

EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DOS SAIS DE N E DE P DO MEIO 'MS' DURANTE A FASE DE MANUTENÇÃO DE CALOS DE TIMBO-VERMELHO

Heraclito Eugenio Oliveira da Conceição¹, Antônia do Socorro Aleixo Barbosa²;
Albene Liz Carvalho Monteiro³, Marcelo Vinhote Aguiar³, Aparecida do Socorro Dias
Silva³, Rissandréia Dantas de Vasconcelos³

Palavras-chave - amônio; nitrato; rotenóides; *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride

INTRODUÇÃO

Os inseticidas de origem vegetal são pouco utilizados atualmente, devido ao aparecimento dos defensivos sintéticos. Cita-se a nicotina, que praticamente não é mais usada e, a rotenona, que entre os rotenóides, é a principal substância contida nas raízes do timbó. Essa substância é um veneno violentíssimo para insetos e animais de sangue frio.

O meio nutritivo mais utilizado em cultura de tecidos é o 'MS' de Murashige e Skoog (1962), embora a concentração de nutrientes deste meio nutritivo deva ser melhor estudado devido a diferentes respostas obtidas por diversas espécies (Pierik, 1987; Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). Tecidos originados das várias partes de uma planta podem possuir diferentes requerimentos para se desenvolver *in vitro* (Murashige e Skoog, 1962). O nitrogênio (N) e o fósforo (P) estão entre os macronutrientes que são requeridos em grandes quantidades, comparativamente, e por isso são chamados de macronutrientes. Para George e Sherrigton (1984), embora algumas plantas respondem satisfatoriamente à adição de apenas nitrato (NO_3^-) ao meio nutritivo e a maioria delas necessita de nitrogênio nítrico e amoniacal (NH_4^+), sendo necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ para o ótimo crescimento e desenvolvimento *in vitro*. O P é absorvido pelas plantas na forma de ion H_2PO_4^- e é nesta forma que é acrescentado nos meios nutritivos (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). No meio 'MS', o fosfato de potássio monobásico é usado na concentração de 1,25 mM. Este nível é considerado baixo para algumas culturas, sendo recomendado a suplementação com um nível igual de fosfato de sódio monobásico (Murashige, 1974).

Furmanowa e colaboradores (1997) relatam os efeitos de condições de cultura e componentes do meio, sobre a taxa de crescimento de calos e a produção de 'taxanes' em calos de *Taxus media* cv. Hatfieldii. Para indução e manutenção de calos, um meio nutritivo 'B5' e um meio nutritivo de White-Rangaswamy ('WR') com diferentes modificações foram usados com sucesso.

¹ Eng. Agr. Pesquisador, Caixa Postal 48, CEP 66095-100, Embrapa Amazônia Oriental, Belém - PA

² Eng. Agr. Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Tancredo Neves, 2501, Belém - PA

³ Estudantes de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Tancredo Neves, S/N, Belém - PA

Estudos sobre componentes de meio de cultura e a biossíntese de compostos secundários em calos de timbó são raros. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar os efeitos de concentrações dos sais de N e de P do meio 'MS' na fase de manutenção de calos, oriundos de segmentos de folha e raiz de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os calos foram induzidos usando-se segmentos de folha e de raiz de plântulas de *D. urucu* germinadas *in vitro*. Segmentos de folha medindo 1 cm² foram inoculados em meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg/L de 2,4-D e segmentos de raiz 1 cm de comprimento inoculados em meio nutritivo 'MS', suplementado com 1,6 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo 15 mL do meio nutritivo 'MS', sacarose 3%, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para 5,7±0,1 e mantidos em sala de crescimento a 26,0±1,0 °C, umidade relativa do ar a 70±5%, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 25 μmol.m⁻².s⁻¹, durante 28 dias. Após este período, procedeu-se a etapa de manutenção dos calos, na qual, três fragmentos de calos com cerca de 1 cm de diâmetro oriundos dos tratamentos de indução foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL, contendo 30 mL do meio nutritivo 'MS' (Quadro 1), suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, sacarose 3%, solidificado com 0,7% de agar, pH ajustado para 5,7±0,1 e mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições citadas anteriormente, durante 28 dias e, em seguida, subcultivados por mais 28 dias. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados pelas seguintes variáveis de resposta: matéria fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente) e teor de compostos rotenóides (% Rot) aos 28 e 56 dias de cultivo da fase de manutenção de calos.

Quadro 1 – Tratamentos usados na fase de manutenção de calos oriundos de segmentos de folha e de raiz de *Derris urucu*.

Tratamento	N e P (concentração relativa do meio nutritivo de 'MS')		
	N-NH ₄ ⁺	N-NO ₃	P-KH ₂ PO ₄
1	½	0	½
2	0	½	½
3	½	½	½
4	1	1	½
5	2	2	½
6	½	0	1
7	0	½	1
8	½	½	1
9	1	1	1
10	2	2	1

A quantificação de compostos rotenóides foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), usando-se extratos metanólicos oriundos de amostras duplicadas de 10 mg de calos secos e triturados por amostra por tratamento. A quantificação foi realizada em um cromatógrafo Marca SHIMADZU, Modelo LC – 9A, equipado com coluna PEGASIL ODS. Durante a operação, a fase móvel usou metanol/água (70/30), vazão de 1 mL/min, injeção de 20 µL da amostra e detecção após 20 minutos, em detector SHIMADZU, Modelo SPD – 6AV SPECTROMETRIC UV – VIS à 280 nm. Os explantes (calos) oriundos de cada tratamento de indução foram considerados na etapa de manutenção de calos como um experimento isolado. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 10 x 2 (10 variações de N e P e 2 subculturas), com três repetições. Os dados obtidos na etapa de manutenção de calos foram submetidos à análise de variância e de acordo com os resultados das análises os dados foram novamente processados e, as médias comparadas através do teste de Tukey a 0.05 de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de variâncias dos dados detectaram efeitos significativos diferenciados para fatores e suas interações, indicando que os meios de cultura (MC), as épocas de avaliação (EA) e sua interação tiveram influências determinantes nestas variáveis de respostas. Pela Tabela 1, observam-se os valores das médias dos pesos das MFCALO e MSCALO de *D. urucu* oriundos de segmentos de folha, aos 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, em dez meios nutritivos de manutenção. Pode-se notar que, aos 28 dias de cultivo nos meios de manutenção, o melhor resultado da MFCALO foi obtida pelo tratamento 9, porém este não diferiu estatisticamente dos tratamentos 3, 4, 5, 6, 8 e 10. Aos 56 dias, os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 4, 5, 9 e 10. Para os valores das médias da MSCALO, aos 28 dias de cultivo *in vitro* nos meios de manutenção não se verificou efeitos significativos, enquanto que aos 56 dias, os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 9 e 10, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 4, 5, 6 e 8. O crescimento de calos, em termos de MFCALO, oriundos de segmentos de folha foi reduzido pelas reduções nas concentrações e formas de N e da concentração de P dos sais do meio nutritivo 'MS'. Na presença da $\frac{1}{2}$ de $N-NH_4^+$ ou $\frac{1}{2}$ de $N-NO_3^-$, em combinação com a metade da fonte de P dos sais do meio nutritivo 'MS', ocorreu uma redução significativa de crescimento de calos medidos em termos de MFCALO. Resultados semelhantes são relatados em Grattapaglia e Machado (1998).

Tabela 1 – Médias para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg/L de 2,4-D em segmentos de folha de plântulas de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em dez meios de manutenção de calos.

Tratamento ² (N-NH ₄ ⁺ +N-NO ₃ ⁻ +P-KH ₂ PO ₄)	Variáveis de respostas			
	MFCALO (g)		MSCALO (g)	
	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias
1 (1/2+0+1/2)	2,9359bc	3,5921cd	0,1751a	0,2634c
2 (0+1/2+1/2)	2,6000bc	1,4526d	0,1638a	0,1243d
3 (1/2+1/2+1/2)	3,3352abc	9,5986b	0,1730a	0,4511b
4 (1+1+1/2)	4,9093ab	14,7608a	0,1843a	0,5254ab
5 (2+2+1/2)	5,5690ab	15,8646a	0,2300a	0,5820ab
6 (1/2+0+1)	3,8952abc	6,3663c	0,2021a	0,4699ab
7 (0+1/2+1)	1,5548c	1,9135d	0,1359a	0,1689cd
8 (1/2+1/2+1)	5,1887ab	11,3367b	0,2273a	0,4858ab
9 (1+1+1)	6,3916a	15,5399a	0,2523a	0,5964a
10 (2+2+1)	4,5496abc	14,5282a	0,2043a	0,5853a

Letras distintas na vertical indicam diferenças estatísticas significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Referentes às concentrações dos sais de N e P do meio nutritivo 'MS'.

As análises química de compostos rotenóides determinadas por CLAE em calos de *D. urucu* oriundos de segmentos de folha, durante 28 e 56 dias nos meios de manutenção não detectaram a presença destes compostos. Compostos secundários produzidos pela planta mãe, na maioria dos casos, não são encontrados em calos. Apenas a regeneração da raiz, dos brotos foliares e da própria planta restauram a produção destes compostos (Kawaguchi *et al.*, 1993).

Na Tabela 2 observam-se os valores das médias dos pesos da MFCALO de timbó oriundos de segmentos de raiz, aos 28 e 56 dias de cultivo *in vitro*, em dez meios nutritivos de manutenção. Após 28 dias de cultivo nos meios de manutenção, verificou-se que, os melhores resultados MFCALO foram obtidas pelos tratamentos 4 e 9, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 1, 3, 5, 8 e 10. Aos 56 dias de cultivo, o melhor resultado foi proporcionado pelo tratamento 4. Para os valores das médias da MSCALO aos 28 dias verificou-se que os melhores resultados foram proporcionados pelos tratamentos 3, 4 e 9, porém estes não diferiram estatisticamente dos tratamentos 1, 5, 8 e 10. Aos 56 dias, o melhor resultado foi obtido pelo tratamento 4, porém este não diferiu estatisticamente dos tratamentos 3. Em geral, os efeitos das reduções nas concentrações e formas dos sais de N do meio nutritivo 'MS' para calos oriundos de segmentos de raiz de *D. urucu* seguiu a mesma tendência dos obtidos para segmentos de folha, contudo, detectou-se aqui uma maior exigência na nutrição níttrica do que da amoniacal no crescimento de calos. I medidos em termos de MFCALO e MSCALO, além do que houve uma atenuação da deficiência de N na presença da metade da concentração de P no meio de manutenção de calos.

Tabela 2 – Médias para matérias fresca e seca de calos (MFCALO e MSCALO, respectivamente), induzidos com 1,6 mg/L de ANA + 1,0 mg/L de BAP em segmentos de raiz de *Derris urucu*, mantidos durante 28 e 56 dias, em dez diferentes meios de manutenção de calos.

Tratamento ² (N-NH ₄ ⁺ +N-NO ₃ +P-KH ₂ PO ₄)	Variáveis de respostas			
	MFCALO (g)		MSCALO (g)	
	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias
1 (1/2+0+1/2)	1,3414ab	1,4941de	0,0992ab	0,1492c
2 (0+1/2+1/2)	0,2382b	0,2118e	0,0272b	0,0238d
3 (1/2+1/2+1/2)	2,3279ab	7,7974b	0,1452a	0,4306ab
4 (1+1+1/2)	3,6347a	13,7185a	0,1681a	0,5306a
5 (2+2+1/2)	1,3698ab	3,7167cd	0,1007ab	0,1570c
6 (1/2+0+1)	0,2707b	2,7152d	0,0199b	0,1570c
7 (0+1/2+1)	0,3344b	0,3533e	0,0394b	0,8387d
8 (1/2+1/2+1)	1,4624ab	5,1842c	0,1225ab	0,4214b
9 (1+1+1)	3,1303a	9,5539b	0,1498a	0,4044b
10 (2+2+1)	1,3549ab	9,2527b	0,0756ab	0,4206b

¹ Letras distintas na vertical indicam diferenças significativas ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

² Referentes às concentrações dos sais de N e P do meio nutritivo 'MS'.

As análises química de compostos rotenóides determinados por CLAE em calos de *D. urucu* oriundos de segmentos de raiz de plântulas germinadas *in vitro*, evidenciaram a presença destas substâncias neste tipo de material. Estes compostos foram detectados nos tratamentos 5, 6 e 8, após 28 e 56 de cultivo *in vitro* nos meios nutritivos de manutenção com teores de oscilaram entre 0,015 e 0,060%. A presença de compostos rotenóides tem sido relatada para culturas de calos e de suspensão de células em *D. elliptica* e *Tephrosia vogelli*. (Kudakesseril e Staba, 1988).

CONCLUSÕES

A redução e/ou a ausência de ambas as formas de N, resultou em reduções marcantes de crescimento de calos de *D. urucu*, independente ou não da redução da concentração de P do meio nutritivo 'MS'.

Calos oriundos de segmentos de raiz são mais exigentes tanto da forma quanto da concentração de sais de N do meio básico de 'MS'.

A produção de matérias fresca e seca de calos oriundos de segmentos de raiz é menor do que em segmentos de folha.

Calos oriundos de segmentos de raiz apresentaram resposta positiva de biossíntese de compostos rotenóides, após 28 e 56 dias de cultivo *in vitro* nos meios nutritivos de manutenção, com teores que oscilaram entre 0,015 e 0,060%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P. e FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p.87-132.
- FURMANOWA, M., GLOWNIAK, K., SYKLOWSKA, B.K., ZGORKA, G. e JOZEFczyk, A. Effect of picloram and methyl jasmonate on growth and taxane accumulation in callus culture of *Taxus X media* var. *Hatfieldii*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.49, n.1, p.75-79, 1997.
- GEORGE, E.F. e SHERRINGTON, P.D. **Tissue culture media: plant propagation by tissue culture**. Eastern Press, 1984. 709p.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1, p.183-260.
- KAWAGUCHI, K., ASAKA, I., HIROTANI, M., FURUYA, T. KATSUKI, S. Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.5, p.1317-1321, 1993.
- KUDAKASSERIL, G.J. e STABA, E.J. Insecticidal phytochemicals. In: CONSTABEL, F. e VASIL, I.K. (eds.), **Cell culture and somatic cell genetics of plants: phytochemicals in plant cell cultures**. San Diego: Academic Press, 1988. v.5, Cap.31, p.537-552.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.