

INFLUÊNCIA DO ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO E CINETINA NO CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DE TECIDOS DE SOJA *IN VITRO*¹

JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ², RAIMUNDO GLADSTONE MONTE ARAGÃO³, JOSÉ FERREIRA ALVES e RAIMUNDO FERDINANDO PINHEIRO MACIEL⁴

RESUMO - Na avaliação do desenvolvimento de tecidos de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, *in vitro*, utilizaram-se secções de hipocótilos de soja em meio modificado de Murashige e Skoog, contendo 10% de água de coco, e as concentrações 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/l de ANA, isoladas ou combinadas com idênticas concentrações de cinetina. Após 85 dias, observou-se que, na ausência de cinetina, houve a formação de raízes nos explantes em todos os níveis de ANA. Entretanto, na ausência dos reguladores não houve diferenciação em raízes. As diferentes concentrações dos reguladores não influenciaram na sobrevivência dos explantes, uma vez que, na ausência dos mesmos, 100% sobreviveram. Os pesos fresco e seco dos explantes sofreram redução tanto na ausência como em altas concentrações de cinetina, enquanto que ANA, em altas concentrações, favoreceu o aumento de peso nos dois parâmetros.

Termos para indexação: hipocótilos, cultura de tecidos, água de coco, ANA, raízes.

EFFECTS OF NAPHTHALENEACETIC ACID AND KINETIN ON *IN VITRO* GROWTH AND DIFFERENTIATION OF SOYBEAN TISSUES

ABSTRACT - In order to study the development of soybean *Glycine max* (L.) Merrill *in vitro*, hypocotyl sections were used under a modified medium of Murashige e Skoog, coconut water (10%) and five levels of ANA (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 and 4,0 mg/l) isolated or combined with the same levels of kinetin. After 85 days, it was observed that in the absence of kinetin, roots were induced in all levels of ANA, but in the absence of growth regulators roots were not differentiated. The number of alive explants was not influenced by different concentrations of ANA and kinetin, since in their absence 100% of them were alive. Fresh and dry weights were induced at the absence or higher concentration of kinetin, while ANA in higher concentration increased both weights.

Index terms: hypocotils, tissue culture, coconut water, ANA, roots.

INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura de tecidos constituem excelente instrumento de trabalho à disposição de pesquisadores das mais diferentes áreas do conhecimento científico. No caso de culturas que normalmente se propagam por

semente, estas podem apresentar variabilidade genética que pode ser prontamente superada através da propagação *in vitro* (Pasqual & Ando 1989). Esta técnica pode ser utilizada não só para produção rápida e, em larga escala, de plantas geneticamente uniformes, no desenvolvimento de variedades melhoradas, mas também na produção de clones livres de vírus e de outros patógenos.

Torna-se indispensável, para o sucesso do cultivo *in vitro*, a manipulação de reguladores de crescimento, tais como auxinas e citocininas, isoladas ou em combinações, para determinar um rápido crescimento de calos e o desenvolvimento organizado de raízes e parte aérea. Segundo Noggle & Fritz (1976), essas

¹ Aceito para publicação em 28 de maio de 1991.

Extraído da Dissertação apresentada à Univ. Fed. do Ceará, pela autora, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia-Fitotecnia.

² Enga.-Agr., M.Sc., Dep. Fitot. Centro de Ciências Agrárias, Univ. Fed. do Ceará/UFC. Caixa Postal 12.168, CEP 60451 Fortaleza, CE.

³ Eng.-Agr., Ph.D., Prof.-Titular, Dep. Fitot. CCA/UFC.

⁴ Eng.-Agr., M.Sc., Prof.-Adjunto, Dep. Fitot. CCA/UFC.

substâncias iniciam as reações químicas, mudam a composição química dentro da planta, e, quando associadas aos fatores ambientais, como luz, temperatura etc., interagem com os processos bioquímicos durante os processos de crescimento e diferenciação. Além dos fatores ambientais e do uso de reguladores de crescimento, torna-se necessário a utilização de meios nutritivos providos de elementos minerais, orgânicos, inorgânicos, açúcares e vitaminas a serem adotados diferencialmente para cada espécie vegetal e parte da planta utilizada.

É freqüente a utilização de extratos naturais, como a água de coco, considerada uma excelente fonte de vários fatores do crescimento requeridos para induzir a morfogênese em cultura de tecidos (Vasil & Hildebrandt 1966, Steward & Mapes 1971, Mehra & Mehra 1974). Esse efeito no crescimento e diferenciação em parte é explicado pela identificação, por van Staden & Drewes (1975), de compostos como zeatina e zeatinaribosídeo na água de coco.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos isolados e combinados de concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) e 6-furfurilaminopurina (cinetina) sobre o crescimento e diferenciação de tecidos de soja, *in vitro*, utilizando um meio modificado de Murashige e Skoog e água de coco.

MATERIAL E MÉTODOS

Seções de hipocótilos de soja de aproximadamente 2 mm e 0,003 g, foram coletadas de plântulas com três dias de germinadas e submetidas a inoculação em frascos contendo 25 ml do meio básico de Murashige & Skoog (1962) mais caseína hidrolizada (1,0 g/l), polivinilpirrolidona (5,0 g/l), L-glutamina (500 mg/l), L-asparagina (500 mg/l) e 10% de água de coco. Os tratamentos foram representados por concentrações de ANA e cinetina isoladas ou em combinações, ambas nos níveis de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg/l.

Os explantes foram mantidos em câmara de crescimento, a uma temperatura média de 27°C durante o dia e 24°C durante a noite; fotoperíodo de 8/16

horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 2000 lux. A umidade do ar situava-se, em média, a 60% durante o dia e 70% durante a noite. Os frascos contaminados até sete dias foram substituídos. O modelo experimental utilizado foi um fatorial 5 x 5, num delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Aos 35 dias, os quatro melhores calos de cada tratamento foram transferidos para frascos contendo 50 ml do meio já citado anteriormente, permanecendo por mais 50 dias nas mesmas condições ambientais. Para avaliação dos parâmetros, número de explantes vivos e número de explantes com raízes, foram consideradas quatro repetições, enquanto que para avaliação dos pesos fresco e seco, foram tomadas três repetições de cada tratamento, escolhidas aleatoriamente, e a comparação de médias foi efetuada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Número de explantes vivos

De acordo com a Tabela 1, ao final de 85 dias a percentagem de sobrevivência dos explantes foi de 95%. A ausência de ANA ou cinetina não afetou a taxa de sobrevivência, uma vez que nesses tratamentos 100% dos explantes sobreviveram. Esses resultados vão de encontro aos obtidos por Aragão (1976), em cultura de tecidos de jojoba, quando observou que a presença dos dois reguladores foi um fator crítico em regular o número de explantes vivos. Provavelmente a água de coco influíu na sobrevivência dos explantes, pois, de acordo com Al-Mehdi (1976), ela possui, além de elementos nutrientes, efeitos reguladores em cultura de tecidos.

Diferenciação em calos

Ao final de 85 dias, foi constatado o crescimento adicional em todos os calos subcultivados. Observou-se, porém, que, apesar de apresentarem um intenso crescimento, os calos cultivados na ausência dos reguladores de crescimento eram menos desenvolvidos, frágeis e com coloração mais amarelada. Constatou-se, também, que a presença de um ou

dois dos reguladores foi importante para um melhor desenvolvimento dos calos, possibilitando que eles fossem mais compactos, vigorosos e com coloração verde intensa, característica da presença de clorofila.

Número de calos diferenciados em raízes

Os dados da Tabela 2 mostram que após 85 dias, 71 dos 99 calos subcultivados diferenciaram-se em raízes, o que corresponde a aproximadamente 72% do total.

Na ausência dos dois reguladores não houve diferenciação, enquanto que na ausência de cinetina, ANA induziu a formação de raízes em 100% dos calos. Este resultados podem ser atribuídos à influência da água de coco, que, segundo van Staden & Drewes (1975), possui zeatina em sua composição. Provavelmente, essa substância complementa o teor de citocinina necessário à interação entre os dois reguladores, promovendo alto índice de enraizamento.

Com relação às concentrações de cinetina na ausência de ANA, verificou-se que o maior número de calos diferenciados em raízes ocorreu com o nível de 2,0 mg/l, enquanto que nas

concentrações de 3,0 e 4,0 mg/l não houve enraizamento. A cinetina nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/l, em combinação com ANA, determinou alta taxa de enraizamento. A partir desse nível, houve uma tendência de redução no número de explantes enraizados.

Peso fresco dos explantes

A análise de variância do peso fresco dos explantes mostrou que houve efeito significativo para ANA, cinetina e interação ANA x cinetina, apresentando um coeficiente de variação igual a 11,88%. Na Tabela 3 são apresentados os dados de peso fresco e as diferenças estatísticas entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O exame dos pesos totais resultantes da aplicação de cinetina em combinação com ANA mostrou que o maior peso fresco ocorreu na dosagem de 2,0 mg/l de cinetina, o qual diferiu, pelo teste de Tukey, dos valores obtidos nos níveis zero e 4,0 mg/l. Analisando-se o efeito da cinetina dentro dos níveis de ANA, verificou-se que a adição de somente cinetina ao meio de cultura também promoveu o aumento de peso fresco até o nível de 2,0 mg/l,

TABELA 1. Número de explantes vivos de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 85 dias de cultivo em um meio modificado de Murashige e Skoog, contendo 10% de água de coco e diferentes concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1988.

TABELA 2. Número de calos de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, diferenciados em raízes, após 85 dias de cultivo em um meio modificado de Murashige e Skoog contendo 10% de água de coco e diferentes concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1988.

Cinetina (mg/l)	Ácido α -Naftalenoacético (mg/l)					Total
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	
0,0	4	4	4	4	4	20
1,0	4	4	4	4	3	19
2,0	4	4	3	4	4	19
3,0	4	4	1	4	4	17
4,0	4	4	4	4	4	20
Total	20	20	16	20	19	95

Cinetina (mg/l)	Ácido α -Naftalenoacético (mg/l)					Total
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	
0,0	0	4	4	4	4	16
1,0	1	4	4	4	3	16
2,0	3	4	3	3	4	17
3,0	0	4	1	4	3	12
4,0	0	3	2	3	2	10
Total	4	19	14	18	16	71

enquanto que níveis mais altos provocaram redução. Por outro lado, observou-se que a cinetina, dentro dos demais níveis de ANA (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/l), não alterou significativamente o peso fresco dos explantes, embora tenha-se observado uma tendência de redução em níveis mais altos. Estes resultados concordam com os obtidos por Aragão (1976), que observou que níveis mais altos de cinetina em combinação com ANA acarretavam redução do peso fresco em cultura de tecidos de jojoba.

Analisando-se os pesos totais dos explantes tratados com combinações de ANA e cinetina (Tabela 3), observa-se que o aumento de peso fresco foi diretamente proporcional à concentração, até o nível máximo de 4,0 mg/l de ANA, cujo valor superou significativamente os dados resultantes da aplicação dos níveis zero e 1,0 mg/l. A adição de ANA na ausência de cinetina determinou um aumento de peso fresco até a concentração de 3,0 mg/l, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos dentro desse mesmo nível de cinetina.

Comparando ANA dentro dos níveis de cinetina, verifica-se que nos tratamentos com 2,0 mg/l de cinetina (com maior peso fresco total) apenas o peso fresco do tratamento com 4,0 mg/l de ANA (13,129 g) diferiu estatisti-

camente dos tratamentos com 1,0 e 2,0 mg/l (9,804 g e 10,316 g), não se observando diferenças entre os demais níveis. Observa-se, ainda, que ANA na ausência de cinetina proporcionou maior peso fresco total que cinetina na ausência de ANA. Estes resultados concordam com os obtidos por Matsubara (1975), quando observou a formação de calo no meio com somente auxinas, porém a adição de cinetina e extrato de levedura determinou o crescimento mais vigoroso dos calos.

Peso seco dos explantes

Os resultados da análise de variância do peso seco dos explantes evidenciaram a existência de efeitos significativos para ANA, cinetina e a interação ANA x cinetina. Conforme a Tabela 4, os dados de pesos totais resultantes da adição de ANA em combinação com cinetina mostram que o maior peso seco total foi obtido com o maior nível de ANA, o qual diferiu significativamente dos valores obtidos nos níveis zero e 1,0 mg/l. Quando se usou apenas ANA, houve aumento de peso seco até a concentração de 3,0 mg/l, a partir da qual ocorreu redução, embora não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos. Quanto aos níveis de cinetina, o máximo peso seco total foi observado com 2,0 mg/l, cujo

TABELA 3. Peso fresco (g) dos explantes de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 85 dias de cultivo em um meio modificado de Murashige e Skoog, contendo 10% de água de coco e diferentes concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil. 1988.

Cinetina (mg/l)	Ácido α -Naftalenoacético (mg/l)					Total
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	
0,0	B 4,012 b	A 10,180 a	A 9,912 a	A 11,622 a	A 10,492 a	9,244 b
1,0	A 9,932 a	A 10,210 a	A 9,910 a	A 11,118 a	A 11,259 a	10,486 ab
2,0	AB 11,713 a	B 9,804 a	B 10,316 a	AB 10,770 a	A 13,129 a	11,146 a
3,0	A 9,993 a	A 10,144 a	A 10,357 a	A 9,789 a	A 10,723 a	10,210 ab
4,0	B 5,531 b	A 9,140 a	A 10,666 a	A 10,388 a	A 11,776 a	9,500 b
Total	C 8,236	B 9,896	AB 10,232	AB 10,737	A 11,476	

Duas médias não seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, ou não precedidas pela mesma letra maiúscula em cada linha, diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

valor diferiu estatisticamente dos obtidos nos níveis zero e 4,0 mg/l, que apresentaram os menores valores de peso seco. Com cinetina na ausência de ANA, o máximo peso seco também foi observado no nível 2,0 mg/l, o qual apresentou diferença estatística dos níveis zero, 1,0 e 4,0 mg/l.

Pela Fig. 1, observa-se que, de modo geral, houve uma correspondência entre os pesos fresco e seco. No entanto, na Tabela 3, verifica-se que o máximo peso fresco ocorreu com ANA e cinetina nas concentrações de 4,0 e 2,0 mg/l, respectivamente, não correspondendo, portanto, ao máximo peso seco, o qual foi observado no tratamento com somente ANA na dosagem de 3,0 mg/l.

Verifica-se, ainda, na Tabela 4, que o menor peso seco foi obtido no meio sem reguladores. Este resultado mostra a importância dos reguladores de crescimento no desenvolvimento e aumento de peso dos tecidos, que é explicado pela ação das citocininas no processo de divisão celular (Miller et al. 1955, Letham 1967, Weaver 1972), no transporte, acúmulo e retenção de metabólitos em tecidos e órgãos (Letham 1967); na indução, formação ou regulação do DNA, RNA e proteínas (Helgeson 1968), e na incorporação de aminoácidos em proteínas (Gordon et al. 1975). Por

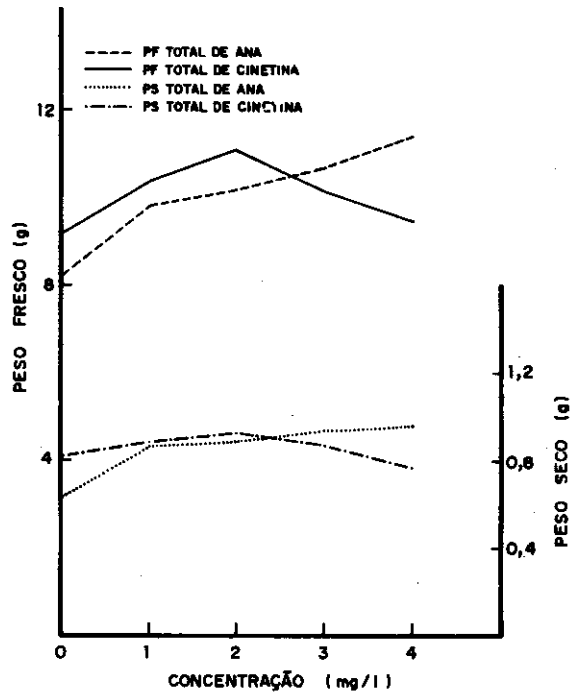


FIG. 1. Crescimento de calo de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 85 dias de cultivo em um meio modificado de Murashige e Skoog contendo 10% de água de coco e diferentes concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil. 1988.

TABELA 4. Peso seco (g) dos explantes de soja, *Glycine max* (L.) Merrill, após 85 dias de cultivo em um meio modificado de Murashige e Skoog, contendo 10% de água de coco e diferentes concentrações de Ácido α -Naftalenoacético e Cinetina. Fortaleza, Ceará, Brasil. 1988.

Cinetina (mg/l)	Ácido α -Naftalenoacético (mg/l)					Total
	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	
0,0	B 0,233 c	A 0,907 a	A 0,941 a	A 1,066 a	A 0,963 a	0,822 bc
1,0	B 0,705 b	AB 0,901 a	AB 0,863 a	A 0,981 ab	A 0,964 a	0,883 ab
2,0	A 0,968 a	A 0,859 a	A 0,866 a	A 0,918 ab	A 1,026 a	0,927 a
3,0	A 0,872 ab	A 0,860 a	A 0,907 a	A 0,847 b	A 0,893 a	0,876 ab
4,0	B 0,408 c	A 0,782 a	A 0,832 a	A 0,859 ab	A 0,966 a	0,769 c
Total	C 0,637	B 0,862	AB 0,882	AB 0,934	A 0,962	

Duas médias não seguidas pela mesma letra minúscula em cada coluna, ou não precedidas pela mesma letra maiúscula em cada linha, diferem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

outro lado, as auxinas também exercem efeitos positivos sobre o aumento de peso pela sua atividade na síntese de RNA, enzimas e proteínas (Noodén & Thimann 1964, Galston & Davies 1969) e na elongação, pelo aumento da plasticidade e elasticidade da parede celular (Weaver 1972).

CONCLUSÕES

1. Na ausência dos reguladores de crescimento houve diferenciação em calos em todos os explantes que permaneceram vivos até 85 dias, provavelmente pela influência da água de coco.

2. A formação de raízes foi induzida em todos os nfeis de ANA na ausência de cinetina, porém, na ausência dos dois reguladores não houve diferenciação em raízes.

3. Tanto a ausência como altas concentrações de cinetina, isoladas ou em combinações com ANA, reduzem os pesos fresco e seco dos explantes, enquanto que altas concentrações de ANA em combinações com cinetina favorecem o aumento dos pesos fresco e seco.

REFERÊNCIAS

AL-MEHDI, A.A. *Tissue Culture of Papaya, Carica papaya var. solo*. Arizona: The University of Arizona, 1976. 61p. Tese de Mestrado.

ARAGÃO, R.G.M. *Growth and Morphogenesis of Jojoba, Simmondsia chinensis (Link) Schneid Shoot Tips in Vitro*. Arizona: The University of Arizona, 1976. 114p. Tese Ph.D.

GALSTON, A.W.; DAVIES, P.J. Hormonal Regulation in Higher Plants. *Science*, v.163, p.1288-1297, 1969.

GORDON, M.E.; LETHAM, D.S.; BEEVER, J.E. Regulators of Cell Division in Plant Tissue. XXIV. The Effect of Cytokinins on Ribosome Yield from Radish Cotyledons. *Physiologia Plantarum*, v.35, p.27-33, 1975.

HELGESON, J.P. The Cytokinins. *Science*, v.161, p.974-981, 1968.

LETHAM, D.S. Chemistry and Physiology of Kinetin-Like Compounds. *Annual Review of Plant Physiology*, v.18, p.349-364, 1967.

MATSUBARA, S. Nutritional and Hormonal Requirements for the Growth of *Vigna sinensis* Callus *in Vitro*. *Physiologia Plantarum*, v.34, p.83-89, 1975.

MEHRA, A.; MEHRA, P.N. Organogenesis and Plantlet Formation *in Vitro* in Almond. *Botanical Gazette*, v.135, n.1, p.61-73, 1974.

MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKAMURA, F.S.; von SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. Structure and Synthesis of Kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, v.77, p.2662-2663, 1955.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

NOGGLE, G.R.; FRITZ, G.J. *Introductory Plant Physiology*. New Jersey: Prentice-Hall, 1976. 688p.

NOODÉN, L.D.; THIMANN, K.V. Inhibition of Protein Synthesis and of Auxin-Induced Growth by Chloramphenicol. *Plant Physiology*, v.40, n.1, p.193-201, 1964.

PASQUAL, M.; ANDO, A. Micropropagação da Laranja 'Valência' Através da Cultura de Gemas Axilares *in Vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.6, p.723-726, 1989.

STADEN, J. van; DREWES, S.E. Identification of Zeatin and Zeatinriboside in Coconut Milk. *Physiologia Plantarum*, v.34, p.106-109, 1975.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O. Morphogenesis and Plant Propagation in Aseptic Cultures of Asparagus. *Botanical Gazette*, v.132, n.1, p.70-79, 1971.

VASIL, I.K.; HILDEBRANDT, A.C. Variations of Morphogenetic Behavior in Plant Tissue Cultures. I. *Cichorium endivia*. *American Journal of Botany*, v.53, n.9, p.860-869, 1966.

WEAVER, R.J. *Plant Growth Substances in Agriculture*. San Francisco: W.H. Freeman, 1972. 594p.