 679-686, May/June 2010.

SOARES, G. de A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC) T. D. Penn)**. 2003. 53 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

STEINER, N. et al. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

ULISSES, C. et al. 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, Jan./Feb. 2010.

VALENTE, C. **Caracterização de funções mitocondriais em *Araucaria angustifolia***. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de eucalyptus. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 9-16, mar. 1996.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORP, T. A. (Ed.). ***In vitro* embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 205-247.

ZUO, J. Q. W.; NIU, G.; FRUGIS N. H. C. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 349-359, May 2002.

CAPÍTULO 4

Análise da ploidia por citometria de fluxo em calos embriogênicos de bastão do imperador

RESUMO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a obtenção de medidas físicas e químicas de partículas (células, núcleos, cromossomos e organelas). A quantidade de DNA é o principal parâmetro analisado pela citometria de fluxo em plantas e baseia-se na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com fluorocromos específicos para DNA. Nesse trabalho a citometria de fluxo foi utilizada para verificar a estabilidade de ploidia em calos embriogênicos de bastão do imperador *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith var. Porcelana. Foram utilizados calos cultivados aos 160 dias. Que foram obtidos de explantes (segmentos de rizoma, folhas e raízes) e combinações de concentrações de 2,4-D e picloram (1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) As médias de DNA entre os calos variaram de 5,43 e 10,15 pg e coeficientes de variação variando entre 0,3 e 2,26. Os calos induzidos pelo regulador de crescimento 2,4-D apresentaram 86% de estáveis e 14% mixoplóides. Já para os calos induzidos por picloram apresentaram 64% de estáveis e 36% de mixoplóides. As variações encontradas nesses calos podem está relacionadas com o tempo de exposição no meio de cultura, alta divisão celular, ao explante utilizado e o seccionamento deste. Os resultados indicam uma variação no nível de ploidia de calos gerados a partir de explantes de segmentos de rizoma. Assim, a fonte de explante, e a integridade deste tem relação direta na variação mitótica dos calos de bastão do imperador.

Palavras-chave: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. Estabilidade genética.

ABSTRACT

Flux cytometry is a technique which enables to obtain physical and chemical measures of particles (cells, nuclei, chromosomes and organelles). The amount of DNA is the main parameter analyzed by flux cytometry in plants and is based upon the intensity of relative fluorescence of nuclei stained with fluorochromes specific to DNA. In this work, flux cytometry was used to verify the stability of ploidy on embryogenic calluses of torch ginger *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith var. Porcelana. Calluses grown at 160 days were utilized which were obtained from explants (segments of rhizome, leaves and roots) and combinations of concentrations of 2,4-D and picloram (1.0; 2,0; 4.0 mg L⁻¹). The means of DNA among the calluses ranged from 5.43 and 10.15 pg and variation coefficients varying between 0.3 and 2.26. The calluses induced by the growth regulator 2,4-D presented 86% of stable calluses and 14% of mixoploids. But, the picloran-induced calluses presented 64% of sterile and 36% of mixoploids. The variations found in those calluses may be related to the exposition time in the culture medium, high cell division, to the explants utilized and sectioning of this. The results indicate a variation at the level of ploidy of calluses generated from explants of rhizome segments. So, the source of explant and the integrity of this have a direct relationship in the mitotic variation of torch ginger calluses.

Keywords: Zingiberaceae. *Etilingera elatior*. Genetic stability.

1 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos tem sido uma alternativa de sucesso para a produção em massa (SCHILDT; AMARAL; SCHMILDT, 2007), principalmente pela embriogênese somática. Ao que se referem ao estabelecimento de um sistema de embriogênese somática, tem o risco de variação somaclonal e, conseqüentemente, à elaboração de estratégias para monitorar o nível de ploidia dos calos e plantas regeneradas.

A citometria de fluxo tem constituído numa ferramenta confiável de análise e detecção rápida de somaclones (CLARINDO et al., 2008); e a citogenética permite a confirmação da estabilidade cromossômica das plantas selecionadas.

A citometria de fluxo é uma técnica que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (DOLEZEL, 1997). As partículas em suspensão movem-se emergidas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (DOLEZEL, 1997). Essas partículas intersectam uma a uma um feixe de laser ocorrendo um processo de dispersão da luz e ou emissão de fluorescência (DOLEZEL; BARTOS, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

A análise de quantidade de DNA nuclear por citometria de fluxo tem sido usada com várias aplicações em plantas, entre elas a diferenciação de níveis de ploidia e a comparação de tamanhos de genoma (GALBRAITH, 1990). Um pré-requisito para o sucesso da técnica é o isolamento de núcleos intactos a partir dos tecidos vegetais analisados (DOLEZEL, 1997). O método mais

comum utilizado para liberação dos núcleos é a trituração dos tecidos em um tampão de lise e os tecidos mais utilizados são folhas e raízes (PAN et al., 2004). A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. Tais estimativas apresentam uma série de aplicações, desde a pesquisa básica até o melhoramento de plantas, entre elas, estimação do tamanho do genoma, avaliação de ploidia, detecção de mixoploidia e aneuploidias, avaliação de ciclo celular, estudo de eliminação cromossômica, separação de células, cromossomos ou organelas (DOLEZEL; BARTOS, 2005).

Poucos trabalhos descrevem a avaliação por citometria de fluxo de núcleos isolados a partir de calos embriogênicos (GUTIERREZ; FERRERO, 2005). Em bastão do imperador, a avaliação de quantidade de DNA de calos pode ser útil na avaliação de existência de variações somaclonais do DNA e, além disso, permite-nos conhecer a distribuição de uma população de células ao longo das diferentes fases do ciclo celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As determinações de quantidade de DNA por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos, situado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

Como material vegetal, foram utilizados calos embriogênicos de bastão do imperador, cultivados aos 160 dias. Esses calos foram obtidos de variados tipos de explantes (segmentos de rizomas, folhas e raízes) e combinações de concentrações de 2,4-D e picloram (1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹).

Para cada tratamento, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA e o nível de ploidia em diferentes setores dos calos. A determinação da quantidade de DNA e o nível de ploidia, utilizou-se aproximadamente três repetições de 300 mg de calos para cada tratamento, acrescida com a mesma quantidade de massa foliar de ervilha (*Pisum sativum*) (padrão de referência de quantidade de DNA – 9.09 pg) foram triturados em placa de petri, contendo 1 mL de tampão de extração de núcleos LB01 (DOLEZEL; BINAROVA; LUCRETTI, 1989). Com auxílio de um bisturi os calos foram triturado e aspirado através de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear posteriormente filtrada em malha de 50µm. As suspensões nucleares foram corada com uma solução composta de iodeto de propídio (1 mg/mL⁻¹) e 5 µL de RNase (Figura 13).

As amostras foram armazenadas em refrigerador, no escuro, e analisadas em até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, pelo menos 10 mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência, para quantificação de DNA.

Os histogramas foram obtidos no citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest (DICKINSON, 1998). As quantidades de DNA (pg) das plantas foram obtidas por meio da equação: quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 de ervilha

(*Pisum sativum*) x 9,09 (Figura 3). A análise estatística dos dados foi realizada pelo programa WinMDI 2.8 (TORTER, 2000).

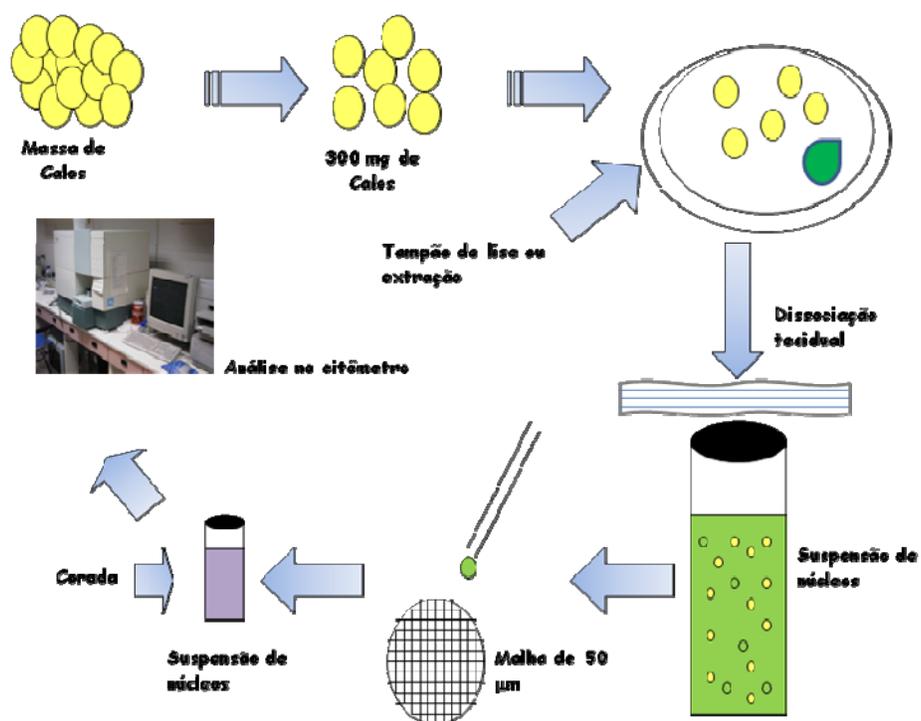


Figura 13 Procedimento adaptado para a obtenção de núcleos isolados a partir de calos para a citometria de fluxo

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor de quantidade de DNA individual da planta matriz e a planta *in vitro* não apresentaram variação, permanecendo com $5,42 \pm 0,01$ pg. As estimativas da quantidade de DNA de calos, considerando a média das três amostras, variaram entre 5,43 e 10,15 pg (Tabela 3).

Tabela 3 Estimativas das quantidades de DNA para plantas e calos e bastão do imperador, analisados por citometria de fluxo

	Quantidade de DNA (pg)	CVs
Matriz Campo	5.42	0.30
Matriz <i>in vitro</i>	5.43	0.59
Calos Estáveis	5.43	0.59
Calos Mixoplóides	1,34 – 10.15	0.39 – 2,26

Do ponto de vista prático, determinar a quantidade de DNA nuclear pode substituir a contagem de cromossomos, principalmente quando se trabalha com um número muito grande de indivíduos, como um banco de germoplasma. Conhecer o número de cromossomos ou o nível de ploidia é imprescindível para trabalhos de melhoramento (SCHIFINO-WITTMANN, 2001).

Os coeficientes de variação (CV), neste estudo para as amostras de calos, variaram entre 0,3 e 2,26 (Tabela 3). Esses valores demonstraram a qualidade dos resultados obtidos e a confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA em amostras de calos, planta matriz e planta *in vitro*. Marie e Brown (1993), chamam a atenção para a importância dos valores dos coeficientes de variação para uma boa estimativa da quantidade de DNA. Segundo esses autores, este é um critério elementar para aceitação dos resultados obtidos, e coeficientes de variação entre 1% e 2% são apontados como resultados de alta qualidade e em torno de 3% como rotina. Galbraith et al.

(1983), definem um coeficiente de variação abaixo de 5% como um critério de aceitação para publicações internacionais. Já para, Ulrich e Ulrich (1991), afirmam que para uma análise de alta resolução, o histograma deve conter coeficientes de variação com picos abaixo de 1%.

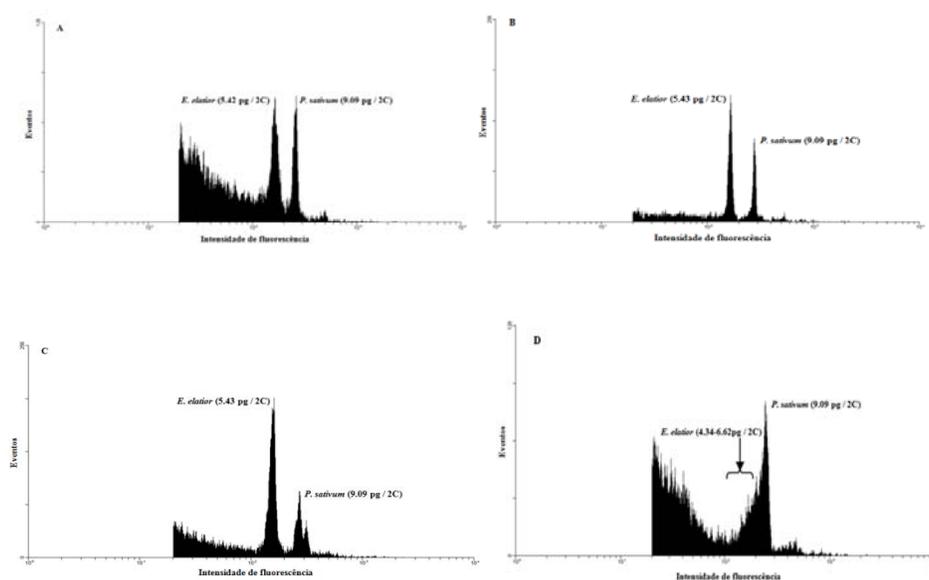


Gráfico 5 Histogramas de citometria de fluxo em bastão do imperador. A- Planta matriz; B- Planta *in vitro*; C- Calo estável e D- Calos mixoplóides

Os picos da planta matriz e planta *in vitro* indicaram que aparentemente são plantas diplóides (Gráfico 5), apresentando divisões mitóticas praticamente escassas em seu tecido. Já em calos, apresentaram 75% de calos estáveis e 25% de plantas mixoplóide, devido certamente a grande atividade mitótica. Os calos induzidos pelo regulador de crescimento 2,4-D apresentaram 86% de estáveis e 14% mixoplóides (Tabela 4). Já para os calos induzidos por picloram apresentaram 64% de estáveis e 36% de mixoplóides. Isso mostra que calos induzidos por picloram demonstraram maior variabilidade no número de ploidia em comparação com os calos induzidos por 2,4-D. Ao contrário, Lo Schiavo et

al. (1989), indicaram que os níveis de auxinas estão relacionadas com o nível de metilação quando se aplica o 2,4-D, em geral, o grau de metilação aumenta a medida que aumenta a concentração de reguladores de crescimento em meio de cultura. Já para Muller et al. (1990), o efeito da auxina 2,4-D tende mais a acelerar a divisão celular, o que pode afetar indiretamente a alteração genética e ou grau de metilação.

Tabela 4 Porcentagem de calos estáveis e mixoploides nos reguladores de crescimento 2,4-D e picloram de bastão do imperador

Classificação	2,4-D	Picloram
Calos estáveis	86%	64%
Calos mixoplóides	14%	36%

As variações encontradas em calos induzidos por 2,4-D e picloram podem está relacionadas com o tempo de exposição no meio de cultura, alta divisão celular ou ao explante utilizado. Neste estudo, observamos que as mixoploidias encontradas nos calos, surgiram de explantes de segmentos de rizoma. Que segundo Gutierrez e Ferrero (2005), explantes como tecido foliar, raízes e rizomas, podem acumular um grande número de mutações somáticas que podem explicar, pelo menos em parte, a variação encontrada.

Em calos, durante a fase de indução ocorre um estímulo no metabolismo preparando as células para a divisão celular. Na fase de divisão, os explantes readquirem capacidade meristemática pela desdiferenciação de suas células, promovendo o crescimento do calo, pela produção de células parenquimáticas indiferenciadas. Na última fase, algumas regiões do calo rediferenciam-se formando zonas de atividade meristemática (AITCHISON; MACEDO; YEOMAN, 1977). Em estudos, Fillippi, Appezzato-da-Gloria e Rodriguez (2001), constataram que rizomas seccionados longitudinalmente de bananeira (*Musa spp.*) contendo o meristema apical e cultivados em meio suplementados com 2,4-D, cessaram o desenvolvimento embriogênico após o 15° dia de

cultivo, ocorrendo um grande oxidação e quantidades elevadas de compostos fenólicos. Já em rizomas inoculados em meio com picloram, obtiveram calos embriogênicos e posteriormente embriões somáticos que não regeneraram em plantas. Provavelmente devido à falta de desenvolvimento meristemático que pode ter sido ocasionada pelo seccionamento deste explante.

O desenvolvimento do protocolo de embriogênese somática em bastão do imperador pode ter sido afetado pelo tipo e seccionamento do explante e tempo de exposição ao meio de cultura, causando distúrbios metabólicos e variação estrutural.

4 CONCLUSÕES

Pela técnica de citometria de fluxo foi possível obter o nível de ploidia de células embriogênicas em bastão do imperador induzidas pelos reguladores de crescimento 2,4-D e picloram.

Os calos induzidos por picloram mostraram maior atividade mitótica (mixoplóides) no material genético, em relação aos calos induzidos por 2,4-D.

A fonte de explante, e o tempo de exposição ao meio tem relação direta na variação mitótica dos calos de bastão do imperador.

REFERÊNCIAS

AITCHISON, P. A.; MACLEOD, A. J.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. Berkeley: University of California Press, 1977. p. 267-306.

CLARINDO, W. R. et al. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 2, p. 207-214, Feb. 2008.

DICKINSON, B. **CellQuest Software Reference Manual, rev. B**. San Jose: [s.n.], 1998. 227 p.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 31, n. 2, p. 113-120, Mar. 1989.

FILLIPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Histological changes in banana explants, cv. Nanicão (*Musa* spp., Group AAA), submitted to different auxinas for induction of somatic embryogenesis. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4 suppl. 0, p. 595-602, dez. 2001.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, New York, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GALBRAITH, D. W. Flow cytometry analysis of plant genomes. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 33, p. 549-562, 1990.

GUTIERREZ, L. G. L.; FERRERO, V. M. Análisis de ploidia por citometria de flujo de callos embriogénicos de Aliso andino (*Alnus acuminata* H. B. K.). **Scientia et Technica**, Bogotá, v. 11, n. 28, p. 157-161, oct. 2005.

LO SCHIAVO, F. et al. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 325-331, Mar. 1989.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

MULLER, E. et al. DNA variation in tissue culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, n. 5, p. 673-679, Dec. 1990.

PAN, G. et al. Na efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in Brassica napus pollen. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 196-202, Oct. 2004.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 897-902, set./out. 2001.

SCHILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sucrose on *in vitro* rooting phase of papaya tree 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2007.

TROTTER, J. **WinMDI© Version 2.8**. La Jolla, CA: The Scripps Research Institute, 2000. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 14 jul. 2010.

ULRICH, I.; ULRICH, W. High-resolution flow cytometry DNA in higher plants. **Protoplasma**, New York, v. 165, n. 1/3, p. 212-215, Feb. 1991.

ANEXOS

Tabela 1A Resumo da análise de variância com interação para hormônio e posição do explante na porcentagem de calos de bastão do imperador

FV	GL	QM
Hormônio	5	1.991795*
Posição	1	0.004296 ^{NS}
Hormônio*Posição	5	0.188897*
Erro	48	0.048134
Total	59	
CV(%) =	18.14	

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

^{NS} Não significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 2A Resumo da análise de variância com interação para hormônio e posição do explante na porcentagem de oxidação de bastão do imperador

FV	GL	QM
Hormônio	5	0.103630 ^{NS}
Posição	1	0.060758 ^{NS}
Hormônio*Posição	5	0.024563 ^{NS}
Erro	48	0.056549
Total	59	
CV(%) =	28.23	

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

^{NS} Não significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 3A Resumo da análise de variância para porcentagem de calos formados a partir de explantes de rizoma (R1) de bastão do imperador em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram

FV	GL	QM	
		2,4-D	Picloram
Tratamentos	3	4.716667*	1.666667*
Erros	16	0.050000	0.450000
Total	19		
CV(%) =		15.42	31.60

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 4A Resumo da análise de variância para porcentagem de calos formados a partir de explantes de rizoma (**R2**) de bastão do imperador em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram

FV	GL	QM	
		2,4-D	Picloram
Tratamentos	3	4.716667*	4.183333*
Erros	16	0.050000	0.125000
Total	19		
CV(%) =		15.42	26.19

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 5A Resumo da análise de variância para porcentagem de calos formados a partir de explantes de rizoma (**R3**) de bastão do imperador em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram

FV	GL	QM	
		2,4-D	Picloram
Tratamentos	3	3.000000 *	3.516667*
Erros	16	0.300000	0.125000
Total	19		
CV(%) =		49.79	30.74

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 6A Resumo da análise de variância para porcentagem de calos formados a partir de explantes de folha (**F**) de bastão do imperador em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram

FV	GL	QM	
		2,4-D	Picloram
Tratamentos	3	0.266667 ^{NS}	0.266667 ^{NS}
Erros	16	0.150000	0.275000
Total	19		
CV(%) =		93.65	62.20

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

^{NS} Não significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 7A Análise de variância para porcentagem de calos formados a partir de explantes de raiz (**r**) de bastão do imperador em diferentes concentrações de 2,4-D e picloram

FV	GL	QM	
		2,4-D	Picloram
Tratamentos	3	3.650000*	3.400000*
Erros	16	0.250000	0.225000
Total	19		
CV(%) =		47.62	43.12

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 8A Análise de variância para porcentagem de **calos** formados de bastão do imperador em diferentes reguladores de crescimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	11	67.783333	6.162121	20.386*	0.0000
Erros	4	1.900000	0.475000	1.571	0.1987
Total	44				
CV(%) =	25.18				

*Significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 9A Análise de variância para porcentagem de **oxidação** de bastão do imperador em diferentes reguladores de crescimento

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	11	2.933333	0.266667	1.128 ^{NS}	0.3635
Erros	4	0.400000	0.100000	0.423	0.7911
Total	44				
CV(%) =	38.88				

^{NS} Não significativo, com 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 10A Estimativas dos níveis de ploidia em calos de bastão do imperador selecionados pela análise de citometria de fluxo

2,4-D (mg L ⁻¹)	Estável (2C)	Mixoploíde	Picloram (mg L ⁻¹)	Estável (2C)	Mixoploíde
1,0 – R₁	3*	-	1,0 – R₁	-	3
1,0 – R₂	1	2	1,0 – R₂	-	3
1,0 – R₃	-	3	1,0 – R₃	3	-
1,0 – F	3	-	1,0 – F	-	3
1,0 – r	3	-	1,0 – r	3	-
2,0 – R₁	3	-	2,0 – R₁	3	-
2,0 – R₂	3	-	2,0 – R₂	-	3
2,0 – R₃	2	1	2,0 – R₃	3	-
2,0 – r	3	-	2,0 – r	3	-
4,0 – R₁	3	-	4,0 – R₁	3	-
4,0 – R₂	3	-	4,0 – R₂	3	-
4,0 – R₃	3	-	4,0 – R₃	-	3
4,0 – F	3	-	4,0 – F	3	-
4,0 – r	3	-	4,0 – r	3	-
TOTAL	36	6	TOTAL	27	15

*Quantidade de calos de três repetições.