



CONCENTRAÇÕES DE CINETINA NA INDUÇÃO DE CALOS EM GENÓTIPOS DE MANDIOCA

STEFANE DE JESUS SACRAMENTO; RAYANE BORGES NEVES; DENISE DOS SANTOS VILA VERDE; ANTÔNIO DA SILVA SOUZA

RESUMO

A mandioca é uma planta perene pertencente à família Euphorbiaceae que, devido à sua importância na segurança alimentar de países localizados em regiões tropicais, demanda o desenvolvimento de pesquisas científicas que possam melhorar o desempenho de sua cadeia produtiva. Mesmo considerando os avanços nos estudos realizados na área de cultura *in vitro* de tecidos, notadamente aquelas relacionadas com a técnica da micropropagação, ainda se faz necessário a compreensão dos efeitos de reguladores de crescimento na indução de calogênese em variedades de mandioca e, conseqüentemente, a formação de embriões somáticos e regeneração de plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de cinetina para a indução de calos em quatro variedades de mandioca presentes no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Utilizou-se miniestacas caulinares com 1,5 cm de tamanho como explantes, extraídas de plantas preestabelecidas *in vitro*, as quais foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS suplementado com 0,01 mg L⁻¹ de ANA e de BAP, na ausência e presença de 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, 3 mg L⁻¹, 4 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ de cinetina, e solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®. O experimento foi avaliado após 50 dias de cultivo mediante o percentual de explantes que formaram calos, o peso da massa fresca (mg), o diâmetro (cm) e o número de subdivisões do calo com aproximadamente 3 mm de tamanho. A ausência de cinetina no meio de cultura levou a falta de formação de calos. Com exceção do BGM0540 na dose de 4 mg L⁻¹ de cinetina, houve desenvolvimento de calo em todos os tratamentos contendo esse regulador, em taxas que variaram de 8,3% a 100% e uma média de 62,50% de explantes responsivos. A análise de variância mostrou um efeito altamente significativo em todas as situações, com exceção do diâmetro do calo no fator cinetina. Os resultados também mostraram que a concentração de 5 mg L⁻¹ de cinetina promoveu um crescimento eficiente de massa calosa.

Palavras-chave: calogênese; cultura de tecidos; reguladores de crescimento; citocinina; *Manihot esculenta* Crantz.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de propagação *in vitro* de plantas permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos em um ambiente artificial com condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo. Essas técnicas se baseiam na utilização da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade delas em produzir órgãos ou embriões (CARVALHO et al., 2006).

Para que seja possível essa totipotência celular, são utilizados meios de cultura compostos por substâncias que fornecem nutrientes e controlam o desenvolvimento das plantas

em ambientes naturais. Eles são ajustados visando atender às necessidades específicas das células, incluindo a adição de reguladores de crescimento como as citocininas, que controlam o desenvolvimento em sistemas *in vitro*. As concentrações desses reguladores em interação com o meio de cultura e com o explante influenciam na calogênese (ARAÚJO e PASQUAL, 2004). Nesse sentido, o uso de distintas concentrações de citocinina podem influenciar na resposta *in vitro* e várias combinações precisam ser avaliadas para a otimização da regeneração em cada espécie vegetal. A benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada (OLIVEIRA et al., 2013) devido à sua alta eficiência e baixo custo (PASQUAL et al., 2008), mas às vezes outros tipos como a cinetina (CIN) ou a 2-isopenteniladenina (2-iP) são empregadas, apesar de menos eficientes. A cinetina, o regulador utilizado neste estudo, é uma substância sintética que se assemelha às citocininas, tendo como principal função promover a divisão celular e, além disso, estimular a formação de brotos laterais, influenciando nas altas taxas de multiplicações das plantas propagadas de forma vegetativa (GODINHO, 2019).

Os calos, o objeto de estudo desse trabalho, são um grupo de massa celular formado a partir da multiplicação desordenada de células somáticas não diferenciadas. Pode ser uma resposta comum à lesões físicas ou químicas em tecidos vegetais cultivados em laboratório, e podem se diferenciar em órgãos, tecidos e até mesmo embriões, permitindo a regeneração de plantas completas. Para induzi-los, geralmente se utiliza qualquer parte da planta como explante (SOARES et al., 2002). A fim de induzir a formação do calo, muitas vezes torna-se necessário a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. O tipo específico, a concentração e a proporção de reguladores de crescimento necessários dependem da composição genética da planta e dos níveis hormonais endógenos. Na cultura de tecidos, o material vegetal usado como explante inicial é importante na indução da calogênese, pois o potencial de morfogênese nos calos resultantes pode variar dependendo da origem do explante (ROCHA; QUOIRIN, 2004).

Os calos podem ser posteriormente utilizados para a regeneração de plantas, em estudos relacionados com a embriogênese somática e como fonte de células para a transformação genética. Vale ressaltar que a eficiência da indução de calos pode variar de acordo com a variedade de mandioca utilizada, a concentração e combinação de fitohormônios e nutrientes presentes no meio de cultura, e outras condições de cultivo, como temperatura e luminosidade. Portanto, é importante avaliar e ajustar esses parâmetros de acordo com cada caso específico.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da cinetina em diferentes concentrações na indução de calos em mandioca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA. Para a indução dos calos, utilizou-se como fonte de explantes quatro genótipos de mandioca presentes no Banco Ativo de Germoplasma: BGM1552 (Peru Branca), BGM1325 (João Grande), BRS Novo Horizonte e BGM0540 (Guatiru). Minestacas com 1,5 cm de comprimento contendo uma gema axilar foram obtidas de plantas previamente cultivadas *in vitro* foram inoculados no meio de cultura MS contendo 0,01 mg L⁻¹ de ANA e de BAP, e as concentrações de cinetina de 0 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, 3 mg L⁻¹, 4 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹. Esse meio foi solidificado com 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 6 (genótipo x cinetina), contendo 12 repetições para cada tratamento, cada parcela sendo representada por um tubo de ensaio com uma planta. Após a introdução, os explantes foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 27 ± 1 °C, intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

A avaliação foi realizada após 50 dias de cultivo, levando-se em consideração a taxa de explantes responsivos e aspectos relacionados com o crescimento dos calos: diâmetro (cm),

peso da massa fresca (mg) e número de divisões do calo. Cada um deles foi subdividido em segmentos com aproximadamente 3 mm de tamanho. Para a determinação do peso da massa fresca dos calos utilizou-se uma balança analítica, enquanto papel milimétrico esterilizado foi usado para medir o diâmetro..

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F da análise de variância, com o auxílio do programa estatístico R, versão 3.4 (R Core Team, 2016), utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA et al., 2018). Para as médias das concentrações da cinetina foram ajustados modelos de regressão polinomial e as médias dos acessos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as variáveis que não atenderam as pressuposições da análise de variância, foi utilizado a transformação $\sqrt{x + 0,5}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 50 dias, observou-se que o tratamento com ausência de cinetina não desenvolveu calos nos explantes. Houve formação de calos em todos os explantes submetidos aos tratamentos com cinetina, com exceção do BGM0540 na dose 4 mg L⁻¹. Houve 100% de calos formados no BRS Novo Horizonte ao se utilizar 2 mg L⁻¹ de cinetina. Nos explantes que geraram calos, foi observada uma variação de porcentagem de 8,3% à 100%, resultando em uma média de 62,50% de calogênese. O BGM1325 e o BRS Novo Horizonte apresentaram as maiores eficácias na porcentagem de formação de calos, com 70% e 65% dos explantes responsivos, respectivamente (Figura 1). Conforme Fortes (1992), a formação do calo é um processo complexo e varia dependendo de uma série de fatores, como origem, tamanho e idade dos explantes, além da constituição do meio nutritivo e das condições físicas do ambiente. O balanço correto dos reguladores de crescimento é essencial para que esse processo ocorra de forma adequada, levando-se em conta também o genótipo e o estágio fisiológico da planta matriz.

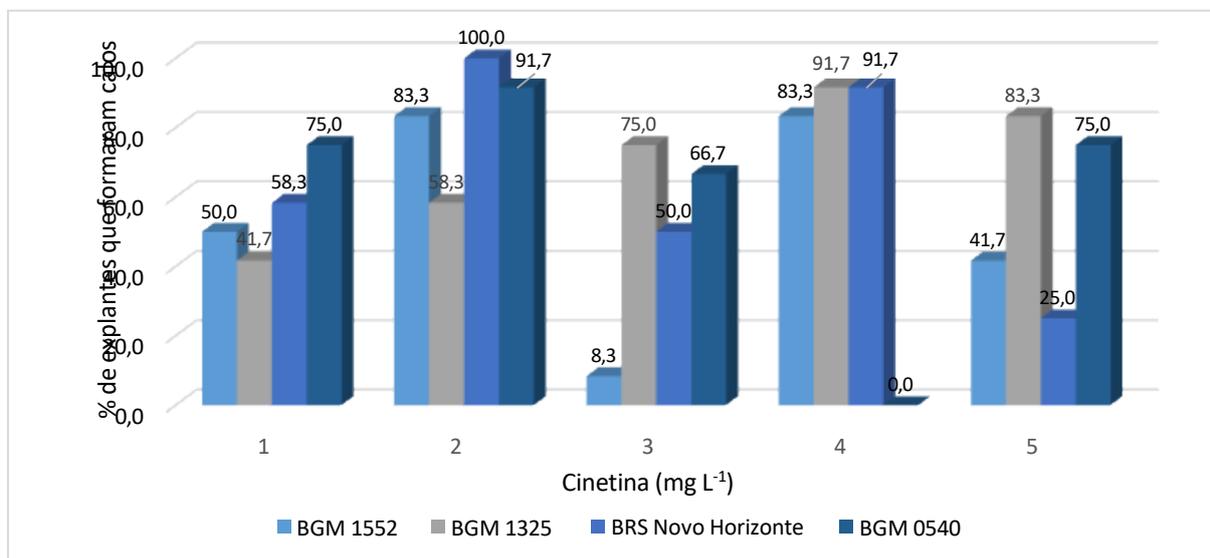


Figura 1: Porcentagem de explantes de acessos de mandioca que formaram calos em resposta aos tratamentos com diferentes doses de cinetina.

Em relação a análise de variância, observa-se que para a variável diâmetro do calo houve efeito altamente significativo para o fator genótipo e também para a interação dos fatores (cinetina x genótipo). Para o peso da massa fresca e o número de divisões do calo houve efeito altamente significativo para os fatores isolados e a interações dos mesmos. Observa-se na Tabela 1 que os valores do coeficiente de variação para diâmetro, peso da massa fresca e

número de divisões do calo foram de 31,76%, 27,3% e 17,47%, respectivamente.

Tabela 1: Resumo da análise de variância dos calos submetidos a diferentes concentrações de cinetina em quatro acessos de mandioca.

FV	GL	Diâmetro do calo	Peso da massa fresca do calo	Nº de divisões do calo
Cinetina	4	0,07 ns	20,30 **	0,81 **
Genótipo	3	0,23 **	72,35 **	1,02 **
Cinetina*genótipo	11	0,16 **	35,79 **	0,46 **
Resíduo	131	0,03	5,07	0,1
Média		0,58	63,49	2,94
CV (%)		31,76	27,3	17,47

FV = fator de variação; CV = coeficientes de variação; GL = graus de liberdade; **significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; ns não significativo a 5% de probabilidade.

Em relação ao diâmetro e peso da massa fresca do calo, observa-se que, com 1 mg L⁻¹ e 3 mg L⁻¹ de cinetina, não houve diferença estatísticas entre os genótipos. Na concentração de 2 mg L⁻¹ de CIN pode-se observar que o BGM1552 apresentou maior média entre os genótipos para diâmetro, peso da massa fresca e número de divisões do calo. O maior diâmetro do calo na concentração de 4 mg L⁻¹ da citocinina ocorreu no BRS Novo Horizonte, que diferiu estatisticamente dos outros acessos. Já na dose de 5 mg L⁻¹ as maiores médias para essa variável foram observadas no BGM1552, BRS Novo Horizonte e BGM0540.

Para o peso da massa fresca do calo, na concentração de 4 mg L⁻¹ de CIN, o BGM1552 e o BRS Novo Horizonte apresentaram médias estatisticamente superiores. Na concentração de 5 mg L⁻¹ do regulador, observa-se comportamento dos genótipos idêntico ao que ocorreu na variável diâmetro do calo (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito das concentrações de cinetina no diâmetro, peso da massa fresca e número de divisões do calo em quatro acessos de mandiocas.

Genótipo	Cinetina (mg L ⁻¹)					
	0	1	2	3	4	5
Diâmetro do calo (cm)						
BGM1552	-	0,55 a	0,87 a	0,50 a	0,50 b	0,76 a
BGM1325	-	0,56 a	0,46 b	0,46 a	0,48 b	0,45 b
BRS Novo Horizonte	-	0,54 a	0,42 b	0,65 a	0,75 a	0,73 ab
BGM0540	-	0,47 a	0,58 b	0,51 a	-	0,78 a
Peso da massa fresca do calo (mg)						
BGM1552	-	54,12 a	181,44 a	61,10 a	85,57 a	147,82 a
BGM1325	-	66,22 a	45,27 b	55,17 a	40,59 b	44,86 b
BRS Novo Horizonte	-	60,38 a	34,54 b	135,05 a	99,29 a	86,27 ab
BGM0540	-	44,28 a	42,54 b	66,35 a	-	140,07 a
Número de divisões do calo						
BGM1552	-	1,83 ab	4,70 a	4,00 a	2,90 b	5,20 a
Continuação da Tabela 2						
BGM1325	-	3,20 a	1,85 b	2,00 a	2,54 b	2,20 b
BRS Novo Horizonte	-	2,14 ab	2,75 b	3,50 a	4,54 a	4,67 a
BGM0540	-	1,55 b	2,36 b	2,00 a	-	4,22 a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Para o número de divisões do calo, verifica-se, na dose de cinetina de 1 mg L⁻¹, que os BGMs1325 e 1552, e o BRS Novo Horizonte apresentaram as maiores médias. Com 2 mg L⁻¹, o BGM1552 se destacou, diferindo estatisticamente dos outros acessos, com uma média de 4,70 segmentos. Na dosagem de 3 mg L⁻¹ de CIN não houve diferença estatística entre os genótipos, enquanto nas concentrações de 4 mg L⁻¹ e 5 mg L⁻¹ as maiores médias foram alcançadas pelo acesso BRS Novo Horizonte.

Vários estudos têm sido desenvolvidos visando a regeneração de plantas em diversas espécies vegetais empregando reguladores de crescimento, notadamente aquelas pertencentes aos grupos das auxinas e das citocininas. Em mandioca, por exemplo, Faye et al. (2015) encontraram que a cinetina foi o regulador que mais favoreceu o alongamento da parte aérea e do sistema radicular, assim como a formação normal das folhas de cinco variedades de mandioca. Por sua vez, Sessou et al. (2019) observaram que houve formação de calo nas bordas das folhas de três cultivares de mandioca após 15 dias de cultivo no meio nutritivo suplementado com cinetina, porém não houve diferença significativa entre as concentrações desse regulador e a testemunha.

Em relação às equações de regressão obtidas, pode-se observar que para o diâmetro do calo foi possível ajustá-las nos acessos BRS Novo Horizonte e BGM0540, sendo que em ambos a dose ótima de cinetina foi de 5 mg L⁻¹, com médias estimadas de 0,76 cm e 0,75 cm, respectivamente(Tabela 3).

Tabela 3: Equações de regressão, coeficientes de determinação (R²), doses ótimas (DO) e valores estimados (VE) das concentrações de cinetina em quatro acessos de mandioca.

Fatores	Acessos	Equação	R2 (%)	DO	VE
Diâmetro do calo (cm)					
Cinetina (acesso)	BGM 1552	$\hat{y}+=0,85$	-	2	0,85 ²
	BGM 1325	$\hat{y}^{ns}=0,56$	-	0	0,56 ¹
	BRS Novo Horizonte	$\hat{y}^{***} = 0,071x + 0,405$	66,09	5	0,76
	BGM 0540	$\hat{y}^{***} = 0,0714x + 0,3886$	78,46	5	0,75
Peso da massa fresca do calo (mg)					
Cinetina (acesso)	BGM 1552	$\hat{y}+=181,44$	-	2	181,44 ²
	BGM 1325	$\hat{y}^{ns}=0,56$	-	0	0,56 ¹
	BRS Novo Horizonte	$\hat{y}^* = 135,05$	-	3	135,05
	BGM 0540	$\hat{y}^{***} = 25,411x + 3,4286$	89,76	5	130,48
Número de divisões do calo					
Cinetina (acesso)	BGM 1552	$\hat{y}^*=5,20$	-	5	5,20 ²
	BGM 1325	$\hat{y}+=2,54$	-	3	2,54 ²
	BRS Novo Horizonte	$\hat{y}^{***} = 0,685x + 1,465$	96,54	5	4,89
	BGM 0540	$\hat{y}^{***} = 0,63x + 0,8$	84,16	5	3,95

Para o peso da massa fresca do calo houve apenas um ajuste de equação linear, em que a dose ótima de CIN foi também de 5 mg L⁻¹, com média estimada de 130,48 mg, para o BGM0540.

Considerando-se o número de divisões do calo, observa-se que para o BRS Novo Horizonte e o BGM0540 a dose ótima de cinetina foi novamente de 5 mg L⁻¹, com médias estimadas de 4,89 e 3,95 segmentos, respectivamente. Os valores dos coeficientes de determinação para as equações obtidas variaram entre 66,09%, para o diâmetro do calo, e 96,54%, para o número de divisões do calo, ambos para o acesso BRS Novo Horizonte.

4 CONCLUSÃO

O uso da concentração de 5 mg L⁻¹ de cinetina foi eficiente na indução dos calos para

os distintos genótipos de mandioca, embora seja necessário realizar novos estudos para promover a regeneração de plantas. Os acessos BGM1552 e BRS Novo Horizonte se destacaram entre os genótipos estudados.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.; PASQUAL, M.. Concentrações de 2,4-D e cinetina na indução de calose em anteras de *Coffea arabica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 35., 2004, Lavras. **Anais [...]**. Lavras: UFLA, 2004.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. e. **Fatores inerentes a micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148).

FAYE, A.; SAGNA, M.; KANE, P. D.; SANE, D. Effects of different hormones on organogenesis *in vitro* of some varieties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) grown in Senegal. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 8, p. 305-312, 2015.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; Nogueira, D. A. **Pacote experimental designs (Portuguese)**. R package version 1.2.0. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>.

FORTES, G. R. L. **Calogênese e organogênese in vitro de macieira (*Malus spp*), afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. 1992. 163 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, MG.

GODINHO, S. **Doses de cinetina em cultivares de soja**. Lavras: UFLA, 2019. 42 p.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A. de; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C. de; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

R Core Team R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016). Disponível em: <http://www.R-project.org/>

ROCHA, S. C. da; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 91-101 2004.

SESSOU, A. F.; KAHIA, J. W.; ATEKA, E.; HOUNGUE, J. A.; DADJO, C.; NJENGA, P.; AHANHANZO, C. Callus induction in three mosaic disease resistant cassava cultivars in Benin and genetic stability of the induced calli using simple sequence repeat (SSR) and sequence-characterized amplified region (SCAR) markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 31, p. 1044-1053, 2019.

SOARES, G. A.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R.C.; SANTOS, C. G.; SANTANA, J. R. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares e segmentosinternodais de *Inga affinis* em meio MS suplementado com diferentes

concentrações de 2,4-D. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais [...]** Belém: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2002.