

# Calogênese em Embriões Zigóticos de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby

Iulla Naiff Rabelo de Souza Reis<sup>1</sup>, Joseane de Nazaré Oliveira Cardoso<sup>2</sup>, Osmar Alves Lameira<sup>3</sup>,  
Iracema Maria Castro Coimbra Cordeiro<sup>4</sup>, Patrícia Surama Parise Maia<sup>5</sup>

## Introdução

A importância econômica do *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke), conhecido vulgarmente como paricá, reside no fato de fornecer matéria-prima para a obtenção de celulose, obtendo-se um papel branqueado de excelente qualidade e resistência. Devido também ao seu rápido desenvolvimento em altura e diâmetro, o paricá foi incluído na seleção de espécies de leguminosas para os consórcios agroflorestais na Amazônia, pois reúne ótimas qualidades silviculturais [1].

Calos são definidos como tecidos constituídos por células dediferenciadas, que se desenvolvem como resposta a uma lesão química ou física sob determinadas condições hormonais [2]. Os calos podem ser obtidos a partir de um fragmento de tecido de determinada planta e possuem a capacidade de se diferenciar em tecidos, órgãos e até embriões, podendo regenerar plantas inteiras [3, 4, 5].

Para a indução de calos, pode-se utilizar a injúria física dos tecidos do explante ou, mais comumente, a suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento. Estes agentes agem sobre a expressão gênica, fazendo com que, a partir de células de tecidos organizados, se forme uma massa desorganizada de células, cujo crescimento é geralmente rápido e bastante irregular. A produção de calos depende de um balanço adequado de reguladores de crescimento (geralmente auxinas e citocininas) no meio de cultura, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o 6-benzilaminopurina (BAP), respectivamente a auxina e a citocinina mais utilizada para esta finalidade [6,7].

O objetivo do trabalho foi induzir calos a partir em embriões zigóticos de paricá a partir do 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), combinados ou não de 6-benzilaminopurina (BAP).

## Material e métodos

Os tratamentos testados foram constituídos de diferentes concentrações de 2,4-D (0, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>)

combinadas ou não com BAP (1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>). O meio de cultura básico MS [8] teve as concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e Fe-EDTA reduzidas a metade (demais componentes em suas concentrações normais), sacarose (3%), ágar (0,6%), e suplementado com o antioxidante ácido cítrico (0,1%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, utilizando-se NaOH (hidróxido de sódio) e/ou HCl (ácido clorídrico) em solução de 0,5 N. Os meios de cultura foram distribuídos na quantidade de 40 ml por frasco e autoclavados a 120°C e 1,2 atm durante 20 minutos. Os embriões foram inoculados horizontalmente nos frascos, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, com auxílio de placas de Petri e pinças esterilizadas em autoclave durante 40 minutos, e mantidos no escuro durante 10 dias em sala de crescimento na temperatura de 24 ± 1°C, e posteriormente transferidos para um fotoperíodo de 16h luz branca fria e irradiância de 25 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, sob a mesma temperatura anterior.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 6 repetições, sendo cada parcela constituída de um frasco contendo 3 embriões. A avaliação do experimento foi realizada aos 30 dias de cultivo, onde se observou o percentual de explantes com calos; área dos explantes cobertas por calos, levando em consideração as seguintes notas: 1, 2, 3 e 4 para os explantes que apresentavam, respectivamente, 25, 50, 75 e 100% da área coberta com calos; a textura – coesão entre as células que formam os calos – foi avaliada em friável (células frouxamente ligadas) e compacta (células firmemente ligadas); coloração e oxidação.

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar. Para a análise estatística, os dados de percentual de explantes com calos e oxidação foram transformados para arcsen (X/100)<sup>1/2</sup>.

1. Mestre em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530. Bolsista CAPES. E-mail: [naiff\\_agro@yahoo.com.br](mailto:naiff_agro@yahoo.com.br).

2. Graduada do 8º semestre de Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530.

3. Orientador/Pesquisador, Dr. da Embrapa Amazônia Oriental. Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/nº, Caixa Postal 48, Belém-PA, CEP 66095-100.

4. Doutoranda em Sistemas Agroflorestais. Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Belém-PA, CEP 66077-530.

5. Mestrando em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém-PA, CEP 66077-530.

Apoio financeiro: CAPES

## Resultados e Discussão

Na Figura 1 são apresentadas as médias de percentual de formação e área coberta por calos. Não houve calogênese nos embriões cultivados em meio de cultura na ausência de regulador de crescimento, evidenciando que a concentração endógena de fitormônios dos embriões de paricá não foi suficiente para induzir calos. Essa necessidade exógena de reguladores de crescimento para a indução de calos foi relatada por Vietez & San-José [9] em *Fagus sylvatica*.

Os tratamentos que continham somente 2,4-D (2 e 3 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D) não diferiram significativamente dos tratamentos em que o 2,4-D (2 mg.L<sup>-1</sup>) foi combinado com 1 ou 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, tanto para o percentual de embriões que formaram calos, quanto para a área coberta por estes (Figura 1). Este fato reafirma o que foi relatado por Ozias-Akins & Vasil [10] que citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com o suprimento de auxinas.

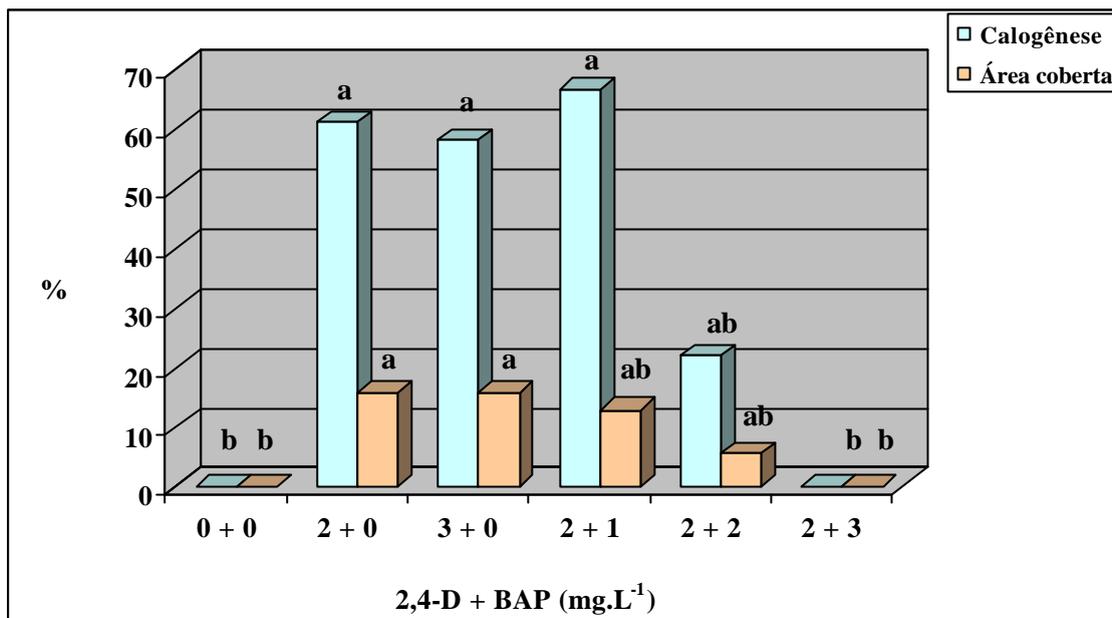
Observou-se que à medida que a concentração de BAP foi aumentada, houve inibição da calogênese, bem como da área coberta por calos, sugerindo que os embriões de paricá contêm concentrações endógenas de citocinina suficientes para interagir com a auxina exógena, e que portanto, o fornecimento de concentrações mais elevadas de BAP inibe a formação de calos (Figura 1).

Resultados similares foram observados por Silva [11], que verificou a formação de 70% de calos em embrião + endosperma de andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl), na presença de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D. Chalupa [12] testou o 2,4-D nas concentrações de 0,3 a 3 mg.L<sup>-1</sup>, combinado ou não com BAP (0,5 a 1,8 mg.L<sup>-1</sup>) para induzir calos em embriões zigóticos imaturos de *Tilia cordata*, e constatou que o meio MS suplementado com 2,4-D nas concentrações de 0,5 a 1,5 mg.L<sup>-1</sup> foi mais favorável para iniciação de culturas embriogênicas. Ficou também constatado que embriões cultivados em meio MS contendo 2,4-D e BAP produziram mais calos não embriogênicos, e que portanto, o 2,4-D isolado foi essencial para a produção de calos e posterior indução de embriogênese em plantas de *Tilia*. Eixos embrionários de cupuaçuzeiros (*Theobroma grandiflorum* Schum.) submetidos a concentrações de 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, formaram calos de aspecto branco e brilhante, enquanto que nas concentrações de 4 e 8 mg.L<sup>-1</sup> desse regulador de crescimento, foram observados calos brancos e opacos [13].

Conforme mostra a Figura 1, ficou evidenciado que houve calogênese em embriões, no entanto, a área do explante coberta por calos foi relativamente baixa. Nos tratamentos contendo somente 2,4-D, os calos formados apresentaram-se friáveis superficialmente, com textura compacta mais internamente; e quando o BAP foi adicionado ao meio de cultura, todos os calos apresentaram textura compacta. A coloração predominante foi a bege-amarelada e não houve oxidação até os 30 dias de cultivo (Figura 2).

## Referências

- [1] CARVALHO, J.G. de C.; VIÉGAS, I. de J.M. 2004 [Online]. Caracterização de Sintomas de Deficiências de Nutrientes em Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke). Belém: Embrapa Circular Técnica, 37. Homepage: </http://www.cpatu.embrapa.br/online/circular/Circ.tec.37.pdf./>
- [2] MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. 1994. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética. 344p.
- [3] PAIVA, R.; PAIVA, P.D. O. 2001. Textos acadêmicos: cultura de tecidos. Lavras: FAEPE/UFLA. 97p.
- [4] PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Martins Nijoff. 326p.
- [5] TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. 1990. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA. 433p.
- [6] COCKING, E.C. The tissue culture revolution. 1986. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. (eds.) Plant tissue culture and its agricultural applications. London: Butterworths. p.3-21.
- [7] SANTOS, M.R.A. dos. 1998. Germinação, calogênese e caracterização de saponinas em *Smilax japecanga* Grisebach. Dissertação de Mestrado, Curso e Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, UFLA, Lavras, 81p.
- [8] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 15, p. 473-497.
- [9] VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M.C. 1996. Adventitious shoots regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In vitro* & Developmental Biology. Columbia, v.32, n.3, p.140-147.
- [10] OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. 1985. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation. Florida: Academic, v.2, p.128-147.
- [11] SILVA, A.T.de A. 2000. Propagação e indução de calos *in vitro* de andirobeira (*Carapa guianensis* Aubl). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-graduação em Agronomia, FCAP, Belém, 49p.
- [12] CHALUPA, V. 1999. Somatic embryogenesis in Linden (*Tilia* spp.). In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. (Ed.). Somatic embryogenesis in woody plants. Boston: USA, v.5, p.31-43.
- [13] FERREIRA, M.das G.R.; CÁRDENAS, F.H.N.; CARVALHO, C.H.S.de; CARNEIRO, A.A.; DAMIÃO FILHO, C.F. 2001. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, v.23, n.3, p.473-476.



**Figura 1** – Percentual de embriões que apresentaram calogênese e área coberta por calos, na presença de 2,4-D combinado ou não com BAP. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007. Letras distintas entre si comparam as médias, ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.



**Figura 2** – Formação de calos em embriões zigóticos de paricá cultivados em meio MS suplementados com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D durante 30 dias de cultivo. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, 2007.