

# Indução de Calogênese em Explantes de *Parapiptadenia rigida*

Paula Vargas do Nascimento Kielse<sup>1</sup>, Elci Terezinha Henz Franco<sup>2</sup> e Eduardo Garcia Frassetto<sup>3</sup>

## Introdução

A *Parapiptadenia rigida*, angico-vermelho, é uma espécie da família Leguminosae – Mimosoideae [1], recomendada para o paisagismo, reposição de mata ciliar e, ainda, na recuperação de áreas degradadas [2].

No Brasil, muitas espécies florestais exóticas e agrícolas têm sido propagadas através da tecnologia de cultura de tecidos, porém pouco se tem estudado sobre a micropropagação em espécies nativas.

A propagação de plantas *in vitro* pode ser altamente vantajosa, em especial para a *Parapiptadenia rigida*, pois o curto período de viabilidade das sementes após a coleta, dificultado a utilização desta espécie. A perda de vigor ocorre em cerca de 120 dias, quando as sementes são estocadas em condição ambiente [3].

Além disso, a indução de calos em explantes desta espécie poderá ser utilizada para definir uma rota de multiplicação pela via embriogênica ou morfogênica, visando a sua conservação, à semelhança do que se tem verificado com outras lenhosas [4].

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 ambiente de cultivo.

Para a proliferação de calos e a indução de células para qualquer rota morfogenética é necessária a utilização de reguladores de crescimento, que atuam na retomada mitótica de tecidos diferenciados [5], modificando o metabolismo celular quiescente em um metabolismo ativo. Dentre as auxinas, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) tem sido reportado como regulador de crescimento sintético mais adequado à indução e manutenção de calos para as mais diversas espécies vegetais cultivadas *in vitro* [6].

O objetivo do trabalho foi identificar os tipos de explante e a concentração hormonal capaz de promoverem a formação de calos em *Parapiptadenia rigida*.

## Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Biologia, pertencente ao Centro de Ciências Naturais e

Exatas da Universidade Federal de Santa Maria.

Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob luminosidade de 2.000 lux, fornecidos por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

### A. Material vegetal

Para obtenção de plântulas fornecedoras de explantes, sementes de *Parapiptadenia rigida* foram desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) durante 10 minutos e posteriormente submetidas a enxágües em água destilada e autoclavada. Após, as sementes foram submersas em solução de Benomil® na concentração de  $1\text{ g.L}^{-1}$  durante 10 minutos.

As sementes foram inoculadas em meio nutritivo Wood Plant Medium (WPM) [7], acrescido de  $20\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $5\text{ g.L}^{-1}$  de ágar, sendo pH ajustado em  $5,8 \pm 0,2$ . As culturas foram mantidas em sala de crescimento por um período de 60 dias.

### B. Indução de calogênese em explantes jovens

Segmentos de raízes, hipocótilos e folhas, de comprimento aproximado de 1 cm, além de nós cotiledonares, região do colo e folhas cotiledonares, foram excisados de plântulas com 60 dias e inoculados em meio de cultura WPM, acrescido de  $20\text{ g.L}^{-1}$  sacarose,  $5\text{ g.L}^{-1}$  de ágar e combinações de 2,4-D ( $1\text{ mg.L}^{-1}$  e  $5\text{ mg.L}^{-1}$ ) com cinetina (KIN) nas concentrações de  $0,1\text{ mg.L}^{-1}$  e  $1\text{ mg.L}^{-1}$ , por um período de 20 dias.

Após, os explantes foram transferidos para o meio de cultura WPM, acrescido de  $6\text{ g.L}^{-1}$  de ágar,  $30\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e suplementado de  $0,01\text{ mg.L}^{-1}$  de ácido naftalenoacético (ANA) com  $0,01\text{ mg.L}^{-1}$  de KIN, por período de 60 dias (1º subcultivo) e, posteriormente, transferidos para meios de cultura suplementados com  $1\text{ mg.L}^{-1}$  6-benzilaminopurina (BAP) ou  $1\text{ mg.L}^{-1}$  KIN, permanecendo nestes meios por mais 60 dias (2º subcultivo).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $5 \times 6$ , com três repetições por tipo de explante. Cada repetição constituiu de dois frascos, sendo cada frasco constituído

<sup>1</sup> Engenheira Florestal, Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), paulakielse@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Bióloga, Prof. Drª - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), elcifraco@smail.ufsm.br

<sup>3</sup> Engenheiro Florestal, Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria (RS), frassetto@fesurv.br

de quatro explantes.

A porcentagem de indução de calos e o tamanho dos calos foram avaliados aos 20 e 140 dias após o início da cultura, respectivamente.

## Resultados e discussão

Formações de calos não foram verificadas no tratamento testemunha, desprovido de reguladores de crescimento, demonstrando a forte dependência de fonte exógena de fitorreguladores para ativação, desdiferenciação e divisão celular nos explantes [8,9].

As maiores porcentagens de formação de calos foram verificadas em segmentos de hipocótilo submetidos de 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN e 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN atingindo 8,21 e 7,84 %, respectivamente (Fig. 1).

Aos 140 dias, os calos apresentavam aspecto friável, com coloração variando de branca a amarelo clara (Fig. 2) e aspecto embriogênico. Estudos indicam que a transferência dos calos para meio com baixa concentração de auxina no 1º subcultivo e ausência desta no 2º subcultivo favorece a formação de embriões [10,11], contudo, neste estudo, não foi verificada nenhuma resposta embriogênica.

Embora o segmento de hipocótilo tenha apresentado as maiores porcentagens de calos induzidos, os segmentos de folhas apresentaram os calos de maior tamanho quando submetidos a 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> de KIN com 1,66 mm (Tab. 1).

Os resultados deste trabalho constituem a primeira menção sobre formação de calos em *Parapiptadenia rigida*, servindo de suporte para futuros trabalhos, como por exemplo, produção de embriões somáticos.

As maiores porcentagens de calos em explantes de *P.rigida* foram verificadas em segmentos de hipocótilo. Os segmentos de folha apresentaram calos com maiores tamanhos.

As combinações hormonais que forneceram os melhores resultados de formação calogênica foram 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN e 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN.

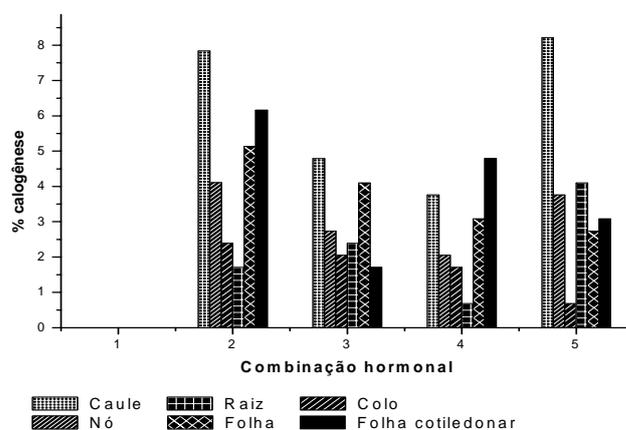
## Referências

- [1] LORENZI, H. 2000. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. v.1. Nova Odessa: Instituto de Estudos da Flora, São Paulo. 608 p.
- [2] CARVALHO, P.E.R. 1994. *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – EMBRAPA – CNPF. Colombo – PR, 640p.
- [3] FIGLIOGLIA, M.B.; SILVA, A. da; JARDIM, D.C.P.; & IWANE, M.S.I. 1986/88. Viabilidade de sementes liofilizadas de essências florestais nativas. *Silvicultura em São Paulo*, 20/22: 47-55.
- [4] JAIN, S.M & ISHII, K. 1998. Recent advances in somatic embryogenesis in forest trees. In: MANTELL, S. BRUNS, C. TRAGARDH & A.M. (S.H. Viana, eds.). *Recent advances in biotechnology for conservation and management*. International Foundation for Science, Stockholm, p.214-231.
- [5] SONDAHL, M.R., NAKAMURA, T. & SHARP, W.R. 1985. Propagation of coffee. In: HENKE, R.R., HUGHES, K.W., CONSTANTIN, M.P., HOLLAENDER, A. (Ed.). *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*, New York: Plenum, p. 215-232.
- [6] GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A. & VASIL, I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In vitro*. 12(7):4738.
- [7] LLOYD, G. & McCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-327.
- [8] LINSMAIER, E.M. & SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127.
- [9] REINERT, J. & WHITE, P.R. 1956. The cultivation in vitro of tumor tissue and normal tissues of *pinus glauca*. *Physiologia Plantarum*, 9: 177-189.
- [10] HALPERIN, W. & WETHERELL, D.F. 1964. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot *Daucus carota*. *American journal of Botany*, 51: 274-283.
- [11] REYNOLDS, J.F. & MURASHIGE, T. 1979. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In vitro*, 15: 383-387.

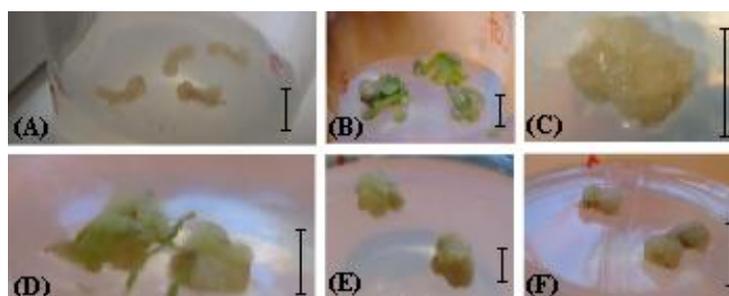
**Tabela 1.** Tamanho médio (mm) de calos de *Parapiptadenia rigida* em diferentes tipos de explante, avaliados aos 140 dias, em função das combinações hormonais entre 2,4-D e KIN.

Explantes	Combinações de Fitoreguladores (mg/L)				
	1	2	3	4	5
Hipocótilo	0,00	1,27	0,91	0,70	0,80
Folha	0,00	1,66	1,10	1,31	0,92
Folha cotiledonar	0,00	1,33	1,01	1,39	1,23
Raiz	0,00	1,37	1,41	1,40	1,09
Colo	0,00	1,45	1,25	0,96	0,50
Nó cotiledonar	0,00	1,14	1,14	0,66	0,80

1- Testemunha; 2- 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 3- 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 4- 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 5- 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN.



**Figura 1.** Porcentagem de calos induzidos sob diferentes concentrações de 2,4-D e KIN em explantes de segmentos de hipocótilo, raiz e folha, folhas cotiledonares, colos e nós cotiledonares de *Parapiptadenia rigida* durante 20 dias de cultivo. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si significativamente, em nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. 1- Testemunha; 2- 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 3- 1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 4- 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 5- 5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> KIN.



**Figura 2.** Calos nos diferentes tipos de explantes: (A) calo em segmentos de raiz; (B) calo em folhas cotiledonares; (C) calo em segmento do hipocótilo; (D) calo em folha; (E) calo em nó cotiledonar e (F) calo em colo, aos 140 dias de cultivo após a instalação do experimento de indução de calos. Escala= 1 cm.