

EFEITO DO 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS EM *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH.

**DINAH ISE J. G. E C. PINTO¹; JÉSSICA NASCIMENTO COSTA
VASCONCELOS²; ALONE LIMA BRITO³; JOSÉ RANIERE FERREIRA DE
SANTANA⁴**

1. Bolsista Fapesb, Graduanda em Agronomia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dinahagro@hotmail.com

2. Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana; e-mail: jejesmile@hotmail.com

3. Professora, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana; e-mail: lima_brito@yahoo.com.br

4. Orientador, DCBIO, Universidade Estadual de Feira de Santana; e-mail: raniere@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: calogênese; auxina; cumaru.

INTRODUÇÃO

Amburana cearensis (ALLEMÃO) A. C. SMITH., conhecida popularmente como “cumaru” ou “umburana-de-cheiro”, é uma planta arbórea da família das Leguminosae (Fabaceae), e subfamília Papilionoideae amplamente distribuída no Nordeste brasileiro. Sua madeira é utilizada na movelaria, e a casca bem como as sementes são utilizadas para fins medicinais, devido a sua atividade antiinflamatória, analgésica, antiespasmódica e broncodilatadora (LORENZI, 1992; ALMEIDA et al., 2010).

O sucesso das pesquisas químicas e farmacológicas de *A. cearensis* estimulou a produção de seus fitoterápicos em escala industrial. Porém, considerando que a maioria das plantas medicinais é explorada de maneira predatória e indiscriminada e que a indústria farmacêutica precisa de matéria prima homogênea e em larga escala, é necessária a utilização de sistemas de cultivo que possibilitem a obtenção de um grande número de plantas em tempo reduzido e permitam a conservação e exploração racional e sustentável das espécies.

Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos possibilitam a produção de um grande número de plantas a partir de um único indivíduo, podendo ser utilizada para a conservação e propagação dessa espécie em escala comercial. A micropropagação tem se mostrado uma alternativa viável para a conservação e reprodução de espécies nativas com risco de extinção. Tal técnica consiste basicamente em cultivar em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controlada, qualquer parte da planta, em meio nutritivo adequado; e pode ser feita por dois processos distintos: organogênese e embriogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A organogênese é o processo de neoformação de parte aérea ou raiz a partir de tecidos da planta. Já a embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro*. Ambos os processos podem ocorrer pela via direta ou indireta, quando há a necessidade de desdiferenciação do explante, com a consequente formação de uma fase intermediária de calo antes do estabelecimento das células competentes (BERTOZZO; MACHADO, 2010; AHUJA, 1992). A embriogênese somática indireta é considerada uma das formas mais adequadas para a multiplicação *in vitro*, pois possibilita elevada taxa de multiplicação, sendo a indução de calos embriogênicos uma das etapas mais importantes deste processo de regeneração de brotos.

Assim, o presente trabalho visa avaliar o efeito do 2,4-D na indução de calos em umburana-de-cheiro (*Amburana cearensis*).

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização do experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente a Unidade Experimental Horto Florestal/UEFS.

Material Vegetal

Para obtenção de plantas *in vitro*, sementes de amburana foram lavadas em água corrente por 10 minutos, em seguida desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em etanol a 70% por 1 minuto e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl [água sanitária comercial (Qboa ®) - 2,5% de cloro ativo] com 2 gotas de detergente neutro (Ypê ®) por 10 minutos. Após esse período, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada estéril e inoculadas em tubos contendo 15 mL de meio de cultura, conforme metodologia estabelecida por Campos (2009).

Efeito do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na indução de calos em diferentes tipos de explantes de *A. cearensis*.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (Wood PlantMedium), suplementado com 3% de sacarose (Synth ®) e solidificado com 0,7% de Agar (Himedia ®). O pH do meio de cultura foi aferido para $5,7 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N antes da autoclavagem, que foi realizada a temperatura de 121°C e pressão de 1atm por 15 minutos.

Os explantes (segmentos cotiledonares e foliares), oriundos de plântulas germinadas *in vitro* com 45 dias de idade, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 μM).

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 5, totalizando 10 tratamentos com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio. Após 30 dias foram avaliados: percentual de explantes responsivos (ER%), percentual da área do explante coberta por calos (AC%), coloração e textura dos calos.

Condições de cultivo

Os experimentos *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$, fotoperíodo de 16 h e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida através de lâmpadas brancas fluorescentes.

Análise Estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey para os fatores qualitativos, e ajustes de equação de regressão polinomial para os quantitativos usando o programa SISVAR, desenvolvido pela UFPA (FERREIRA, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância indicou efeitos significativos ($p < 0,05$) da interação entre o 2,4-D (D) e o tipo de explante (E) sobre a indução de calos de *A. cearensis* nas variáveis analisadas.

Com relação ao percentual de explantes responsivos em segmentos foliares e cotiledonares, a análise de regressão apontou um modelo quadrático ascendente ($p < 0,05$) para o efeito do 2,4-D na indução de calos (Figura 1). Para os segmentos foliares constatou-se que ao aumentar a concentração de 2,4-D houve aumento do percentual de explantes responsivos até atingir a concentração máxima de 21,94 μM com 99,42% de explantes com calos. Já considerando o percentual de explantes responsivos em segmentos cotiledonares, observa-se que o percentual máximo (99,38) de calos formados é obtido com o uso de 26,46 μM de 2,4-D (Figura 1).

O 2,4-D é a auxina mais empregada nos processos de calogênese. Tal uso está relacionado com o papel deste regulador de crescimento vegetal na célula, pois ele estimula

o início da divisão e atua controlando o crescimento celular através do aumento na produção de RNA polimerase, estimulando a produção de RNA e biossíntese de diversas proteínas de crescimento (GEORGE, 1996; OLIVEIRA, 2011). Assim, sob ação do 2,4-D, as células do explante passam pelo processo de dediferenciação, seguido de divisão (GEORGE *et al.*, 2008).

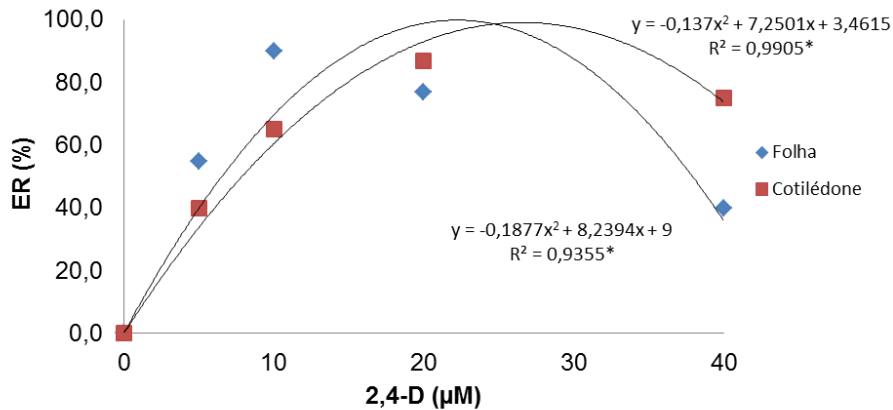


Figura 1 – Porcentagem de explantes responsivos (ER%) de *A. cearensis*, submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, 2016.

No presente trabalho, a adição de 2,4-D ao meio de cultura foi essencial na indução de calos visto que os explantes cultivados sem a adição de regulador de crescimento oxidaram. Efeitos similares foram relatados por Rahim *et al.* (2003) em explantes de *Eucalyptus camaldulensis* quando inoculados em meio de cultura livre de 2,4-D. Desse mesmo modo, Werner *et al.* (2007) comprovaram que os folíolos de *Caesalpinia echinata* são totalmente dependentes da presença do regulador de crescimento 2,4-D para a indução de calos.

Entretanto, resultado contrário foi observado por Reis *et al.* (2007) ao estudar a indução de calos em paricá (*Schizolobium parahyba var. amazonicum*), no qual mesmo sem a presença de regulador vegetal ocorreu a calogênese.

Na presente pesquisa observa-se que os melhores percentuais de calogênese foram obtidos nas concentrações de 21,94 µM e 26,46 µM para explantes foliares e cotiledonares, respectivamente. Porém, Sado (2009) relatou o maior potencial de explantes responsivos (73,4%) quando cotilédones de *Senna spectabilis* foram cultivados na concentração de 11,32 µM de 2,4-D. Já Vasconcelos *et al.* (2012) constatou que o percentual de calos em explantes foliares de *Myracrodruon urundeuva* ocorreu nas concentrações de 4,52 e 6,78 µM de 2,4-D.

O efeito do 2,4-D na indução de calos é bastante citado na literatura, porém não existe um padrão de qual concentração é mais eficiente. Este efeito é influenciado pela espécie, pelo genótipo e pelo explante, o que justifica o estabelecimento de protocolos específicos (INÁCIO, 2010).

Os explantes utilizados neste trabalho, folha e cotilédone, apresentaram alto potencial calogênico, com valores máximos de 99,42% e 99,38%, respectivamente. Segundo Grattapaglia & Machado (1998) e Handro & Floh (1990), qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante, contudo, é indicado o uso de tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, com maior capacidade para expressar a totipotência e apresentando maiores proporções de tecido meristemático e menores quantidade de lignina.

A eficiência dos explantes empregados neste estudo é evidenciada por Venturiere & Venturiere (2004) e Vasconcelos (2012). Enquanto Venturiere & Venturiere (2004)

averiguaram a maior frequência de calogênese no híbrido *Theobromagrandiflorum* x *Theobromaobovatum* usando o cotilédone como fonte de explante; Vasconcelos (2012) destaca a utilização de explantes foliares na indução de calos em aroeira-do-sertão (*Myracrodruonurundeuva*).

A análise de regressão apontou um modelo quadrático ascendente ($p < 0,01$) para a porcentagem de área do explante foliar e cotiledonar recoberta por calos (Figura 2). Após trinta dias de cultivo, houve formação calos sobre a superfície dos explantes em todas as concentrações testadas, exceto no meio de cultura isento de regulador vegetal. O percentual máximo de área foliar contendo calos (86,37%) é obtido na concentração de 20,67 μM , enquanto que o percentual máximo de área cotiledonar (66,11%), é observado na concentração de 34,80 μM (Figura 2).

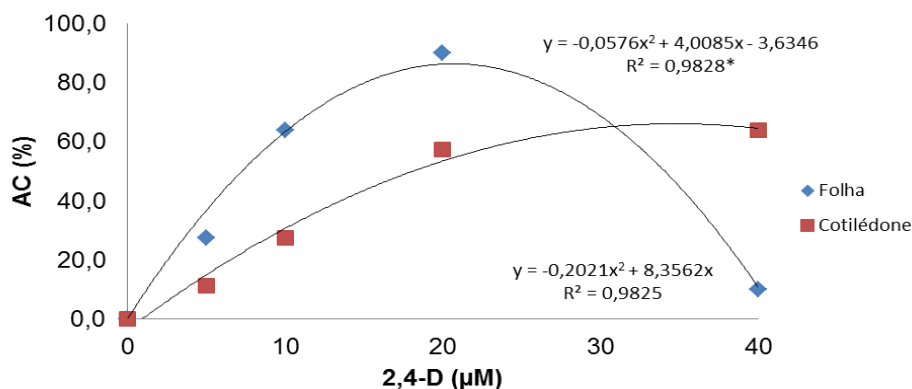


Figura 2– Porcentagem da área do explante recoberta por calos (AC%) em *A. cearensis* submetidos a diferentes concentrações de 2,4-D. *Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Feira de Santana, 2016.

CONCLUSÃO

A auxina 2,4-D é eficiente para a formação de calos em segmentos foliares e cotiledonares de *A. cearensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M. R. Micropropagation of woody plants. London: Kluwer Academic Publishers, v. 41, 507 p. 1992.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. Scientia Plena, v. 6, n. 11, 2010.
- BERTOZZO, F. & MACHADO, I. S. Meios de Cultura no Desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. Ciência e Agrotecnologia, 34(6): 1477-1482. 2010.
- CAMPOS, V. C. A. Micropropagação de *Amburana cearensis* (ALLEMÃO) A. C. SMITH. Dissertação (mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, p.102, 2009.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:183-260. 1998.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Ed. Plantarium, 352p. 1992.