

## **Análise da produção de calos em *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden em diferentes concentrações de reguladores de crescimento.**

Deus, Desiane Amaral de<sup>1</sup>; Abreu, Heber dos Santos<sup>2</sup>; Porto, Bruno Henrique Crespo<sup>3</sup>; Duarte, Mariana Silva<sup>1</sup>; Souza, Kelly Carla Almeida de<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Graduanda em Engenharia Florestal (UFRRJ), CEP 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, fone: (21) 26821128, e-mail: [deiseflora@bol.com.br](mailto:deiseflora@bol.com.br); <sup>2</sup>Professor do Instituto de Florestas (UFRRJ/IF), CEP 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, fone: (21) 26821128, e-mail: [abreu@ufrj.br](mailto:abreu@ufrj.br); <sup>3</sup>Graduando em Agronomia (UFRRJ), CEP 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, fone: (21) 26821128, e-mail: [porto@ufrj.br](mailto:porto@ufrj.br); <sup>4</sup>Mestre em Ciências Florestais e Ambientais (UFRRJ), CEP 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, fone: (21) 26821128, e-mail: [betyka@ufrj.br](mailto:betyka@ufrj.br).

### INTRODUÇÃO

*Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden tem sido implantado intensivamente em programas de melhoramento genético, principalmente seu híbrido, *Eucalyptus urograndis*. Por apresentar boa capacidade de regeneração e um rápido crescimento essa espécie se tornou de grande interesse para o estudo de técnicas que visam cultura de tecido e formação de calos.

Depois de formado, o calo pode dar origem a diferentes órgãos, dependendo do interesse da pesquisa, sendo que essa formação é induzida por diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Segundo Sinnott (1960) o estímulo que induz a formação do calo ocorre pela ação endógena do balanço de auxina e citocinina. O tipo e a concentração destes reguladores de crescimento influenciam na multiplicação *in vitro*, onde freqüentemente a melhor faixa situa-se entre 0,5 e 5,0mg/L para ambos reguladores de crescimento (Morales, 1999).

O TDZ, excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores do que 1,0mg/L (Huetteman & Preece, 1993), também tem sido utilizado na micropropagação. Esse trabalho teve como objetivo analisar qualitativa e quantitativamente o crescimento e o desenvolvimento de calos de *E. grandis*, em diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) + ANA (ácido naftalenoacético) e TDZ ([1-fenil-3-(1, 2,3-tiadiazol-5-il) uréia] + ANA, visando maior eficiência na produção de calos.

### MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Madeira, do Instituto de Florestas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IF/UFRRJ).

Sementes de *E. grandis*, após a assepsia com hipoclorito de sódio, tween 20 e peróxido de hidrogênio, foram inoculadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) para germinação. Decorridos 21 dias, em câmara de fluxo laminar, as plântulas que se apresentaram mais vigorosas tiveram seus ápices caulinares retirados e inoculados em meio de cultura MS acrescido de reguladores de crescimento, em diferentes concentrações. Cada tratamento foi acondicionado em recipientes de vidro, com 30 mL de meio de cultura e cinco explantes por recipiente, Após a inoculação foram mantidos no escuro, em câmara de crescimento, a 25±2°C. Cinco repetições foram realizadas para cada tratamento. Após o período de duas semanas os calos foram subculturados, em meio de cultura renovado, permanecendo em escuro. Para a avaliação dos tipos e concentrações de reguladores na calogênese foram utilizadas as combinações: 2,4-D + ANA, respectivamente, em mg/L: T1 (1,0+0,1); T2 (0,5+ 0); T3 (0,5+ 0,1); T4 (0,5+0,5); e das combinações de TDZ + ANA, respectivamente, em mg/L: T5 (0,5+0,1); T6 (1,0+ 0,1); T7 (0,5+ 0,5); e T8 (0,5+0).

Decorrido 60 dias foram realizadas as avaliações quantitativas utilizando-se os testes "H" de Kruskal-Wallis, para o número de calos em cada tratamento, e o teste "U" de Mann-Whitney, para os tamanhos dos calos nos tratamentos 1 e 5. A friabilidade foi avaliada por resistência mecânica à manipulação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das características dos calos de *Eucalyptus grandis* em diferentes tratamentos indicou que T5 apresentou o melhor resultado induzindo calos mais desenvolvidos, em maior quantidade e com aspecto mais friável. Além disso, pode-se observar que a auxina sintética ANA, mesmo na pequena quantidade (0,1mg/L), influenciou significativamente na calogênese, pois quando esta encontrava-se ausente (T2 e T8) não ocorreu formação de calos (Tabela 1)

**Tabela 1**-Análise das características apresentadas pelos calos de *E. grandis* nos diferentes tratamentos de indução de calos.

Características dos calos produzidos / Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Mediana do tamanho dos calos (cm)	0,8*				1,8*			
Número de calos	18**	0	2	1	20**	1	1	0
Porcentagem de calos (%)	90	0	10	5	100	5	5	0
Friabilidade dos calos	+	-	+	+	++++ +	+	+	-

2,4-D + ANA, em mg/L: T1 (1,0+0,1); T2 (0,5+ 0); T3 (0,5+ 0,1); T4 (0,5+0,5); e das combinações de TDZ + ANA, em mg/L: T5 (0,5+0,1); T6 (1,0+ 0,1); T7 (0,5+ 0,5); e T8 (0,5+0). O tamanho dos calos está representado pelas medianas. Para friabilidade quanto maior o número de sinais (+) mais friável. T2 e T8 não formaram calos (-).

\*Diferem estatisticamente entre si: U= 0,00; p<0,001. Os outros tratamentos não apresentaram resultados significativos para avaliação de tamanho.

\*\*São iguais entre si; diferindo dos outros tratamentos:  $H_{(7,N=32)}=23,956$ ; p=0,001.

Os tratamentos com 2,4-D produziram a mesma quantidade de calos por explantes que o tratamento com TDZ. Porém, este foi responsável por originar calos mais friáveis e em maiores tamanhos. Embora T5 tenha sido o mais eficaz no que se refere à friabilidade e tamanho de calos, T1 apresentou resultado relevante para o número de calos produzidos, apesar destes não terem apresentado o mesmo aspecto friável observado em T5 (Figura 2).

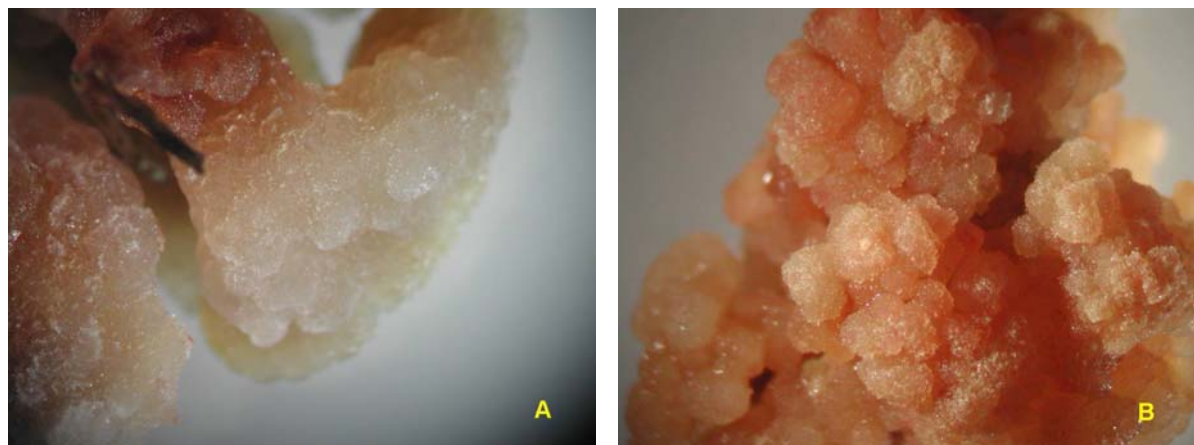


Figura 2. Calo de *E. grandis* formado em presença de 0,5mg/L de TDZ e 0,1mg/L de ANA (T5). A coloração mais clara caracteriza aspecto mais friável (A), e calo de *E. grandis* formado em presença de 1,0mg/L de 2,4-D e 0,1mg/L (T1) de ANA. A coloração mais escura caracteriza aspecto menos friável (B).

Acredita-se que a concentração de 0,1mg/L de ANA tenha sido a mais adequada para a formação de calos, uma vez que T5 e T1 resultaram num maior número de calos. Segundo Kaneda et al. (1997), o melhor desempenho do TDZ, aparentemente, pode estar relacionado à maior atividade citocínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas

durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o deste induzir ao acúmulo de auxinas e citocininas endógenas no tecido (Murthy, 1995).

Para Alves et al. (2004) os melhores resultados para calejamento foram constatados nos tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ e ANA. A vantagem da utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foi também citada por Lu (1993), cujos estudos indicaram que o TDZ apresentou maior eficiência na presença de ANA.

## CONCLUSÃO

Os reguladores de crescimento 2,4-D e TDZ se mostraram eficientes na produção de calos de *E. grandis*, no entanto apresentaram respostas diferentes quanto à friabilidade e tamanho. A concentração de 0,1 mg/L de ANA foi a concentração mais adequada para a formação de calos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.5, p.421-430, 2004.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

KANEDA, Y. et. al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.

LU, C.Y. The use of thidiazuron in tissue culture. In *Vitro Cellular and Development Biology - Plant Cell Reports*, v.29, p.92-96, 1993.

MORALES, C.F.G. et. al. Efeito do BAP TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Rev. Bras. de AGROCIÊNCIA**, v.5, n.3, 174-177, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco *tissue cultures*. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473-497, 1962.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuroninduced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachishypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.268-276, 1995.

SINNOTT, E.W. *Plant morphogenesis*. New York: **Mcgrawn Hill Book Company**.1960.

## PALAVRAS-CHAVES

*Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden; explantes, calogênese, reguladores de crescimento.