

Indução de calos *in vitro* em diferentes explantes de paricá.

Lulla Naiff Rabelo de Souza Reis¹; Osmar Alves Lameira²; Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro³; Allan Guerreiro Carneiro⁴; Carla Vanessa Borges Castro⁵; Silvaney Fonseca Ferreira⁶.

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal (UFV) Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa-MG, CEP 36570-000. e-mail: naiff_agro@yahoo.com.br; ²Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. Trav. Dr. Enéas Pinheiro sn, CP 48, Belém-PA, CEP 66095-100, e-mail: osmar@cpatu.embrapa.br; ³Doutoranda do curso de Ciências Florestais (UFRA). Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530, e-mail: mgti@amazon.com.br; ⁴Cientista da Computação (CESUPA). Av. Governador José Malcher, 1963, Belém-PA, CEP: 66060-230, e-mail: allanguerreiro@yahoo.com.br; ⁵Mestre em Agronomia (UFRA), e-mail: carlinhaufra@hotmail.com; ⁶MSc em Ciência Animal (UFPA). Rua Augusto Côrrea, 01, Guamá, Belém-PA. CEP 66075-110 - CP 479, e-mail: silvaney8@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

O *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby (paricá) ocorre na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana, peruana e boliviana. No Brasil, é encontrado nos estados do Amazonas, Pará, Mato Grosso e Rondônia, em solos argilosos de florestas primárias e secundárias, tanto em terra firme quanto em várzea alta (Sousa et al., 2005), é uma espécie de grande interesse econômico, principalmente em relação à produção de lâminas para compensados.

Na literatura, há poucas informações a respeito da aplicação da cultura de tecidos no paricá, e nos estudos da micropropagação *in vitro* da espécie, tem-se esbarado na dificuldade de estabelecimento de um protocolo dessa cultura, em função de ainda não ter sido possível obter uma taxa de enraizamento satisfatório. Porém, observa-se a presença constante de calos, o que sugere estudos acerca dos mesmos, de forma a aproveitar a potencialidade de regeneração dessas estruturas.

Uma das respostas mais comuns induzida em um tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, que é caracterizado por uma massa de células não diferenciada, de proliferação contínua e desordenada (Handro & Floh, 1990), que se desenvolve como resposta a alguma lesão química ou física (Paiva Neto, 1996).

A produção de calos depende de um balanço adequado de reguladores de crescimento (geralmente auxinas e citocininas) no meio de cultura. Porém este balanço varia grandemente com relação ao tipo de explante, tais como folhas, anteras, segmentos nodais, raízes, rizomas, etc., e à espécie com a qual se está trabalhando (Santos, 1998). Tisserat (1985) verificou que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina, contudo ocorreu o aumento da proliferação destes quando se adicionou citocinina ao meio nutritivo.

A escolha do explante é um dos fatores mais importantes para a indução de calos sendo que praticamente qualquer parte da planta, pode ser utilizada como explante, mas Pierik (1990) recomenda utilizar aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência. O objetivo do trabalho foi estudar o processo de indução de calos *in vitro* em diferentes explantes de paricá, a partir da interação entre 2,4-D e BAP.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fontes de explante foram utilizadas plântulas germinadas *in vitro* com 20 dias de cultivo. Os tratamentos testados foram constituídos de 3 combinações de 2,4-D e BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹) e 4 fontes de explante (segmento apical – SA; segmento nodal – SN; segmento intercotiledonar – SI e segmento cotiledonar – SC) .

Os segmentos apical e nodal, ambos medindo em torno de 0,5 cm e segmento intercotiledonar de aproximadamente 1,0 cm foram inoculados na posição horizontal, enquanto que segmentos cotiledonares de 0,5 cm² foram inoculados com a superfície

abaxial voltada para o meio de cultivo. Todos os explantes foram inoculados em frascos contendo 40 mL de meio de cultura básico MS (Murashige & Skoog, 1962) com as concentrações de NH_4NO_3 e Fe-EDTA reduzidas a metade (demais componentes em suas concentrações normais), sacarose 3%, ágar 0,6%, pH 5,8, e suplementado com o antioxidante ácido cítrico 0,1%, na presença ou ausência de 2,4-D e BAP, e mantidos no escuro em sala de crescimento sob temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5 (5 combinações de 2,4-D com BAP e 5 fontes de explante), com 5 repetições, totalizando 125 unidades experimentais, sendo que cada parcela foi constituída por um frasco contendo 3 explantes. A avaliação do experimento foi realizada 20 dias após a inoculação, onde se avaliou o percentual de explantes com calos; cobertura dos explantes por calos, levando em consideração as seguintes notas: 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos; a textura; coloração e oxidação.

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando houve efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste SNK ao nível de 5% de probabilidade. Os dados de percentual de explantes com calos e oxidação foram transformados para $\arcsen(X/100)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra que na ausência de reguladores de crescimento, não houve resposta calogênica em segmentos cotiledonares de paricá, mostrando que esses explantes não possuem concentrações suficientes de fitormônios endógenos para indução de calos, e também pelo fato de conter maior número de células já diferenciadas, em relação aos demais explantes que contêm maior atividade meristemática.

Observou-se que quando não houve suplementação com 2,4-D e BAP, segmentos apicais e nodais apresentaram maior percentual de explantes com calos, com 83,4 e 91,1%, respectivamente, em relação aos tratamentos em que houve adição desses reguladores de crescimento ao meio de cultivo. Tal fato demonstra que as concentrações de 2,4-D e BAP estudadas neste trabalho ocasionaram um desbalanço hormonal nesses explantes, reduzindo a resposta calogênica. Ao contrário do observado neste estudo, Rahim et al. (2003) observaram que na ausência de reguladores de crescimento, não houve formação de calos segmentos nodais de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*).

Para segmentos intercotiledonares, não foi verificada diferença significativa entre as interações de 2,4-D e BAP e a ausência destes, enquanto que para segmentos cotiledonares, só houve calogênese na presença de reguladores de crescimento. Em relação às diferenças entre os explantes, foi observado que segmentos apicais, nodais e intercotiledonares, não diferiram estatisticamente entre si na ausência de reguladores de crescimento, enquanto que nos demais tratamentos, segmentos intercotiledonares e cotiledonares apresentaram maior percentual de explantes com calos em relação aos segmentos apicais e nodais (Tabela 1).

Tabela 1. Calogênese em diferentes fontes de explante de paricá em presença de 2,4-D e BAP.

| 2,4-D + BAP (mg.L ⁻¹) | SA | SN | SIC | SC |
|--------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| | % | | | |
| 0 + 0 | 83,4 aA | 91,1 aA | 91,7 aA | 0,0 bB |
| 2 + 1 | 13,4 cB | 38,2 bB | 100,0 aA | 100,0 aA |
| 1 + 2 | 23,6 bB | 33,8 bB | 100,0 aA | 91,7 aA |

Médias seguidas por letras distintas entre si comparam: minúsculas, as combinações de 2,4-D e BAP; e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SN – segmento nodal; SIC – segmento intercotiledonar; SF – segmento foliar e SC – segmento cotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste SNK.

Trabalhando com a mesma espécie, Cordeiro et al. (2003) verificaram que o melhor comportamento dos explantes caulinares de paricá foi observado na presença de 1,5 mg.L⁻¹ de BAP com 1 mg.L⁻¹ de AIB e 1 mg.L⁻¹ de KIN com 1 mg.L⁻¹ de AIB, apresentando 90 % e 75 % de formação de calos, respectivamente.

Na ausência de reguladores de crescimento, o percentual de cobertura por calos em segmentos apicais, nodais e intercotiledonares não apresentou diferença significativa entre si, enquanto que em segmentos cotiledonares não houve formação de calos, conforme é apresentado na Tabela 2.

Em segmentos apicais, a maior cobertura por calos ocorreu na ausência de 2,4-D e BAP, enquanto que para segmentos nodais, não houve diferença estatística entre os tratamentos empregados. Verificou-se ainda que, mesmo não tendo ocorrido diferença significativa entre os segmentos intercotiledonares cultivados nos diferentes meios de cultivo, conforme foi mostrado na Tabela 1, o maior percentual de cobertura por calos ocorreu na presença de 2,4-D e BAP, sendo que esse explante apresentou maior percentual de cobertura por calos em relação aos demais explantes (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de cobertura por calos em diferentes fontes de explantes de paricá na presença de 2,4-D e BAP.

| 2,4-D + BAP (mg.L ⁻¹) | SA | SN | SIC | SC |
|--------------------------------------|---------|----------|---------|---------|
| | % | | | |
| 0 + 0 | 30,0 aA | 33,8 aA | 36,9 bA | 0,0 bB |
| 2 + 1 | 7,60 bC | 19,1 aBC | 65,0 aA | 40,1 aB |
| 1 + 2 | 13,4 bC | 19,7 aC | 73,2 aA | 33,1 aB |

Médias seguidas por letras distintas entre si comparam: minúsculas, as combinações de 2,4-D e BAP; e maiúsculas, as fontes de explante (SA – segmento apical; SN – segmento nodal; SIC – segmento intercotiledonar; SF – segmento foliar e SC – segmento cotiledonar), ao nível de 5% pelo Teste SNK.

Na pesquisa realizada por Azevedo (2003) com explantes foliares de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), a máxima produção de calos foi obtida utilizando-se 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg.L⁻¹ de BAP. Nos trabalhos de Rady e Nazif (1997), verificou-se que o uso de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ de BAP foi significativo na produção de calos em sene (*Cassia acutifolia*), e Goleniowski et al. (1992) observaram uma influência positiva do BAP associado ao 2,4-D na produção de calos em *Ambrosia tenuifolia*. Bhau e Wakhlu (2001) constataram que segmentos foliares foram os melhores tipos de explantes usados para indução de calos em amoreira (*Morus alba*), e que a melhor resposta calogênica foi obtida na presença de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, com 95 a 100% de formação de calos.

De acordo com análise visual, os calos formados apresentaram coloração bege e textura friável (Figura 1A) e branco com aspecto compacto (Figura 1B).

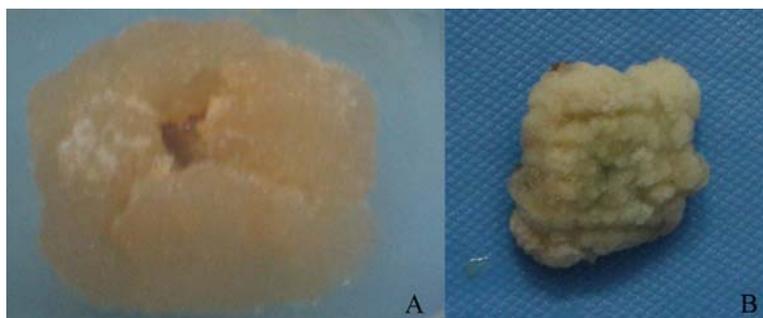


Figura 1. Formação de calos em segmentos cotiledonares de paricá cultivados em meio MS adicionados de 2,4-D e BAP, de coloração bege e aspecto friável (A) e brancos de textura compacta (B).

Observou-se que houve mais oxidação nos explantes inoculados em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, apesar de ter sido bastante freqüente nos demais tratamentos, dificultando o subcultivo dos mesmos. Por sua vez, Cordeiro et al. (2003) verificaram que os tratamentos sem regulador de crescimento apresentaram o menor percentual de oxidação em explantes de paricá, e à medida que aumentava a concentração do regulador, maior era a oxidação.

CONCLUSÕES

Na ausência de regulador de crescimento não há calogênese em segmentos cotiledonares; e na presença de 2,4-D e BAP há maior cobertura por calos, sendo que segmentos intercotiledonares são os explantes mais eficientes para obtenção de calos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, K. de S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspecto da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. Lavras: UFLA, 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

BHAU, B.S.; WAKHLU, A.K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, n.1, p.25-29, July, 2001. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/g3k47npg47122485/?p=0ab81a6b172047df941786c319673d33&pi=3>>. Acesso em 10 out. 2006.

CORDEIRO, I.M.C.C., LAMEIRA, O. A., OHASHI, S.T., Indução de calos in vitro de a partir de explantes caulinares de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá), In: 4 ENCONTRO DE GENÉTICA DO AMAZONAS, 1 ENCONTRO DE GENÉTICA DA REGIÃO NORTE. **Resumos**, Manaus (AM), ago. 2003, p.134.

GOLENIOWSKI, M.E.; SILVA, G.L.; TRIPPI, V.S. Effect of phytohormones on sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, n.7, p.2359-2361, July 1992.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP, EMBRAPA, CNPH, 1990, p.203-212.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAIVA NETO, V.B. **Comportamento in vitro de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. Lavras: UFLA, 1996. 39p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990. 326p.

RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. **Fitoterapia**, Roma, v.68, n.4, p.349-354, 1997.

RAHIM, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass Propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.2, n.2, p.184-187, 2003. Disponível em: <<http://www.ansinet.org/fulltext/ajps/ajps22184-187.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2006.

SANTOS, M.R.A. dos. **Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach**. Lavras: UFLA, 1998, 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

SOUSA, D.B.de; CARVALHO, G.S.; RAMOS, E.J.A. **Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)**. Manaus: INPA. n.13, 2005. 2p. (Informativo Técnico Rede Sementes da Amazônia). Disponível em: <http://www.rsa.ufam.edu.br/8080sementesespeciespdfdoc13.pdf>. Acesso em 22 mai. 2006.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis on plant regeneration. In: DIXON, R.A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. p. 9-105.

PALAVRAS-CHAVE

Schizolobium parahyba var. *amazonicum*, calogênese, 2,4-D, BAP.