

Indução de Calos em *Pueraria phaseoloides* (Roxburgh) Bentham

Joseane de Nazaré Oliveira Cardoso¹, Joanne Moraes de Melo Souza², Oriel Filgueira Lemos³ Deivison Mendes Pinheiro⁴

Introdução

A Alelopatia é um fenômeno que se caracteriza pela interferência direta ou indireta que uma planta exerce no desenvolvimento de outra planta. Esta interferência ocorre, principalmente, pela produção e difusão de substâncias químicas, denominadas de aleloquímicos, no meio ambiente [1,2]

De acordo com Raven *et al.* [3], os efeitos alelopáticos inibitórios (herbicidas) envolvem uma complexa cadeia de comunicação química entre as espécies vegetais que são mediadas através de substâncias químicas como alcalóides, terpenóides e fenóis provenientes principalmente do metabolismo secundário vegetal.

A presença destes compostos aleloquímicos é reconhecida como um importante mecanismo ecológico que pode provocar influências significativas no manejo agrícola ou florestal [4]. Atualmente, muitos destes compostos biologicamente ativos obtidos das plantas estão sendo usados no controle de ervas daninhas e pragas, podendo constituir-se em uma alternativa importante ao uso dos defensivos agrícolas, com menores riscos ao meio ambiente, mantendo um melhor equilíbrio do ecossistema [5].

Recentemente, estudos realizados com extratos de puerária encontraram uma substância natural da classe dos isoflavonóides com atividade herbicida Guilhon *et al.* [6].

A puerária (*Pueraria phaseoloides*) é uma planta forrageira da família Leguminosae que vem ocupando uma posição de destaque na pecuária da região amazônica devido, em especial, às suas características agrônomicas desejáveis, como: adaptação aos solos ácidos e de baixa fertilidade e a sua agressividade, que lhe confere capacidade competitiva em relação às plantas invasoras [6].

Neste sentido, a biotecnologia, através da técnica de cultivo de tecidos e células *in vitro* se constitui em uma importante alternativa para a produção e o acúmulo de substâncias do metabolismo secundário de plantas, em concentrações maiores do que as técnicas comuns. [7]

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia eficiente para a indução

de calos de puerária visando a sua utilização no cultivo de células *in vitro* para acúmulo e produção de metabólitos secundários com atividade bioerbicida.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da Embrapa Amazônia Oriental (Embrapa-CPATU), localizado em Belém -PA.

Foram utilizados como explantes os hipocótilos de plântulas assépticas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes de plantas adultas de puerária.

Para a indução de calogênese, os hipocótilos foram inoculados em meio MS [8] suplementado com 30g.L⁻¹ de sacarose, e acrescidos de 2,4-D (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) e BAP (0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹). Os meios de cultura foram solidificados com 7g.L⁻¹ de agar, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C durante 20 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, na ausência de luz, à temperatura de 26 ± 2°C, com 70% de umidade.

Foram realizados quatro tratamentos com dez repetições dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Aos 30 dias as culturas foram avaliadas quanto ao número de explantes com respostas morfogênicas e quanto à formação de calos, através de notas dadas para a formação destes nos explantes: 0 = ausência de calos; 1 = início de formação de calo; 2 = calo pequeno; 3 = calo médio e 4 = calo grande.

Resultados e Discussão

A indução de calos começou a ocorrer na segunda semana de cultivo após a inoculação em todos os meios utilizados. As maiores respostas morfogênicas foram observadas nos tratamentos acrescidos dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP (Tabela 1).

Pode-se observar que o tratamento T1, mesmo sem regulador de crescimento apresentou formação de calos. E que o uso de reguladores só potencializou a formação e o crescimento dos mesmos. Segundo Caldas *et al.* [9], alguns tecidos mostram uma dependência da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

1. Graduanda do 8º semestre de Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530. E-mail: josi.card@ig.com.br

2. Eng. Agrônomo, M.Sc., Colaboradora da EMBRAPA Amazônia Oriental – Caixa Postal 48, 66.095-100, Belém- PA.

3. Orientador, Eng. Agrônomo, Dr., Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Oriental – Caixa Postal 48, 66.095-100, Belém- PA. E-mail: oriel@cpatu.embrapa.br

4. Graduando do 4º semestre de Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530.

Apoio financeiro: FUNTEC e EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL.

As respostas mais uniformes ocorreram no melhor tratamento avaliado que foi o T3 (1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L⁻¹ BAP), pois apresentou porcentagens mais uniformes e mais expressivas para calos friáveis de tamanho pequeno e médio, respectivamente notas 2 e 3. As maiores porcentagens para a nota 2 (calo pequeno) foram observadas nos tratamentos T2 (0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D) e T3. No tratamento T4, com maior concentração de BAP (0,5 mg.L⁻¹) e 2,4-D (2,0 mg.L⁻¹), houve uma redução de calos pequenos (nota 2), embora o mesmo apresentasse a melhor porcentagem para calos médios (nota 3) e o único tratamento que apresentou calos grandes (nota 4) (Figura 1). Os dados indicam que a maior uniforme de resposta ocorreu em T4, com 70% de calos do tipo médio, e 100% dos explantes apresentaram indução de calos.

A indução de calos em puerária apresenta semelhança às respostas observadas por Ledo *et al.* [10] observaram que em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.), pois a iniciação e o crescimento de calos foram mais lentos em meio de cultura com menor concentração de 2,4-D (2,26µM). As citocininas e auxinas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A auxina 2,4-D frequentemente induz a formação de calo e pode ser importante em sistemas de embriogênese somática Caldas *et al* [9] enquanto BAP tem um papel importante na formação dos embriões somáticos.

Referências

[1] RICE, E.L. 1984. Allelopathy. 2. ed. London: Academic Press,.

- [2] MEDEIROS, A. R. M. 1990. Alelopatia. Horti Sul, v.1, n.3, p-27-32.
- [3] RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. 2001. Biologia Vegetal. A.P. P. COSTA et al. Rio de Janeiro: Guanabara, 905p.
- [4] FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12, p.175-204.
- [5] CHOU, C. H.; FU, C. Y.; LI, S. Y.; WANG, Y. F. 1998. Allelopathic potential of *Acacia confusa* and related species in Taiwan. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n.12, p.2131-2150.
- [6] GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, S. P.; ARAUJO, M. Q.; LOBO, L. T.; SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M.; SANTOS, L. S.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. 2005. Potential allelochemicals isolated from *Pueraria phaseoloides*. **Allelopathy Journal**, v. 15, n. 2, p. 211-220.
- [7] TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. 1998. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA- SPI/ EMBRAPA- CNPH,. 509p.
- [8] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497.
- [9] CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. 1998. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA- SPI/ EMBRAPA- CNPH,. v.1, p.87-132.
- [10] LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. 2002. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura in vitro. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal*, p. 604-607.

TABELA 1. Respostas morfogenéticas de cultura de calos friáveis a partir de hipocótilo de *Pueraria phaseoloides* cultivados em diferentes tratamentos, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.

Tratamentos	Porcentagem de explantes com calo friável
T1 (MS sem regulador)	50%
T2 (MS+ 0,5 mg.L ⁻¹ 2,4-D)	90,1%
T3 (MS+ 1,0 mg.L ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg.L ⁻¹ BAP)	91,6%
T4 (MS + 0,5 mg.L ⁻¹ 2,4-D 2,0 mg.L ⁻¹)	100%

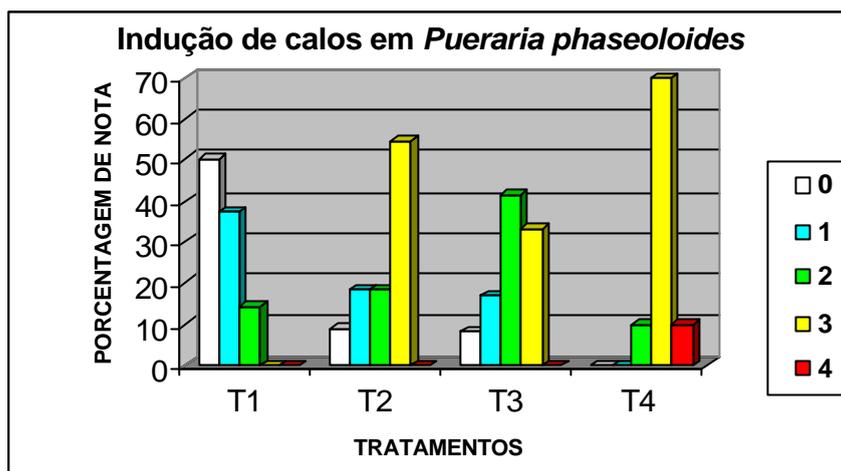


Figura 1. Porcentagem de notas dadas para a formação de calos em explantes de *Pueraria phaseoloides*. em diferentes tratamentos. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.