

Calogênese em cotilédones de nim utilizando TDZ.

Rodrigues, Marcelo¹, Paiva² Renato; Silva Júnior, Jessé Marques³; Martinotto, Cristiano⁴; Stein, Vanessa Cristina⁵; Soares, Fernanda Pereira⁵.

¹Graduando de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Bolsista de iniciação científica (CNPq), e-mail: marcel.or.7@hotmail.com; ²Professor Associado, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, Caixa Postal: 3037, e-mail renpaiva@ulfa.com.br; ³Mestrando em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CAPES, e-mail: jesseagronomo@yahoo.com.br; ⁴Doutorando em Fisiologia Vegetal (UFLA), Bolsista CNPq, e-mail: cmartinotto@yahoo.com.br; ⁵Doutorandas em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq e CAPES, e-mail: vanessastein@oi.com.br; fernandapereirasoares@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

Azadirachta indica A. Juss, popularmente conhecida como nim, é uma espécie arbórea nativa da Índia, pertencente a família Meliaceae. Destaca-se por possuir substâncias de ação inseticida, fungicida, bactericida e nematicida (Martinez et al., 1998). Segundo Schmutterer (1995) citado por Pletsch (1997), dentre essas substâncias, estão centenas de princípios ativos.

Dos compostos químicos presentes no nim com atividade biológica, o mais ativo é a azadirachtina, que por sua vez possui semelhança com o hormônio da ecdise dos insetos, desse modo atua alterando essa transformação, podendo inclusive impedi-la (Martinez, 1998). Apresenta ainda, efeito repelente e intoxicante, afetando a biologia e desenvolvimento, oviposição e a viabilidade dos ovos (Neves & Nogueira, 1996).

A micropropagação oferece muitas vantagens para a prática agrícola, como a maior rapidez na obtenção de um grande número de mudas ou materiais vegetais, e a erradicação de pragas e doenças da cultura (Pletsch, 1997). A clonagem *in vitro* é particularmente útil para conservação de espécies ameaçadas, e a propagação de espécies recalcitrantes ou de ciclo de vida longo. Também pode ser aplicada as espécies vegetais produtoras de princípios ativos úteis a serem explorados economicamente, da mesma forma que a micropropagação de espécies leguminosas, frutíferas, florestais e ornamentais (Kerbauy, 1997)

A multiplicação do material vegetal por meio da micropropagação pode ser: a) por meio da proliferação de gemas axilares, b) mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (passando pela fase de calo) e c) por via embriogênese somática direta ou indireta (formando calo) (Grattapaglia & Machado, 1998).

Calo é um grupo ou massa de células vegetais com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres et al., 2000). Desenvolve-se em resposta a injúrias físicas ou químicas (George, 1996).

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calos. O balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta pode estimular a proliferação celular. Porém, Ozias-Akins & Vasil (1985) mencionam que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calos destacam-se o 2,4-D, ANA e, mais recentemente, o TDZ.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de TDZ na calogênese em cotilédones de nim e o desenvolvimento dos calos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse experimento foram utilizados cotilédones para indução de calos *in vitro*. Sendo assim, as sementes foram previamente desinfestadas em álcool 70% durante 60 segundos e em hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo por 10 minutos. Posteriormente, foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar, em álcool 70% durante 60

segundos e em hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2% de cloro ativo durante 20 minutos. Ao final desse processo, foram lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada, banhadas no fungicida Derosal e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi WPM (Lloyd & McCown, 1981), suplementado com 4% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar, pH ajustado em 5,8, cinco diferentes concentrações de TDZ e autoclavagem do meio de cultivo a 120°C durante 20 minutos. Os tratamentos citados em relação ao suplemento de TDZ foram: T0 = 0 mg L⁻¹; T1 = 0,01 mg L⁻¹; T2 = 0,1 mg L⁻¹; T3 = 0,5 mg L⁻¹ e T4 = 1 mg L⁻¹.

A incubação foi realizada em sala de crescimento, no escuro, a 27 °C ± 2 °C. Após 45 dias de cultivo *in vitro*, os tratamentos foram avaliados por meio da percentagem da área do explante coberto por calos, ou seja, taxa de crescimento do calo, que por sua vez será aplicado por uma nota de 0 a 3 referente a proporção de calos, onde 0 correspondeu ausência de calos e 3 toda superfície do explante coberto por calos, e 1 e 2 como valores intermediários. Do mesmo modo foi analisada a coloração dos calos formados onde 0 correspondeu aos calos mais escuros, 1 e 2 tonalidades mais claras e 3 para calos brancos; além disso, também foi analisada a textura, com 0 sendo atribuído aos calos lisos, 1 e 2 pouco granulados e 3 com aspecto muito granular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o início de formação dos calos nos tratamentos, observou-se diferentes colorações e textura destes calos nos explantes cotiledonares de nim (Figura 1A e 1B). O tratamento T2 (0,1 mg L⁻¹ de TDZ) apresentou a maior formação de calos com coloração clara e textura granular (Figura 2).

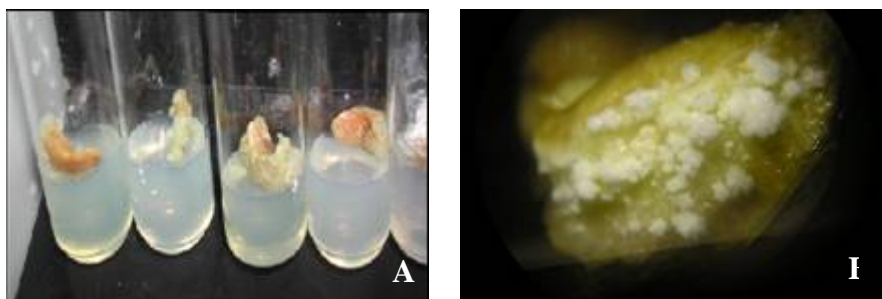


Figura 1. Início de calogênese (A) e aspecto de calos com coloração branca do tipo granular (B) em explantes cotiledonares de nim.

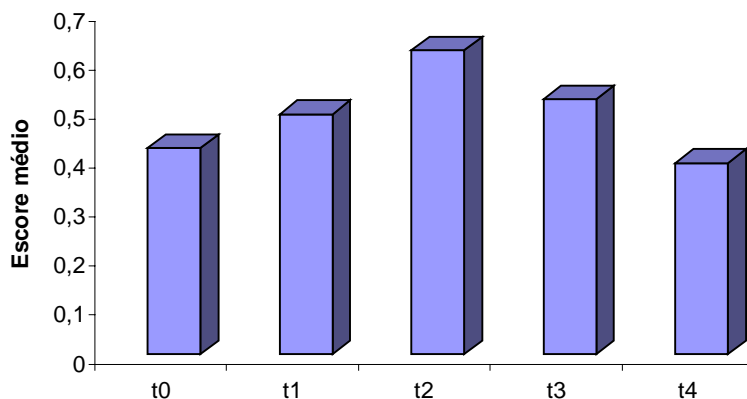


Figura 2. Crescimento de calos em diferentes tratamentos de TDZ.

Podemos inferir que os cotilédones de nim necessitam de uma concentração de 0,1 mg L⁻¹ exógena do fitormônio TDZ para induzir maior quantidade de calos, isso se deve provavelmente ao balanço hormonal das sementes.

Quanto à coloração apresentada pelos calos formados, houve maior ocorrência da cor branca, principalmente nos tratamentos T2 (0,1 mg L⁻¹) e T3 (0,5 mg L⁻¹), seguido dos tratamentos T4 (1 mg L⁻¹); T1 (0,01 mg L⁻¹) e T0 (0 mg L⁻¹).

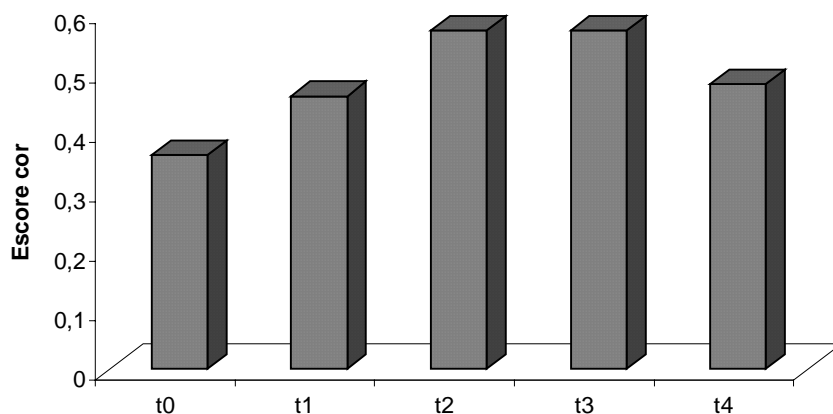


Figura 3. Ocorrência da coloração branca em calos de nim nos diferentes tratamentos de TDZ.

Segundo (FIGUEIREDO, 2007), observou-se que calos com essa coloração, geralmente possuem caráter embriogênicos, induzindo maior formação de gemas e brotos. Desse modo, provavelmente os calos dos tratamentos T2 e T3 possuem um grande potencial para formação de brotos.

Quanto a textura granular, também se destacou a maior formação no tratamento T2, seguido pelo T1 (0,01 mg L⁻¹).

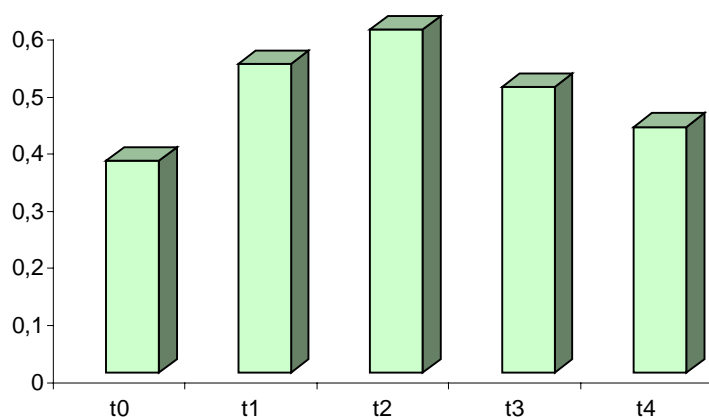


Figura 4. Ocorrência da textura granular em calos de nim nos diferentes tratamentos de TDZ.

Do mesmo modo, de acordo com (FIGUEIREDO, 2007), existe uma correlação entre calos de coloração clara e aspectos granulares. Deste modo, podemos inferir que os tratamentos T2 e T1, possuem maior potencial para formação de brotos.

CONCLUSÃO

Os maiores valores de crescimento, ocorrência de coloração branca e textura granular de calos induzidos em explantes cotiledonares de nim ocorre em meio de cultura WPM contendo 0,1 mg L⁻¹ de TDZ. Além disso, podemos inferir que o mesmo tratamento possui maior potencial para formação de brotos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1 - The technology. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas in vitro. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**. Ano I, n^o 1, p.30-33, maio 1997.

LLOYD, G; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p.421-427, 1981.

MARTINEZ, S.S.; LIMA, J. de; BOIÇA JUNIOR, A.L. Avaliação agronomica e fitoquímica de neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedências em vários locais da região sul e sudeste do Brasil. **XVII Congresso Brasileiro de Entomologia. Sociedade Entomológica do Brasil**, Resumo, p.831, agosto 1998.

NEVES, B.P.; NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss)** Goiânia: Embrapa, CNPAF; APA, 1996. 32p. (Circular Técnica, 28).

PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**. Ano I, n^o 1, p.12-15, maio 1997.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Columbia, v. 32, n. 3, p. 140-147, July/Sept. 1996.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v.35, p.271-297, 1990.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPq, 1990. 433 p.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v. 2, p. 128-147.

FIGUEIREDO, M.A. **Obtenção, Análises Morfológicas e Ultra-Estruturais de Calos de *Passiflora spp.*** 2007. p 44-56. Dissertação de (mestrado)- Universidade Federal de Lavras.

PALAVRAS CHAVE

Azadirachta indica, calo, crescimento, coloração, textura.