

CULTURA DE CALOS EM TIMBÓ-VERMELHO (*Derris urucu*)

Heraclito Eugenio Oliveira da Conceição¹, José Eduardo Brasil Pereira Pinto², Marli Costa Poltronieri¹ e Áurea Adriana da Silva Gonçalves³

¹ Eng. Agr. Pesquisador, Caixa Postal 48, CEP 66.095-100, Embrapa Amazônia Oriental, Belém - Pará - Brasil.

² Eng. Agr., Prof. Titular, Caixa Postal 37, CEP 37.200-000, Universidade Federal de Lavras, Lavras - Minas Gerais - Brasil.

³ Eng. Agr. Tv. Alferes Costa, 1611, CEP 66.080-130, Belém - Pará - Brasil.

Várias espécies, desde algas até plantas vasculares, podem ser induzidas a formar calos em cultura. Em muitos casos, este material de calo pode ser induzido a diferenciar plantas inteiras, através da inclusão de reguladores de crescimento apropriados nos meios de cultura e do ambiente de cultura.

Para a indução e formação de calos, praticamente qualquer parte da planta pode ser utilizada como explante, entretanto, tecidos e órgãos contendo células não diferenciadas, como as que ocorrem em ápices caulinares, gemas axilares e regiões meristemáticas, são mais adequados.

Com a descoberta das funções independentes da auxina e citocinina, na indução de raízes e de brotos em cultura de calos, e de um processo denominado organogênese, Skoog e Miller (Symposium of Society for Experimental Biology v.11, p.118-131, 1957) estabeleceram que um dos mecanismos básicos que o regulam, parece envolver entre outras coisas, um balanço entre níveis relativos desses dois grupos de compostos reguladores de crescimento, presentes no meio.

A literatura disponível é extremamente escassa de trabalhos sobre cultura de calos em timbó-vermelho (*Derris urucu*). Desta forma, considerou-se importante, neste trabalho, determinar um protocolo para a cultura de calos dessa espécie, visando a sua utilização como material para sistemas de propagação *in vitro* e de produção de metabólitos secundários.

Dois experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em LavrasMG, no período de fevereiro a junho de 1999.

Indução e formação de calos. Explantes radiciais com cerca de 1 cm de comprimento, oriundos de plântulas de *D. urucu* de exemplares do clone 37, foram inoculados em tubo de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL do meio nutritivo MS (Murashige, T. e Skoog, F. *Physiologia Plantarum* v.15, p.473-497. 1962) e mantidos em sala de crescimento durante 30 dias. Os tratamentos usados foram os seguintes: R₁ = 0,4 mg.l⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético); R₂ = 0,8 mg.l⁻¹ de 2,4-D; R₃ = 3,2 mg.l⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético); R₄ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina); R₅ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₆ = 1,6 mg.l⁻¹ de PIC (picloram) + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₇ = 3,2 mg.l⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP; R₈ = 1,6 mg.l⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP e R₉ = 0,8 mg.l⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP.

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: presença de calo (PC), cor do calo (CC), tamanho do calo (TC), dureza do calo (DC) e matérias fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e cinco repetições, sendo cada uma dessas constituídas por dois tubos de ensaio.

Manutenção de calos. Foram usados fragmentos de calos de cerca de 1 cm², oriundos de 2 tratamentos de indução e formação de calos em explantes radiciais (R₄ = 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP e R₉ = 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP). Os explantes (calos) foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo de manutenção,

sacarose 3%, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e mantidos em sala de crescimento a $26,0 \pm 1,0$ °C, umidade relativa do ar $70 \pm 5\%$, fotoperíodo de 16 h e irradiância de $25 \mu \text{ mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, durante 28 dias. Foram usados os seguintes tratamentos de manutenção de calos: M_1 = MS sem regulador de crescimento; M_2 = MS + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP; M_3 = MS + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA e M_4 = MS + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de respostas: matéria fresca e seca do calo (MFCALO e MSCALO, respectivamente). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições, cada uma constituída por quatro frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio nutritivo de manutenção. Neste trabalho, os calos oriundos de cada tratamento de indução (R_4 e R_9) foram considerados como experimentos isolados.

Pode-se verificar que $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA + $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP (R_4) e $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB + $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP (R_9), apresentaram um ganho de matéria fresca e seca superior aos demais tratamentos (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os obtidos para várias espécies, nas quais tem sido observado que os melhores resultados de indução e formação de calos oriundos de diferentes tipos de explantes são obtidos em meio nutritivo suplementado com auxina e citocinina (Li *et al.* Acta Botanica Yunnanica v.17, n.3, p.325-330. 1995; Rady, M.R. e Nazif, N.M. Fitoterapia v.68, n.4, p.349-354, 1997; Alloufa *et al.* In: Vitro Cellular & Developmental Biology v.35, n.3, p.54-A. 1999). Entretanto, a combinação ou a interação dos reguladores de crescimento na indução e/ou formação de calos, vai depender principalmente do genótipo.

Os resultados sistematizados de variáveis qualitativas observadas em calos de *D. urucu* oriundos de segmento radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 30 dias de cultivo são apresentados na Tabela 2. De um modo geral, a cor dos calos (CC), o tamanho dos calos (TC) e a dureza dos calos (DC) apresentaram respostas diferenciadas. A cor dos calos formados variou entre amarelo, verde e marrom, com tamanho predominantemente grande e consistência friável.

As auxinas, citocininas e a interação auxina/citocinina são, normalmente considerados os reguladores de crescimento mais importantes para a regulação do crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Desta forma, os níveis de auxinas e citocininas em culturas *in vitro* são balanceados e controlados. Entretanto, as respostas de células, tecidos e órgãos cultivados *in vitro* podem variar de acordo com condições da cultura, do tipo de explante e do genótipo (Gaspar *et al.* In: Vitro Cell Development Biology Plant v.32, p.272-289. 1996).

Tabela 1. Valores médios das matérias fresca e seca de calos de *Derris urucu* oriundos de explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Variáveis de resposta	
	MFCALO (g)	MSCALO (g)
R_1 ($0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D)	0,6824 bc	0,0402 bc
R_2 ($0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D)	0,8454 b	0,0508 b
R_3 ($3,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA)	0,3810 c	0,0240 c

R ₄ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	1,6513 a	0,0795 a
R ₅ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,5431 bc	0,0280 c
R ₆ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,6300 bc	0,0420 bc
R ₇ (3,2 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,6308 bc	0,0439 bc
R ₈ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	0,3313 c	0,0238 c
R ₉ (0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	1,6924 a	0,0876 a

1

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Respostas de variáveis qualitativas observadas em calos de *Derris urucu* induzidos em explante radicial de plântulas germinadas *in vitro*.

Tratamento	Variáveis de resposta		
	CC	TC	DC
R ₁ (0,4 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	A	G	F
R ₂ (0,8 mg.l ⁻¹ de 2,4-D)	A	G	F
R ₃ (3,2 mg.l ⁻¹ de ANA)	A	M	F
R ₄ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₅ (1,6 mg.l ⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₆ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	M	G	F
R ₇ (3,2 mg.l ⁻¹ de PIC + 1,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₈ (1,6 mg.l ⁻¹ de PIC + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	V	G	F
R ₉ (0,8 mg.l ⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l ⁻¹ de BAP)	A	G	F

Legenda: Cor do calo (CC) (A = amarelo, M = marrom e V = verde); tamanho do calo (TC) (M = 0,5 a 1,0 cm e G = > 1,0 cm) e dureza do calo (DC) (F = frível e D = duro).

Após a indução e a formação dos calos no explante primário, é necessária a manutenção do

crescimento e desenvolvimento do tecido. Em geral, utiliza-se o mesmo meio de indução para manter a calogênese. Pode-se verificar que as matérias fresca e seca de calos de todos os tratamentos de manutenção apresentaram efeitos significativos. A melhor resposta dos tratamentos de manutenção foi proporcionada pelo tratamento formulado em MS, suplementado com 2,0 + 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + BAP (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios para pesos das matérias fresca e seca (em g) de calos de *Derris urucu* oriundos de dois meios de indução em segmentos radiciais de plântulas germinadas *in vitro*, após 28 dias de cultivo nos meios de manutenção.

Tratamentos (mg.l ⁻¹)	Variáveis de resposta, em g			
	R ₄		R ₉	
	MFCALO	MSCALO	MFCALO	MSCALO
0,0	0,4132 b	0,0258 b	0,9650 b	0,0547 b
2,0 BAP	2,2403 a	0,0968 a	1,0273 b	0,0537 b
2,0 ANA	1,6445 a	0,0696 a	1,6905 b	0,0686 b
2,0 BAP + 2,0 ANA	2,2786 a	0,1030 a	4,0608 a	0,1218 a

1

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si ao nível de 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey.

A indução e formação de calos em timbó-vermelho podem ser obtidas utilizando-se segmento radicial de 1 cm de comprimento oriundo de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*, em meio nutritivo MS, suplementado com 1,6 mg.l⁻¹ de ANA + 1,0 mg.l⁻¹ de BAP ou 0,8 mg.l⁻¹ de AIB + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, durante 30 dias.

A manutenção de calos induzidos e formados em segmento radicial de *D. urucu* oriundos de plântulas germinadas *in vitro*, deve ser realizada em meio nutritivo MS, suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de ANA + 2,0 mg.l⁻¹ de BAP, durante 28 dias .

