

# Indução e Caracterização de Calogênese em *Amburana cearensis* (Allemao) A.C. Smith

## Induction and Characterization of Calogenesis in *Amburana* *cearensis* (Allemao) A.C. Smith

---

*Evelyn Sophia Silva Costa<sup>1</sup>; Ana Valéria Vieira de Souza<sup>2</sup>; José Raniere Ferreira de Santana<sup>3</sup> Jackson Rafael de Sá Carvalho<sup>4</sup>; Bruno Djvan Ramos Barbosa<sup>5</sup>*

### Abstract

The objective of this study was to determine the best treatment for induction and to characterize calli derived from the leaf segment of *A. cearensis* species *in vitro*. The medium used was WPM with 30 gL<sup>-1</sup> sucrose and gelled with 4 gL<sup>-1</sup> agar (Himedia). The pH of the culture medium was measured and adjusted to 5.9 ± 1.0 before autoclaving. It was supplemented with different concentrations of Picloram (0,0; 5,0; 10,0; 20,0 e de 40,0 µM) + benzilaminopurina (BAP) (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 e de 20,0 µM). Each treatment consisted of four replicates and four explants per plot. After 30 days of *in vitro*

---

<sup>1</sup>Mestranda em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana (Uefs), bolsista Capes, Feira de Santana, BA.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Horticultura, pesquisadora da Embapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Fisiologia Vegetal, professor da Uefs, Feira de Santana, BA.

<sup>4</sup>Biólogo, Universidade Pernambuco (UPE), Petrolina, PE.

<sup>5</sup>Biólogo, mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Uefs, bolsista Capes, Feira de Santana, BA.

culture, the percentage of the area covered by calluses (through the following scale: 1-25%, 2-50%, 3-75% and 4-100% of the explant area covered by callus), staining and texture (friable or compact). The vials were then held in a growth room at a temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  in the absence of light. The appearance of callus with globular characteristics characterized the first stages of tissue differentiation.

**Palavras-chave:** cumaru, planta medicinal, Caatinga, cultura de tecidos.

**Keywords:** cumaru, medicinal plant, Caatinga, tissue culture.

## Introdução

*Amburana cearensis* é uma planta arbórea nativa da Caatinga, conhecida popularmente como amburana, imburana, cumaru ou amburana-de-cheiro (MAIA, 2012). Do ponto de vista econômico, essa espécie possui ampla importância comercial por causa de suas inúmeras aplicações, como na fabricação de móveis (CANUTO et al., 2008), perfumaria, medicina popular e para fins farmacêuticos (MAIA, 2012). No Estado do Ceará, já é utilizada para a produção industrial do fitoterápico “xarope de cumaru” destinado ao tratamento de afecções pulmonares, asma, bronquite, coqueluche e tosses (PORTO, 2009).

A crescente demanda na exploração econômica da *A. cearensis*, causada pela sua vasta utilidade, tem provocado perdas significativas e ameaça a sua sobrevivência (CANUTO et al., 2010). Diante deste cenário, estudos voltados ao seu uso sustentável, conservação e propagação são de extrema importância, visto que a sua propagação é exclusiva por sementeira. Técnicas biotecnológicas para o cultivo *in vitro* como a cultura de tecidos surgem como uma alternativa para minimizar esse impacto, uma vez que possibilita a produção de mudas em larga escala em ambiente controlado e durante um curto período de tempo (BARRUETO CID, 2014).

Existem duas vias morfogênicas de regeneração *in vitro* – a organogênese (direta ou indireta) e a embriogênese somática (direta ou indireta). Na regeneração por meio da técnica indireta ocorrem sucessivas desdiferenciações caracterizadas pela fase de indução de calos, convencionalmente designada de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, em meios apropriados e suplementados por reguladores vegetais do tipo auxinas (CALDAS et al., 1998).

A embriogênese se caracteriza pela formação do embrião somático que passa pelos estádios globular, coração e torpedo e, ao fim do último estágio, estes amadurecem, germinam e originam a plântula (BARRUETO CID, 2014).

Considerando a importância econômica e ambiental da *A. cearensis* e as vantagens das técnicas biotecnológicas para a produção de mudas, objetivou-se com este trabalho promover a indução de calogênese para posterior formação de embriões somáticos.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Semiárido e as sementes utilizadas para o estabelecimento das espécies *in vitro* foram obtidas no Laboratório de Sementes da mesma instituição.

Para esta etapa inicial, as sementes passaram por uma desinfestação em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool a 70% por 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio – NaOCl [água sanitária comercial] a 2% de cloro ativo. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Foram colocadas para germinar em frascos de polietileno autoclaváveis contendo o meio de cultura MS/2. O meio foi acrescido de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e o pH foi aferido para 5,9 antes da autoclavagem.

Os frascos contendo as sementes foram mantidos em sala de crescimento com condições controladas de luz e T°C 25 ± 2°C. Os explantes utilizados para os experimentos para indução da calogênese foram folhas retiradas das plantas germinadas *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi o WPM – Wood Plant Medium (MC COWN; LLOYD, 1981) – suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e gelificado com 4 g L<sup>-1</sup> de ágar (Himedia). O pH dos meios foram aferidos e ajustados para 5,9 ± 1 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) a 0,1 N antes da autoclavagem, que foi realizada a temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm por 15 minutos.

Os reguladores vegetais foram adicionados ao meio de cultura antes da aferição do pH. Para a indução de calogênese, foram utilizados como explante segmento foliar (SF), retirados de plantas com 50 dias, oriundas da germinação *in vitro*. Os explantes foram

colocados em potes de polietileno autoclaváveis contendo 40 mL do meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações de Picloram (0,0  $\mu\text{M}$ ; 5,0  $\mu\text{M}$ ; 10,0  $\mu\text{M}$ ; 20,0  $\mu\text{M}$  e de 40,0  $\mu\text{M}$ ) + benzilaminopurina (BAP) (0,0  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5,0  $\mu\text{M}$ ; 10,0  $\mu\text{M}$  e de 20,0  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  em ausência de luz.

Cada tratamento foi constituído de quatro repetições e quatro explantes por parcela. Após 30 dias de cultivo in vitro, avaliou-se a percentagem de área do explante recoberta por calos (por meio da seguinte escala: 1 – 25%; 2 – 50%; 3 – 75% e 4 – 100% da área do explante recoberta por calos), coloração e textura (friável ou compacto). As porcentagens de indução de calos in vitro foram calculadas com base em suas respectivas médias de acordo com as seguintes formas:

Número de calo formado:

$$NC = NF \times 100 / No \text{ de explante.}$$

Número de calo 25%:

$$NC_{25\%} = NF_{25\%} \times 100 / NF$$

Número de calo 50%:

$$NC_{50\%} = NF_{50\%} \times 100 / NF$$

Número de calo 75%:

$$NC_{75\%} = NF_{75\%} \times 100 / NF$$

Número de calo 100%:

$$NC_{100\%} = NF_{100\%} \times 100 / NF$$

Em que  $N$  representa o número de explantes,  $No$  representa o número inicial de explante, e  $NF$  o número final de explante.

## Resultados e Discussão

Não houve a indução de calos em nenhuma das repetições testadas com ausência dos reguladores vegetais e nos tratamentos acrescidos do regulador BAP no meio de cultura WPM (Tabela 1). Dias (2010), trabalhando com bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*), constatou que os explantes cultivados em meio sem adição de reguladores vegetais não induziram calos.

Entre os tratamentos utilizados para a indução de calos em explantes foliares, observou-se que o maior percentual de formação de calos na superfície do explante ocorreu com  $5,0 \mu\text{M}$  de picloram na ausência de BAP, com valor médio de 18,75% (Tabela 1).

Os calos formados na presença do picloram apresentaram, no início da cultura, texturas friáveis e de tonalidade branca a amarelada. Entretanto, no decorrer do desenvolvimento, observou-se calos com formatos globulares com coloração entre o bege claro ao marrom escuro. Essas estruturas são caracterizadas por Caldas et al. (1998), como o primeiro estágio de diferenciação do tecido, seguido pelos estágios cordiforme, torpedo e cotiledonar. Essa mesma estrutura pode ser caracterizada tanto na presença de organogênese como embriogênese somática, podendo ser comprovada apenas por meio de análises da morfologia interna (TREVIZAM, 2005).

Houve a indução de raízes após 28 dias do material cultivado no meio de cultura em todos os tratamentos.

**Tabela 1.** Análise da porcentagem da área do explante recoberta por calos (%) de *Amburana cearensis* submetido a diferentes concentrações de picloram + benzilaminopura (BAP).

Tratamento Picloram + BAP $\mu\text{M}$	Número de calos (%)	Área recoberta por calos (%)			
		25%	50%	75%	100%
Controle	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,0 + 0,0 $\mu\text{M}$	18,75	33,33	66,67	0,00	0,00
5,0 + 2,5 $\mu\text{M}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10,0 + 0,0 $\mu\text{M}$	18,75	100,00	0,00	0,00	0,00
10,0 + 5,0 $\mu\text{M}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20,0 + 0,00 $\mu\text{M}$	12,50	100,00	0,00	0,00	0,00
20,0 + 10,0 $\mu\text{M}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40,0 + 0,00 $\mu\text{M}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
40,0 + 20,0 $\mu\text{M}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Verifica-se que há necessidade da realização de experimentos com maior tempo, assim como a utilização de outros reguladores vegetais para avaliar novos meios de culturas que obtenham uma maior área recoberta por calos, além de características embriogênicas.

## Conclusão

A utilização de doses entre 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  de picloram induziram a formação de calos em *A. cearensis* com formatos globulares caracterizadas como o primeiro estágio de diferenciação do tecido.

## Agradecimentos

À Embrapa Semiárido pela disponibilização da infraestrutura para realização dos experimentos.

## Referências

- BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p. il.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; LEAL, L. K. A. M.; VIANA, G. S. B. **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A. C. Smith**: alternativa para preservação e exploração econômica da espécie. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 24 p. (Embrapa Semi-Árido. Documentos, 208). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/37829/1/SDC208.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2017.
- CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (*Amburana cearensis* A. C. Smith). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 662-666, 2010.
- DIAS, G. de M. G. **Indução de calos e potencial embriogênico em bastão do imperador**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. 2. ed. Fortaleza: Printcolor Gráfica e Editora, 2012. 413 p.
- MC COWN, B. H.; LLOYD, G. Woody Plant Medium (WPM): a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **HortScience**, Alexandria, v. 16, p. 453-453, 1981.
- PORTO, E. de C. **Xarope de cumaru como terapia complementar na asma persistente leve**. 2009. 181 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza.
- TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados in vitro sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.