

## INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM EXPLANTES DE SEGMENTOS DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE URUCUEIRO EM DIFERENTES CITOCININAS<sup>1</sup>

### INDUCTION OF SHOOT BUDS IN LEAF EXPLANTS OF ANNATTO SEEDLINGS IN DIFFERENTS CYTOKININS

Jacqueline Leite Almeida<sup>2</sup> Francisco Célio Guedes Almeida<sup>3</sup> Raimundo de Pontes Nunes<sup>4</sup>  
Francisco Aécio Guedes Almeida<sup>5</sup>

#### RESUMO

Segmentos de folhas de plântulas de urucum (*Bixa orellana* L.), foram cultivados *in vitro*, em um meio básico idealizado por Murashige & Skoog (1962), suplementado com 0,5mg/l dos reguladores do crescimento, benzilaminopurina (BAP), cinetina (KN) e isopentenil-adenina (2iP), isolados ou combinados entre si, com o objetivo de avaliar qual a melhor citocinina ou combinação destas para indução de brotações de boa qualidade visando à micropropagação. Após 60 dias de cultivo, as gemas obtidas foram transferidas para um meio MS modificado, contendo a metade da formulação de sais minerais, sem a suplementação de reguladores do crescimento. Gemas de melhor qualidade foram obtidas nos tratamentos onde a KN e o BAP estavam em combinação. A KN sozinha não foi eficiente na indução de brotações. O maior número de gemas por explante foi obtido com KN, BAP e 2iP e no tratamento com apenas BAP.

**Palavras-chave:** urucueiro, *Bixa orellana* L., micropropagação, citocininas.

#### SUMMARY

Excised leaf explants of annatto (*Bixa orellana* L.) seedlings were cultivated on a Murashige & Skoog basal medium containing benzylaminopurine (BAP), kinetin (KN) and isopentenyl-adenine (2iP) individually or in combination, each at

concentration of 0.5mg/l, with the purpose of evaluated the best cytokinins or cytokinins combination for shoot bud formation. After 60 days, regenerated shoots were transferred to half strenght MS medium without growth regulators. Best shoots were observed where KN and BAP were added in combination. Isolated KN was ineffective for shoot bud formation. The maximum average number of shoot buds per leaf explant was obtained on medium with BAP, KN and 2iP in combination and on medium supplied of isolated BAP.

**Key words:** annatto, *Bixa orellana* L., micropropagation, cytokinins.

#### INTRODUÇÃO

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma árvore de pequeno porte da família Bixaceae, originária do norte da região amazônica (FALESI, 1987; RAMALHO *et al.*, 1987). Suas sementes são ricas em pigmentos como a orelina e a bixina que fornecem corantes de larga aplicação nas indústrias de laticínios, panificação, refrigerantes, cosméticos, tecidos e madeira (BRAGA, 1960; FALESI, 1987).

<sup>1</sup> Parte do trabalho de dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará (UFC) pelo primeiro autor, para a obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia.

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, MSc, Bolsista do CNPq. Departamento de Fitotecnia da UFC.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Adjunto, Departamento de Fitotecnia da UFC. Bolsista do CNPq. Rua Olímpio G. Souza, 440, Cocó, 60811-380, Fortaleza, CE. Autor para correspondência.

<sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia da UFC.

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Titular do Departamento de Biologia da UFC. Bolsista do CNPq.

É uma espécie que apresenta elevada taxa de fecundações cruzadas, resultando, daí, grande variabilidade genética que dificulta a conservação das características superiores nos plantios comerciais formados por sementes (ENRIQUEZ & SALAZAR, 1983).

A propagação vegetativa aparece como método viável para a obtenção de lavouras produtivas, desde que o patrimônio genético da planta matriz, fornecedora do material propagativo, não seja alterado nas plantas oriundas deste processo (SÃO JOSÉ & REBOUÇAS, 1991). Dentre os meios de propagação vegetativa a cultura de tecidos vegetais constitui-se em uma alternativa significativa, podendo em futuro bem próximo ser capaz de resolver a maioria das dificuldades dos métodos convencionais de propagação assexual (SILVA NETO *et al.*, 1992).

Conforme SIQUEIRA (1983), a cultura de tecidos se subdivide em diferentes áreas de aplicação de acordo com o explante ou inóculo utilizado. Nesse aspecto, destacam-se as culturas de meristemas, ovários, embriões, anteras, segmentos de planta (folha, caule, raiz e hipocótilo), células e protoplastos.

De acordo com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), as gemas adventícias são desejáveis como sistema de multiplicação, desde que seja mantida a integridade clonal pela formação nula ou mínima de calo.

Pela micropropagação podem ser regeneradas, no período de um ano, milhares de plantas clonais a partir de pequena porção de tecido vegetal, além de possibilitar o intercâmbio de material vegetal isento de problemas fitossanitários e a multiplicação, em qualquer época do ano, dos estoques mantidos *in vitro* (HU & WANG, 1984).

Bhojvani *et al. apud* LEITE *et al.* (1993), referem-se ao objetivo básico da micropropagação como sendo a maximização da multiplicação de gemas, obtida através da manipulação de reguladores de crescimento no meio da cultura.

Pierick *et al. apud* BARBOSA *et al.* (1993), afirmam que é fundamental a utilização de citocininas no meio de cultura para obter ótimas taxas de multiplicação e que a escolha da citocinina e da concentração a serem utilizadas dependerá da cultivar e do explante considerado.

A micropropagação pode agilizar o melhoramento genético do urucum, ao possibilitar a obtenção de grande quantidade de mudas em curto espaço de tempo, aumentando, assim, as chances de seleção de genótipos superiores quanto à produtividade, qualidade, teores de bixina nas

sementes, tolerância às condições edafoclimáticas e resistência a pragas e doenças (ALMEIDA *et al.*, 1992).

Levando-se em consideração os aspectos anteriormente mencionados, conduziu-se o presente trabalho com o objetivo específico de obter informações básicas sobre o comportamento *in vitro* do urucueiro, utilizando-se diferentes citocininas, com perspectivas ao estabelecimento de métodos efetivos de micropropagação para o urucueiro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE, no ano de 1992.

Ao meio de cultura MS, foram adicionados 30g/l de sacarose e as diferentes citocininas, de forma isolada ou combinada, resultando os seguintes tratamentos: KN (0,5mg/l); BAP(0,5 mg/l); 2iP(0,5mg/l); KN(0,5mg/l) + BAP(0,5mg/l); KN(0,5mg/l) + 2iP(0,5 mg/l); BAP(0,5mg/l) + 2iP(0,5mg/l); KN(0,5mg/l) + BAP(0,5mg/l) + 2iP(0,5mg/l); e, Controle.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 8g/l de ágar. Os meios foram aquecidos até a fervura para uma perfeita mistura do solidificador e colocados em tubos de ensaio que foram vedados com chumaços de algodão e autoclavados a 1,5kgf/cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos.

As plântulas que forneceram os explantes foram obtidas de sementes de urucum provenientes do Centro de Pesquisa Agronômica do Trópido Úmido (CPATU/EMBRAPA), as quais antes de serem semeadas foram tratadas com álcool 70% durante 5 minutos, enxaguadas 3 vezes com água destilada e autoclavada. Depois, as sementes foram colocadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% (água sanitária com 0,5% de cloro livre) por 15 minutos e, então, novamente enxaguadas por 3 vezes com água destilada e autoclavada. A semeadura foi feita em bandejas de polietileno tendo como substrato areia lavada. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento, com controle das condições assépticas.

Após 3 semanas da germinação, retiraram-se algumas folhas definitivas das plântulas, que foram submetidas a uma assepsia com álcool 70% por 2 minutos, enxaguadas 3 vezes com água destilada e autoclavada e depois colocadas em 20% de água

sanitária (0,5% de cloro livre) por 20 minutos e enxaguadas 3 vezes em água destilada e autoclavada, finalizando com a imersão em solução de sulfato de estreptomicina a 0,5% por 20 minutos e o enxague. Os segmentos da base da folha medindo, em torno de 5mm de comprimento, com pequena porção de pecíolo, foram excisados e inoculados nos tubos de ensaio, contendo 10ml de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) de acordo com os tratamentos citados anteriormente. Depois de inoculados, os explantes foram incubados em câmara de crescimento sob o fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro); temperatura média de 25°C; intensidade luminosa de 1000 lux; e, umidade relativa de 75%.

Os tratamentos tiveram 4 tubos de ensaio por repetição, perfazendo inicialmente um total de 16 tubos de ensaio por tratamento.

Após 60 dias de cultivo, os explantes foram repicados para um meio contendo a metade da formulação dos sais (micro e macronutrientes) do meio MS, sem adição de reguladores de crescimento, nas mesmas condições ambientais do período anterior.

A partir dos 45 dias após a repicagem, as seguintes avaliações foram efetuadas: calor na base do pecíolo e/ou dilatação do mesmo; explante com calos e pequenas brotações; explante com calos e com médias e grandes brotações, explante sem nenhum desenvolvimento; e morte ou contaminação do explante. Também, foram atribuídos valores aos tubos de ensaio de acordo com o número de brotações no explante. Aos explantes com 0 a 3, 4 a 7, 8 a 11, 12 a 15 e mais de 15 brotações, atribuíram-se os valores de 2, 4, 6, 8 e 10 respectivamente. Os dados resultantes foram submetidos a uma análise de variância, segundo o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se os tubos de ensaio como subamostras remanescentes em cada tratamento.

Aos 60 dias após a repicagem, foi realizada uma contagem do número de brotações por explante. Os tratamentos KN(0,5mg/l) e controle foram excluídos da avaliação, por não apresentarem nenhuma brotação. Os dados foram transformados para raiz quadrada e submetidos à análise de variância segundo o delineamento inteiramente casualizado, com amostragem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação qualitativa dos explantes após 60 dias de cultivo *in vitro*, encontram-se na Tabela 1 e os resultados obtidos na avaliação

realizada a partir dos 45 dias após a repicagem, na Tabela 2. Não se observam grandes variações entre as duas situações. O melhor tratamento considerado, isto é o que obteve maior número de explantes com médias e grandes brotações (classificação c), foi o que utilizou o meio com KN e BAP. Resultado semelhante foi obtido por NAIR *et al.* (1984), que obtiveram melhor resposta na indução de gemas, quando estes reguladores do crescimento foram usados conjuntamente, sugerindo haver sinergismo entre a KN e o BAP.

Tabela 1. Número de explantes de urucum (*Bixa orellana* L.) classificados qualitativamente por tratamento, após 60 dias de cultivo *in vitro*

Tratamento	Classificação <sup>1</sup>					Total
	a	b	c	d	e	
1. KN	16	0	0	0	0	16
2. BAP	0	4	4	0	8	16
3. 2iP	2	4	2	0	8	16
4. KN+BAP	2	2	12	0	0	16
5. KN+2iP	5	0	10	0	1	16
6. BAP+2iP	0	6	2	0	8	16
7. KN+BAP+2iP	0	5	11	0	0	16
8. Controle	0	0	0	12	4	16

<sup>1</sup> a - Calos na base do pecíolo e/ou dilatação do mesmo;  
b - Explantes com calos e pequenas brotações;  
c - Explantes com calos e com médias e grandes brotações;  
d - Explantes sem nenhum desenvolvimento;  
e - morte ou contaminação.

Tabela 2. Número de explantes de urucum (*Bixa orellana* L.) classificados qualitativamente por tratamento, a partir de 45 dias após a repicagem para meio MS e cultivados *in vitro*.

Tratamento	Classificação <sup>1</sup>					Total
	a	b	c	d	e	
1. KN	8	0	0	0	8	16
2. BAP	0	3	5	0	8	16
3. 2iP	2	3	3	0	8	16
4. KN+BAP	1	2	13	0	0	16
5. KN+2iP	4	1	10	0	1	16
6. BAP+2iP	0	6	2	0	8	16
7. KN+BAP+2iP	0	5	11	0	0	16
8. Controle	0	0	0	9	7	16

<sup>1</sup> a - Calos na base do pecíolo e/ou dilatação do mesmo;  
b - Explantes com calos e pequenas brotações;  
c - Explantes com calos e com médias e grandes brotações;  
d - Explantes sem nenhum desenvolvimento;  
e - morte ou contaminação.

O tratamento cujo meio continha as três citocininas (KN + BAP + 2iP), apresentou uma redução no número de explantes com médias e grandes brotações e um aumento no número de explantes com pequenas brotações, em relação ao tratamento que continha apenas com KN e BAP. Isso sugere que o 2iP pode interferir negativamente no alongamento das gemas.

Dentre as citocininas testadas isoladamente, o BAP destacou-se, uma vez que todos os explantes sobreviventes apresentaram brotações (pequenas ou médias e grandes). Semelhante resultado foi obtido por HU & WANG (1984), com o BAP, sendo a citocinina mais efetiva em promover a multiplicação, seguida, em ordem decrescente, por KN e 2iP.

Em relação à análise do número estimado de brotações, os melhores tratamentos foram aqueles que continham meios com apenas BAP; com BAP e 2iP e com BAP, 2iP e KN, sendo que o tratamento com apenas BAP, apresentou a maior média para o número de brotações/explante, apesar de não diferir estatisticamente dos tratamentos BAP + 2iP e KN + BAP + 2iP (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do número de brotações por segmentos de folhas de urucum (*Bixa orellana* L.), para os diferentes tratamentos, após 60 dias em meio MS, diluído a 50%.

Tratamentos	Médias <sup>1</sup>	
	Dados originais <sup>2</sup>	Dados estimados
1. KN	-	2,00a
2. BAP	15,71 b <sup>1</sup>	8,00 c
3. 2iP	5,50a	4,25ab
4. KN+BAP	10,13ab	6,50 b
5. KN+2iP	7,87a	5,46 b
6. BAP+2iP	10,89 b	7,00 bc
7. KN+BAP+2iP	16,50 b	7,75 c
8. Controle	-	2,00a

<sup>1</sup>Tratamentos com médias não seguidas da mesma letra diferem significativamente ao nível de 5% probabilidade pelo teste de Duncan.

<sup>2</sup>Nos tratamentos 1 e 8 não ocorreu formação de brotações, conforme Tabela 2.

Pela análise dos resultados encontrados na Tabela 3, pode-se verificar que o número médio de brotações por explante, nos tratamentos onde o BAP

estava presente, foi superior a 6,0 gemas/explante. SILVA NETO *et al.* (1992), obteve somente médias inferiores a 6,0 gemas/explante em segmentos caulinares de urucum usando o mesmo meio. Diferenças genotípicas podem ser as responsáveis pelos resultados obtidos nos dois experimentos.

Ao se proceder a contagem real das brotações e não mais a estimação destas, observou-se, que em relação ao número de brotações, as maiores médias de brotações por explante foram obtidas nos tratamentos BAP, KN + BAP, BAP + 2iP e KN + BAP + 2iP (Tabela 3), ou seja, os que continham BAP. NAIR *et al.* (1984), também observaram que o BAP foi a citocinina mais efetiva em induzir uma maior quantidade de gemas em segmentos de folhas de plântulas de ata (*Annona squamosa* Linn).

A menor média de brotações/explante foi encontrada no tratamento contendo 2iP. BILLINGS *et al.* (1988), trabalhando com segmentos de folhas de morango verificaram que o meio ótimo para regeneração de gemas continha 15M de 2iP.

As avaliações dos resultados, segundo diferentes critérios, são importantes para a fase de multiplicação, pois conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), nem sempre o tratamento que proporciona a maior taxa de multiplicação é o que proporciona a melhor percentagem de gemas de boa qualidade, com mais de 1,0cm, que garantirão maior sucesso na fase seguinte, a do enraizamento. Portanto, um meio termo deve ser estabelecido, combinando-se critérios qualitativos e quantitativos de avaliação.

A análise conjunta, efetuada pela observação dos resultados das diferentes avaliações, revela que os tratamentos que redundavam em uma alta taxa de multiplicação por explante e com um maior número de gemas de boa qualidade, foram os que continham BAP associado à KN. Isto sugere a existência de um sinergismo entre BAP e KN, com o BAP sendo responsável pela alta taxa de multiplicação, e a KN, pelo alongamento das brotações.

## CONCLUSÕES

O suprimento exógeno de citocininas é essencial para indução de brotações adventícias em segmentos de folhas de urucum.

Dentre as citocininas testadas (nas concentrações de 0,5mg/l), o benzilamino purina (BAP) é a mais efetiva na indução de gemas nos explantes. A cinetina (KN) isolada, na concentração testada não é

efetiva na indução de brotações em segmentos de folhas de urucum. O tratamento com KN e BAP combinado é o melhor quanto a taxa de brotações por explantes e a qualidade destas brotações. Para indução de maior número de brotações por explante, os melhores tratamentos são os que contêm BAP, isolado ou combinado com KN e isopentenil-adenine (2iP) ou com ambos. Segmentos de folhas de plântulas de urucum com pequena porção do pecíolo, são explantes apropriados para indução de organogênese *in vitro*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.C.G., ALMEIDA, F.A.G., MOREIRA, C. de M.P. Estudos para o desenvolvimento de cultura de tecidos em urucum (*Bixa orellana* L.). In: ALMEIDA, F. C. G. (Coord.) **Estudos agrônômicos da planta de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Fortaleza: UFC/CCA, Deptº de Fitotecnia, 1992. 145 p. p. 1-8. Relatório de Pesquisa.
- BARBOSA, M.H.P., PASQUAL, M., PINTO, J.E.B.P., et al. Efeitos da benzilaminopurina e ácido indol-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gerbera jamesonii* Bolus ex. Hook cv. appelblosem. **Pesq Agrop Bras**, Brasília, v. 28, n1, p. 15-19, 1993.
- BILLINGS, S.G, CHEEK, C, JELENKOVIC, G. Regeneration of blueberry plantlets from leaf segments. **Hortsciense**, v. 23,n. 4, 763-766, 1988.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. 540 p.
- ENRIQUEZ, G.A., SALAZAR, L.G. Variabilidad genetica del rendimiento y algunas otras características del achiote (*Bixa orellana* L.). CATIE, Turrialba. Costa Rica, 1983. p. 77-102. Informe técnico, 47.
- FALESI, I.C. **Urucunzeiro: recomendações básicas para seu cultivo**. Belém, EMBRAPA/UEPAE, 1987. 27 p.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.
- HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York, Mac-Millan, 1984. v. 1, p. 117-227.
- LEITE, D.L., PETERS, J.A., NAKASU, B.H. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de pereira. **Rev Bras Fisiol Veg**, São Carlos, v. 5, n. 1: p. 47-49, 1993.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAIR, S., GUPTA, P.K., SHIRGURKAR, M.V., et al. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Tissue and Organ Cult**, Dordrecht, Netherlands, v. 3, p. 29-40, 1984.
- RAMALHO, R.S., PINHEIRO, A.L., DINIZ, S.D. Informações básicas sobre a cultura e utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987. 22 p. Informe Técnico, 59.
- SÃO JOSÉ, A.R., REBOUÇAS, T.N.H. Aspectos técnicos da cultura do urucueiro. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2 - SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, 1, 1991. Campinas, SP, **Resumos ...**, Campinas, Instituto de Tecnologia, de Alimentos, 1991 p. 135-140.
- SILVA NETO, S.P. da, MATSUMOTO, K., SILVA, I.J. da. Efeito da benzilaminopurina, água de coco e carvão ativado na multiplicação *in vitro* de urucum (*Bixa orellana* L. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 40-45, 1992.
- SIQUEIRA, W.J. Cultura de tecidos. **Casa da Agricultura**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 32-33, 1983.