

EFEITO DE CITOCININAS (BAP E CINETINA) COMO AGENTES PROMOTORES DA CALOGÊNESE EM *A. cochliacarpus*

Elisângela Knoblauch V. de Andrade, José Maria Gonçalves de Azevedo, Marília Poton Arcobeli Cola, Nina C.B. Silva

Centro de Ciências Agrárias- UFES - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Depto. Produção Vegetal, Alto Universitário s/n Cx Postal 16, Guararema, Alegre-ES, 29500-000, fone (28) 35529014, e-mail: elisangelak_agronomia@hotmail.com; jmgazevedo@ifes.edu.br; marilia_agronomia@yahoo.com.br; ninachs@cca.ufes.br;

Resumo- O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de duas citocininas (BAP e cinetina) em combinação com uma auxina (2,4-D) como agentes promotores da calogênese em *A. cochliacarpus*. Plântulas cultivadas em meio WPM foram selecionadas e utilizadas como doadores de explantes (raiz, hipocótilo e folhas). Os explantes foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) adicionado de vitaminas, mio-inositol, 30 g. L⁻¹ de sacarose, 7g.L⁻¹ e acrescido de 2,4-D (2,5µM) em combinação com BAP ou Cinetina nas concentrações de 0,4 e 4,0 µM e subcultivados a cada 60 dias. Os ensaios com os diferentes hormônios vegetais e fontes de explantes diferentes foram avaliados quanto à influência do número de subcultivos na produção de biomassa dos mesmos através a avaliação da biomassa fresca. Os resultados obtidos indicam uma maior produção de biomassa nos calos de raiz em meio MS + 4,0µMBAP e, para os calos de hipocótilo, em meio MS + 4,0µM cinetina.

Palavras chave: *Abarema cochliacarpus*; citocininas; calogênese.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias

Introdução

Abarema cochliacarpus (Leguminosae - mimosoideae) é popularmente conhecida como barbatimão e utilizada na medicina popular, a casca do caule em decocção é usada para cicatrização de feridas, como analgésico, antiinflamatório, antisséptico e para o tratamento de leucorréia, sendo utilizada por muitas comunidades tradicionais do Nordeste do Brasil.

A indução de calos a partir de diferentes explantes pode contribuir para a definição de uma rota de multiplicação pela via embriogênica ou morfogênica, visando à conservação das espécies. A maximização da produção de calos regenerativos requer a consideração de vários fatores, como a composição do meio de cultura, a escolha do tipo de explante e as condições de cultivo.

O cultivo *in vitro* pode servir como um modelo para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários uma vez que com este tipo de cultivo é possível a manipulação e o controle, tanto quantitativo quanto qualitativo, de fatores que influenciam na síntese dessas substâncias tais como variação diurna e sazonal, idade das plantas (Grattapaglia e Machado, 1998).

A cultura de calos consiste no crescimento desordenado de agregados celulares em um meio sólido ou semi-sólido. O cultivo de células em

suspensão é resultado da suspensão de calos em um meio de cultura líquido, sob agitação contínua, de maneira obter e proliferar células dispersas (PARR, 1989). Resultados preliminares indicam que a auxina 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é essencial para indução da calogênese em *Abarema cochliacarpus* (Silva, 2005). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de outros reguladores de crescimento (BAP e cinetina) na formação e desenvolvimento calos de barbatimão.

Metodologia

Plântulas obtidas a partir de sementes germinadas em meio sólido de Murashige e Skoog (1962), sem hormônios (MS) e mantidas em meio nutritivo para espécies lenhosas (WPM), (Lloyd e McCown, 1980) sem adição de reguladores de crescimento foram utilizadas como doadoras de explantes para iniciar a cultura de calos.

As plântulas foram divididas em 3 partes (raiz, hipocótilo e folha) e inoculadas isoladamente em tubos de ensaio contendo meios MS acrescido de 2,5µM 2,4-D em combinação com os seguintes reguladores e concentrações: 0,4µM BAP (T1); 4,0µM BAP (T2); 0,4µM Cinetina (T3); 4,0µM Cinetina (T4).

Após o primeiro subcultivo, os calos formados foram transferidos para frascos contendo de 3 a 4 massas calogênicas por frasco. A cada 60 dias

foram realizados os subcultivos quando, então foi avaliada a produção de biomassa dos mesmos, por meio da pesagem dos calos de cada tratamento.

Em todas as etapas as culturas foram mantidas sob iluminação artificial com luz branca do tipo luz do dia (tubos fluorescentes), com fluência de 1,6 W/ m², fotoperíodo diário de 16 horas e temperatura a 25 ± 2°C.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi realizada com teste de Tukey com nível de fidelidade de 5%.

Resultados

A indução de calos em *A. cochliacarpus* ocorreu em todos os explantes avaliados, em ambas as concentrações de BAP e cinetina.

Para os calos formados a partir de explantes radiculares, a maior produção de biomassa foi obtida no meio MS+2,5µM 2,4-D+4,0µMBAP (T2) em todos os subcultivos realizados (Tabela 1). Após o segundo subcultivo houve um significativo acréscimo da biomassa fresca produzida, porém o terceiro subcultivo levou a redução do crescimento e redução da matéria fresca produzida (Tabela 1)

Tabela 1 - Produção de biomassa fresca (gramas de peso fresco) em calos de barbatimão originados de diferentes explantes e cultivados em diferentes meios de cultura ao final de 240 dias.

Biomassa Fresca (g)				
Meios	Explan-tes	1º Subcul-tivo	2º Subcul-tivo	3º Subcul-tivo
T1	Hipocótilo	0,628Aa	0,733Aa	0,500 Ab
	Raiz	0,302Bb	0,463Ba	0,390 Ba
	Folha	na*	Na	Na
T2	Hipocótilo	0,520 Aa	0,471Ba	0,540Aa
	Raiz	1,281 Ab	1,659Aa	0,709 Ac
	Folha	Na	Na	Na
T3	Hipocótilo	0,538Aa	0,246Cb	0,279 Bb
	Raiz	1,234Aa	0,452Bb	0,351 Bb
	Folha	0,225A	Na	Na
T4	Hipocótilo	0,519Aa	0,452Ba	0,665 Aa
	Raiz	0,232Ba	0,117Ca	0,143 Ca
	Folha	0,378Ab	3,385a	0,687b

* na – não avaliado. As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível 5% de probabilidade pelo teste Tukey (letra maiúscula: entre os tratamentos para o mesmo explante; letra minúscula: explante e meio iguais entre subcultivos)

Já para os explantes de hipocótilo, após o primeiro subcultivo não há diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos avaliados. Ao final do terceiro subcultivo a maior produção de biomassa foi observada no tratamento T4, apesar deste só diferir significativamente do tratamento T3 (Tabela 1).

O tratamento T4 não promoveu diferenças significativas na produção de biomassa dos calos entre os subcultivos para nenhum dos explantes utilizados assim como o tratamento assim como o tratamento T3 para hipocótilo. Nas demais condições testadas, o efeito do número de subcultivos na biomassa fresca acumulada foi positivo apenas para calos formados a partir de raiz no tratamento T1. Nos demais, os subcultivos promoveram a redução da biomassa acumulada (Tabela 1).

Não foi possível avaliar o efeito dos tratamentos nos calos foliares devido a elevada taxa de contaminação dessas culturas.

Discussão

As auxinas sintéticas como o 2,4-D tendem a desnaturar no meio de cultura sendo mais rapidamente metabolizadas e desta forma alterando a relação auxina/ citocinina para uma relação favorável a formação de calos (GASPAR et al., 1996, KANWAR et al., 2008).

Além disto, na cultura de tecidos de plantas, as relações são complexas e, apesar de terem sido extensivamente estudadas, continuam pouco compreendidas. Sabe-se que além da relação reguladores de crescimento por tipo de explante, a disponibilidade de macronutrientes pode afetar diretamente os processos de organogênese (KINTZIOS et al., 2004). FARIA E FORTES (1996) obtiveram 99,5% de calogênese em internódios do porta - exerto de macieira Marubakaido mantidos em cultura contendo BAP. O efeito do BAP na formação de calos também foi demonstrado em segmentos foliares de castanheira do Brasil (CAMARGO, 1997) e de caqui (TAO; SUGIURA, 1992)

Conclusão

O meio mais indicado para a cultura de calos é o meio MS+2,5µM 2,4-D +4,0µMBAP para raiz, e nos calos de hipocótilo os melhores resultados obtidos foram MS+2,5µM 2,4-D +0,4µM cinetina onde obteve a maior produção de biomassa fresca ao final do terceiro subcultivo. Portanto, pode se afirmar que cada regulador de crescimento, tem uma relação com o tipo de explante utilizado no crescimento vegetativo.

Referências

- CAMARGO, I. P. de Estudos sobre a propagação da castanheira-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.). Lavras: UFLA, 1997. 127p. (Tese- Doutorado em Fitotecnia)
- FARIA, J.T.C.; FORTES, G.R. de L. Calogênese e Organogênese *in vitro* de porta-exerto de macieirocv. Marubakaido (*Malus prunifolia*). Pelotas: UFPel, 1996. 50p. (Dissertação de Mestrado).
- GASPAR,T.et al.Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cellular Development Biology** – Plant, v.32, n. 4, p.272 – 289, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Vol I. 1ª ed. Brasília: DF. Embrapa. 1998. 846 p
- KANWAR, K et al. Plant regeneration in *Robinia pseudoacacia* from cell suspension cultures. **Biologia Plantarum**, v. 52, n. 1, p. 187-190, 2008.
- KINTZIOS, S.; STAVROPOULOU, E R.; SKAMMNELI, S. Accumulation of selected macronutrientes and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). **Plant Science**, v. 167, p. 655-664, 2004.
- LOYD, G. e McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Intern. Plant Propag. Soc. Proceed.**, 30: 421-427, 1980.
- MURASHIGE, T. e SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**,15: 473 497, 1962.
- PARR, A.J.. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. **Journal of Biotechnology**, 10: 1-16, 1989.
- SILVA, R. B. L. et al. **Asteraceae medicinais da Comunidade Quilombola de Curiaú, Macapá-AP**, Brasil. In: 56º Congresso Nacional de Botânica. Curitiba PR, 2005.
- TAO, R.; SUGIURA, A. Adventitious bud formation from callus cultures of Japanese persimmon. **HortScience, Alexandria**, v. 27, n. 3, p. 259-261, Mar.1992.