

Indução de calos em cotilédones de nim utilizando diferentes concentrações de 2,4-D e BAP

Rodrigues, Marcelo¹, Renato Paiva²; Silva Júnior, Jessé Marques³; Martinotto, Cristiano⁴; Vargas, Daiane Peixoto⁵.

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; ⁵Doutoranda em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq, e-mail: dvbio@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

A planta *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 nematocida (Martinez,1998). Segundo Schmutterer (1995), citado por Pletsch (1997), dentre essas substâncias, estão centenas de princípios ativos.

Entre os 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 produção em larga escala de clones, via cultura de tecidos, surge como importante alternativa para a produção de mudas selecionadas e sadias de nim. Essa técnica permite o isolamento asséptico de células ou tecidos da planta-mãe e seu cultivo em condições controladas, sendo que a expressão da totipotencialidade celular permite a regeneração de plantas inteiras idênticas a matriz (Tores & Caldas,1990). A micropropagação apresenta-se com grande superioridade em relação aos métodos vegetativos convencionais por incluir elevadas taxas de multiplicação, produção de material livre de doenças e pequeno espaço requerido para multiplicar um grande número de plantas (Torres & Caldas, 1990).

Podemos observar que 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).

Dentre os inúmeros fatores que afetam o cultivo *in vitro* e a regeneração de plantas em condições controladas, sem dúvida, são os reguladores de crescimento, tanto em seus aspectos qualitativos e quantitativos. O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito de 2,4-D e BAP na formação de calos de nim e o desenvolvimento dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cotilédones obtidos de germinação *in vitro* de sementes de nim. 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.

O meio de cultura utilizado foi WPM (Lloyd & McCown, 1981) suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar, pH ajustado em 5,8. Totalizou-se 16 tratamentos suplementados com os reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e/ou BAP (6-benzilaminopurina). A autoclavagem do meio de cultivo foi realizada a 120°C durante 20 minutos. Os tratamentos citados em relação aos suplementos utilizados nesse experimento, consta de todas as combinações possíveis de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) conforme Tabela 1.

TABELA 1. Descrição dos tratamentos contendo 2,4-D e BAP.

Tratamentos	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)
T0	0,0	3,0
T1	1,0	2,0
T2	2,0	1,0
T3	3,0	0,0
T4	0,0	0,0
T5	0,0	1,0
T6	0,0	2,0
T7	1,0	0,0
T8	1,0	1,0
T9	1,0	3,0
T10	2,0	0,0
T11	2,0	2,0
T12	2,0	3,0
T13	3,0	1,0
T14	3,0	2,0
T15	3,0	3,0

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior formação de calos ocorreu nos tratamentos T0 (3,0 mg L⁻¹ de BAP), T6 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e T10 (2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D) (Figura 1 e 2).

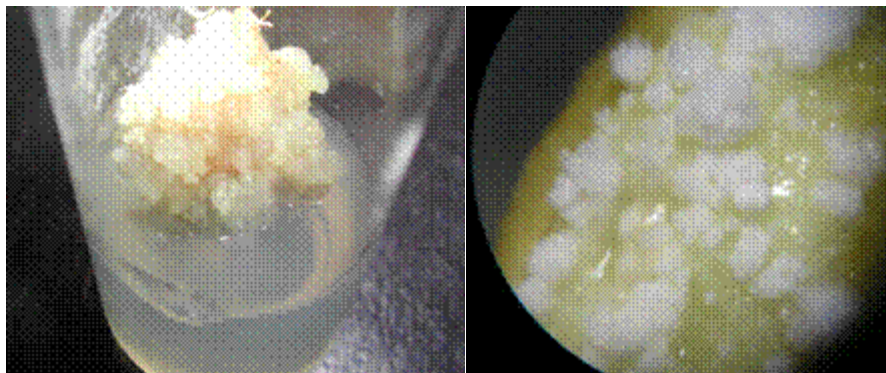


Figura 1. Calogênese em cotilédones de nim.

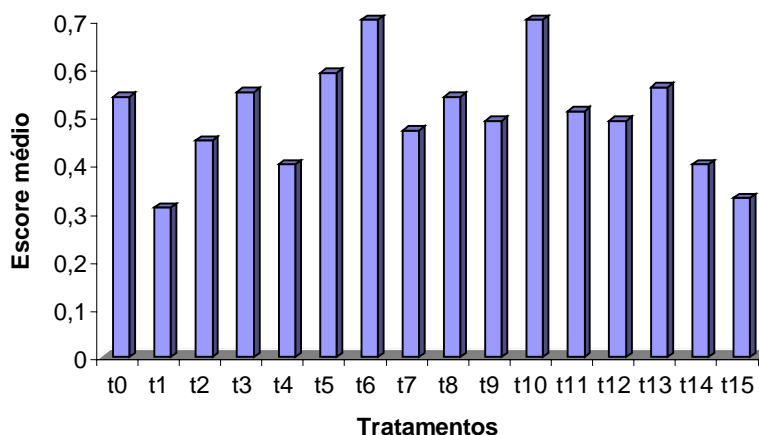


Figura 2. Formação de calos nos diferentes tratamentos contendo 2,4-D e BAP.

Quanto à coloração dos calos, houve maior ocorrência de calos brancos, principalmente nos tratamentos T0 (3,0 mg L⁻¹ de BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D), T6 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e T10 (2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D). Na textura dos calos, observou-se que houve a maior formação de calos com aspecto granular novamente nos tratamentos T0 (3,0 mg L⁻¹ de BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D), T6 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e T10 (2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D). Conforme apresentado na figura 3, a foto I aponta a correlação de quanto mais escuro for o calo, este possui aspecto liso; na foto II, encontra-se calos de aspecto morfológico do tipo granular e de coloração mais clara.

Na figura 4, observa-se a apresentação gráfica de todos os tratamentos, evidenciando os quatro melhores resultados, nos quesitos coloração (A) e textura (B) conforme descrito: tratamentos T0 (3,0 mg L⁻¹ de BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D), T6 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e T10 (2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D).

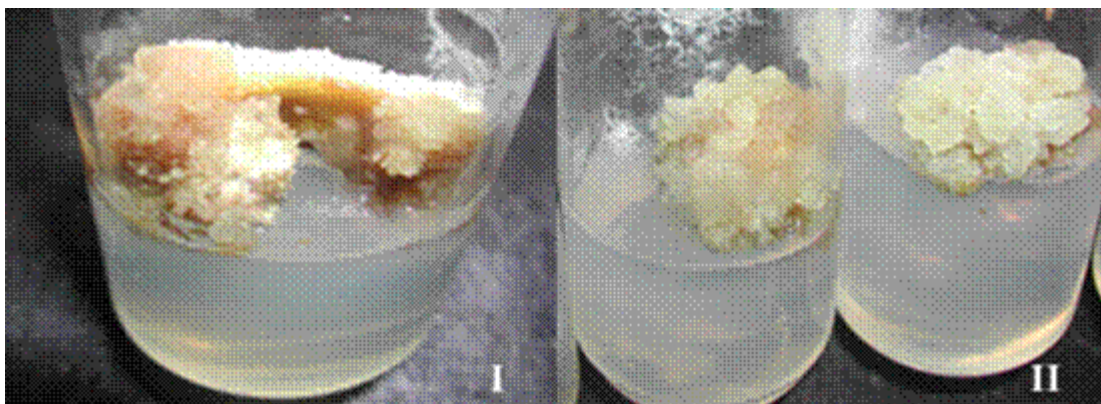


Figura 3. Foto I: quanto mais escuro for o calo, o mesmo se comporta com aspecto morfológico do tipo liso; Foto II: quanto mais claro, maior o aspecto granular.

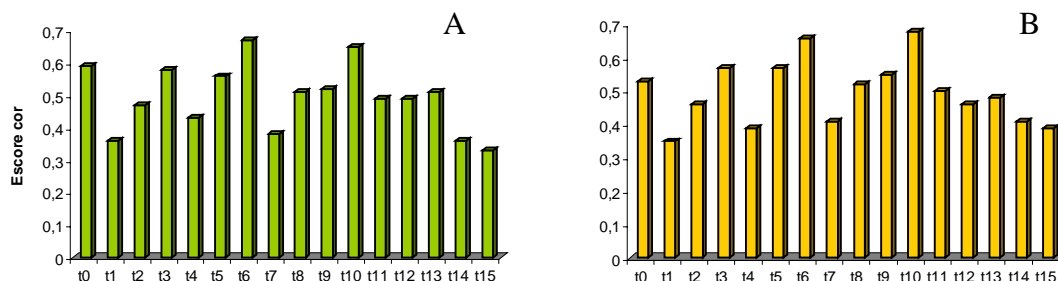


Figura 4. Coloração (A) e textura (B) dos calos nos diferentes tratamentos contendo 2,4-D e BAP.

Podemos observar que a coloração dos calos nos tratamentos T0;T3;T6 e T10 é mais clara e com aspecto morfológico do tipo granular. Desse modo, podemos inferir segundo (Figueiredo; 2007), que tais calos possuem células com maior potencial para indução e desenvolvimento de brotos, pois trata-se de calos embriogênicos, cujas células são organizadas e de formato isodiamétricas, caracterizando as condições favoráveis para indução de brotos.

Além disso, o experimento foi submetido a ausência de luz, o que favorece ainda mais as condições para o desenvolvimento de gemas e conseqüentemente formação de brotos, nos respectivos calos dos tratamentos T0;T3;T6 e T10.

CONCLUSÃO

Os tratamentos T0 (3,0 mg L⁻¹ de BAP), T3 (3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D), T6 (2,0 mg L⁻¹ de BAP) e T10 (2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D) promovem a maior formação de calos e desenvolvimento dos mesmos, com coloração clara e aspecto granular. Deste modo, tais tratamentos são mais viáveis para indução de brotação.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas in vitro. **Biotecnologia 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.

MATINEZ, S.S.; LIMA, J. de; BOIÇA JUNIOR, A.L. Avaliação agronomica e fitoquimica de neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedencias em vários locais da região sul e sedeste 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. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano I, n^o 1, p.12-15, maio 1997.

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 – NCPH, 1990. 433 p.

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, calos, cotilédones, 2,4-D, BAP, cultivo in vitro.