

## Calogênese *in vitro* em diferentes explantes de mandioquinha-salsa

### *In vitro* callogenesis in different Arracacha explants

Bárbara Nicole Daboit<sup>1</sup>, Laura Abatti<sup>2</sup>, Emanuelli Pereira da Silva<sup>3</sup>, Luiz Rafael Stunder<sup>4</sup>,  
Taciane Finatto<sup>5</sup>

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a calogênese *in vitro* em explantes foliares e peciolares de quatro cultivares de mandioquinha-salsa (ASA, BRS Acarijó, BRS Rubia e SCS380 Inca), na presença de diferentes reguladores de crescimento. O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois meios de cultura (T1 = 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB; T2 = 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) x dois tipos de explante x quatro cultivares e três repetições, totalizando 48 unidades experimentais. Os explantes foram introduzidos individualmente em frascos contendo meio de cultura e alocados em sala de crescimento, com fotoperíodo de 14h, por 40 dias em temperatura de 22 ± 2 °C. Com auxílio de um estereomicroscópio e uma régua aferiu-se o diâmetro (cm), tipo e coloração do calo. As análises foram realizadas no programa Genes. Os explantes foliares da cultivar BRS Acarijó e os peciolares da BRS Rubia sob influência de T2, apresentaram maior diâmetro de calo.

**PALAVRAS-CHAVE:** ácido indol-3-butírico; *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft; 2,4-diclorofenoxiacético; folha; pecíolo.

#### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate *in vitro* callogenesis in leaf and petiolar explants of four arracacha cultivars (ASA, BRS Acarijó, BRS Rubia e SCS380 Inca), in the presence of different growth regulators. The study was conducted at the Plant Biotechnology Laboratory of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco Campus. The experimental design was completely randomized with two treatments (T1 = 0.3 mg L<sup>-1</sup> of BAP + 0.1 mg L<sup>-1</sup> of IBA; T2 = 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D) x two types of explant x four cultivars and three repetitions, totaling 48 experimental units. The explants were introduced individually into flasks containing culture medium and placed in a growth room, with a 14-hour photoperiod, for 40 days at a temperature of 22 ± 2 °C. With the aid of a stereomicroscope and a ruler, the diameter (cm), type and color of the callus were measured. The analyzes were performed using the Genes program. The leaf explants of the cultivar BRS Acarijó and the petiolar explants of BRS Rubia under the influence of T2, showed greater callus diameter.

**KEYWORDS:** indole-3-butyric acid; *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; leaf; petiole.

## INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) é uma planta nativa da região Andina pertencente à família Apiaceae, de ciclo perene e hábito herbáceo. A propagação ocorre principalmente por via vegetativa, por meio de rebentos, devido ao baixo

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: barbaradaboit@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1197571324506407.

<sup>2</sup>Bolsista do CNPQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: lauraabatti@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 3432161029085341.

<sup>3</sup>Bolsista da CAPES. Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: eps.emanuelli@gmail.com. ID Lattes: 8794484840939160.

<sup>4</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: luizr.stunder@hotmail.com. ID Lattes: 2632897826727078.

<sup>5</sup>Docente no Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil. E-mail: tfinatto@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0528448968496434.

potencial germinativo das sementes, o que impele a escolha de plantas matrizes com boa sanidade e vigor (SANTOS; MADEIRA, 2008; PACHECO et al., 2020). Consideradas a parte mais consumida e comercializável da planta, suas raízes tuberosas se destacam por seu alto valor energético e nutricional (MADEIRA et al., 2021).

Por ser uma cultura rústica, com grande demanda de mão-de-obra, reduzido custo de produção e alto interesse econômico, se consolidou como uma alternativa na agricultura familiar (SANTOS; MADEIRA, 2008). Atualmente, o Brasil dispõe de uma área total de 17 mil hectares destinados a produção dessa raiz, que se difundem nas regiões de clima ameno e altitude elevada, como nos estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (MADEIRA et al., 2021). De acordo com Madeira *et al.* (2018) a produtividade média brasileira atingiu 248.685 toneladas no mesmo ano, o que tornou o país o maior produtor mundial da espécie.

A cultura de tecidos *in vitro* é uma técnica de propagação clonal vegetal em meio de cultura e na presença de reguladores de crescimento a partir de pequenos fragmentos de tecidos vivos (explantes). Por meio do processo de organogênese e do princípio da totipotência, ocorre a regeneração de plantas idênticas a matriz, formando populações geneticamente uniformes em escala comercial, mediante a criação de um ambiente artificial controlado, propício para seu crescimento e desenvolvimento (FIOR, 2007; FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011; LOYOLA-VARGAS & OCHOA-ALEJO, 2018). Essa técnica permite aplicações nas áreas de melhoramento genético, propagação e limpeza clonal, conservação de germoplasma e na obtenção de produtos do metabolismo especializado (FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011; LOYOLA-VARGAS & OCHOA-ALEJO, 2018).

A calogênese é decorrente da organogênese indireta, a qual se caracteriza pelo crescimento desordenado de massa de células indiferenciadas oriundas de explantes (FIOR, 2007; FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011), através da influência de hormônios vegetais como auxinas e citocininas (EFFERTH, 2019). As auxinas como, por exemplo, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA) (CID, 2015) são hormônios relacionados ao crescimento vegetal. Em contrapartida, as citocininas são responsáveis pela divisão celular (TAIZ et al., 2017) tais como a 6-benzilaminopurina (BAP) e a cinetina (CIN). Ambos reguladores são amplamente adotados e combinados para a indução de calos (CID, 2015).

A partir dos calos, utilizando estímulos e ambiente adequado, as células somáticas originam novos embriões (embriogênese somática indireta), proporcionando uma propagação massal de plantas que pode ser impulsionada pelo emprego de biorreatores, o que viabiliza a micropropagação em larga escala, diminui custos e mão-de-obra (FIOR, 2007; FALEIRO; ANDRADE; REIS JUNIOR, 2011; EFFERTH, 2019). Além disso, essa técnica contribui na mutação genética sendo uma alternativa rápida de se adquirir variação somaclonal e assim se obter novos genótipos para fins de melhoramento (BAIRU et al., 2011; KRISHNA et al., 2016).

Dessa forma, este trabalho tem por objetivo avaliar a indução de calos *in vitro* em explantes de quatro cultivares de mandioquinha-salsa na presença de diferentes reguladores de crescimento, visando posteriores estudos envolvendo a embriogênese somática e a variação somaclonal na espécie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. Foram utilizados dois explantes diferentes (folha e pecíolo) com 0,5 cm de comprimento, provenientes de plântulas *in vitro* de quatro cultivares de mandioquinha-salsa, sendo elas Amarela Senador Amaral (ASA), BRS Acarijó, BRS Rubia e SCS380 Inca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2x4 composto por dois tratamentos (T1 = 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB; T2 = 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), dois explantes, quatro cultivares e três repetições, totalizando 48 unidades experimentais. Cada uma foi constituída por um frasco de 200 mL contendo 30 mL de meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e seus respectivos tratamentos. Em seguida, foram vedados com tampa própria e autoclavados a 120°C e 1 atm por 20 minutos. Depois de resfriados os frascos foram armazenados em geladeira para subsequente uso.

Os explantes foram introduzidos individualmente nos frascos em câmara de fluxo laminar, com a face abaxial voltada para baixo, vedados e posteriormente alocados em sala de crescimento. Esses foram dispostos sob lâmpadas de luz fluorescente branca, com fotoperíodo de 14h pelo intervalo de 40 dias em temperatura de 22 ± 2 °C. Decorrido o período, os explantes foram avaliados individualmente, quanto ao diâmetro (cm), tipo de calo (friável ou compacto) e coloração do calo (branco ou marrom), com auxílio de um estereomicroscópio com resolução de 30-80x e uma régua de 15 cm.

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (P<0,05). Quando significativos, realizou-se o teste de Tukey (P<0,05) para comparação múltipla entre médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico Genes associado à linguagem de programação R (CRUZ, 2016).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com o Teste F a nível de 5% de probabilidade de erro, houve interação tripla entre os fatores para a variável diâmetro de calos (Tabela 1), além disso, foram observadas interações significativas entre tratamento e cultivar, tratamento e explante, cultivar e explante e para o fator explante.

**Tabela 1 – Resumo da análise de variância para a variável diâmetro de calos a partir de explantes foliares e peciolares de quatro cultivares de mandioquinha-salsa, na presença de AIB+BAP e 2,4-D em meio de cultura B5. UTFPR, Pato Branco, 2023**

	DIÂMETRO						
	trat	cult	explante	trat*cult	trat*explante	cult*explante	trat*cult*explante
G.L.	1	3	1	3	1	3	3
Q.M.	0,76	0,46	0,01	0,15	0,04	0,08	0,25
F. Calc.	13,69 <i>ns</i>	8,27 <i>ns</i>	0,33*	2,69*	0,68*	1,43*	4,50*
C.V.	58.23%						

Fonte: Autoria própria (2023).

\* Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F; *ns* não significativo.

Para a variável diâmetro de calo, o explante foliar da cultivar BRS Acarijó e o explante peciolar da cultivar BRS Rubia sob influência de T2, se destacaram com resultado significativo a nível de 5% de probabilidade de erro para os três fatores analisados (Tabela

2). Os demais resultados não foram significativos para o fator tratamento. Por outro lado, para o fator cultivar, os explantes foliares de BRS Rubia sob ação de T1, bem como os explantes peciolares da mesma cultivar sob ação de T2, evidenciaram resultados significativos. Em relação ao fator explante, os peciolares da BRS Rubia e os foliares da BRS Acarijó foram estatisticamente iguais quando na presença de AIB (T2). No, T1 os explantes não apresentaram diferenças significativas.

**Tabela 2 – Médias para diâmetro de calo de explantes foliares e peciolares de quatro cultivares de mandioquinha-salsa, na presença de AIB+BAP e 2,4-D em meio de cultura B5. UTFPR, Pato Branco, 2023**

DIÂMETRO			
TRATAMENTO	CULTIVAR	EXPLANTE	
		FOLIAR	PECIOLAR
T1 (AIB+BAP)	ASA	0,42aaA	0,37aaA
	BRS RUBIA	0,67aaA	0,55aaA
	BRS ACARIJÓ	0	0,23aaA
	SCS380 INCA	0	0
T2 (2,4-D)	ASA	0,66babA	0,40babA
	BRS RUBIA	0,40bbB	0,87aaA
	BRS ACARIJÓ	0,95aaA	0,37babB
	SCS380 INCA	0,30bbA	0,30bbA

Fonte: Autoria própria (2023).

\*Médias seguidas pela mesma letra na linha e coluna, minúscula para tratamento, minúscula em itálico para cultivar e maiúscula para explante, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos tipos de calos formados, os compactos foram predominantes em explantes peciolares, em contrapartida os friáveis prevaleceram em explantes foliares (Tabela 3).

**Tabela 3 – Tipos de calo obtidos em explantes foliares e peciolares de quatro cultivares de mandioquinha-salsa, na presença de AIB+BAP e 2,4-D. UTFPR, Pato Branco, 2023**

Cultivar	TIPO DE CALO			
	EXPLANTE FOLIAR		EXPLANTE PECIOLAR	
	TRATAMENTO			
	AIB+BAP	2,4-D	AIB+BAP	2,4-D
ASA	Compacto	Friável	Compacto	Compacto
BRS RUBIA	Friável	Compacto	Friável	Friável
BRS ACARIJÓ	Ausente	Friável	Compacto	Compacto
SCS380 INCA	Ausente	Compacto	Ausente	Compacto

Fonte: Autoria própria (2023).

Efferth (2019) relata que em casos de condições estéreis, os explantes vegetais sujeitos ao cultivo *in vitro* podem dar origem a uma massa de células sem formato determinado, com cores que podem variar do marrom claro ao incolor. Dentre as colorações de calos obtidas, T2 foi o que proporcionou maior frequência de calos de coloração marrom, como pode ser observado na Tabela 4. Segundo Cid (2015), em algumas espécies, as auxinas quando em elevadas concentrações são capazes de induzir a produção de etileno, hormônio que promove o amadurecimento e senescência em plantas, e assim, causar a oxidação do calo e cessar a multiplicação e a diferenciação celular. Por outro lado, o balanço hormonal de T1 possibilitou menor presença oxidativa em explantes de mandioquinha-salsa.

**Tabela 4 – Coloração de calos obtidos em explantes foliares e peciolares de quatro cultivares de mandioquinha-salsa, na presença de AIB+BAP e 2,4-D. UTFPR, Pato Branco, 2023**

Cultivar	COLORAÇÃO DE CALO			
	EXPLANTE FOLIAR		EXPLANTE PECIOLAR	
	TRATAMENTO			
	AIB+BAP	2,4-D	AIB+BAP	2,4-D
ASA	Branco	Branco	Branco	Marrom
BRS RUBIA	Branco	Marrom	Branco	Branco
BRS ACARIJÓ	Ausente	Marrom	Marrom	Marrom
SCS380 INCA	Ausente	Marrom	Ausente	Marrom

Fonte: Autoria própria (2023).

## CONCLUSÃO

Os explantes foliares da cultivar BRS Acarijó e os explantes peciolares da cultivar BRS Rubia cultivados em meio de cultura B5 + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, apresentam maiores diâmetros de calo.

Explantes foliares quanto peciolares das quatro cultivares cultivados em meio de cultura B5 + 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentaram calos com menor frequência de oxidação.

Trabalhos utilizando diferentes teores de 2,4-D podem ser encaminhados visando elucidar a concentração ideal na promoção de calogênese e embriogênese somática em *Arracacia xanthorrhiza*.

## Agradecimentos

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Taciane Finatto e aos colegas do grupo de pesquisa, pela orientação e auxílio na viabilização deste trabalho. Ao CNPq (processo n° 421821/2021-3) pelo auxílio financeiro e pela construção do conhecimento para a realização deste trabalho.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147–173, 2011.

CID, P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. 4<sup>o</sup> ed. Brasília: Embrapa, 2015. ISBN 978-85-7035-4068

CRUZ, C. D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen . **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 547–552, 2016.

EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50–59, 1 fev. 2019.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. d.; REIS JUNIOR, F. B. d. **Biotecnologia: estado da arte e aplicacoes na agropecuaria**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. ISBN978-85-7075-059-4.

FIOR, C. S. **Apostila sobre cultivo in vitro de plantas**. 2007. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/331346956\\_Apostila\\_sobre\\_cultivo\\_in\\_vitro\\_de\\_plantas](https://www.researchgate.net/publication/331346956_Apostila_sobre_cultivo_in_vitro_de_plantas). Acesso em: 30 Ago. 2023.

GAMBORG, O.; MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968

KRISHNA, H. et al. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 54, 2016.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 3–13, 2018.

MADEIRA, N. et al. Mandioquinha-Salsa *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. **Embrapa Hortaliças**, n. 1, p. 51, 2021. ISSN 2763-6801.

PACHECO, M. T. et al. Andean tubers grown in Ecuador: New sources of functional ingredients. **Food Bioscience**, v. 35, p. 1–9, 2020. ISSN 2212-4292.

SANTOS, F. F. d.; MADEIRA, N. R. **Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*)**. 2008. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioquinha/MandioquinhaSalsa/botanica.html#topo>.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 888. ISBN 978-85-8271-367-9.