



FONTES DE EXPLANTES, REGULADORES E MEIOS DE CULTURAS PARA INDUÇÃO DE CALOGÊNESE DO PAU-BRASIL

Rafael Fonsêca Zanotti^{1*}, Fernanda Raquel Sartor¹, Kátia Ferreira Pôssa², Anderson Martins Pilon¹, Claudio Hiroshi Fukushima¹

¹ Fitoclone. Parque Tecnológico da Universidade Federal de Viçosa, Incubadora de Empresas de Base Tecnológica CENTEV/UFV, sala 30. Cep: 36570-000 – Viçosa/MG – Brasil (rfzanotti@gmail.com)

² Universidade Federal de Lavras

*Autor para Correspondência

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

Caesalpinia echinata Lam.(pau-brasil) é uma espécie da flora brasileira que se encontra ameaçada de extinção. Distribui-se do Estado do Rio Grande do Norte ao Estado do Rio de Janeiro, em algumas populações fragmentadas. A sua alta taxa de exploração foi iniciada com colonização européia, por causa das características de sua madeira. Por ser uma espécie ameaçada de extinção, uma estratégia para sua preservação consiste na conservação de banco de germoplasma *in situ* e *ex situ*. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos diferentes explantes foliares, meios de cultura e reguladores de crescimento na indução a calogênese. Para o controle da calogênese, explantes foliares de *C. echinata* com e sem peciólulos foram cultivados em meios de cultura MS e WPM, com a presença de diferentes concentrações de auxinas (AIA e 2,4-D) e citocinas (BAP e TDZ). Aproximadamente 70% da formação de calos foram cicatriciais, tanto em meio de cultura MS quanto WPM. Os tratamentos MS+AIA (15, 20 e 30 μ M), MS+BAP (2 e 10 μ M) e WPM+BAP (2 e 10 μ M) apresentaram mais de 50% dos calos com formação nodular. Nesse experimento pode-se concluir que os calos monodulares de *C. echinata* tem maior indução em meio de cultura MS, com as auxinas AIA e 2,4-D, e utilizando principalmente explantes foliares com peciólulos.

PALAVRAS-CHAVE: *Caesalpinia echinata*, calos, cultura de tecidos, fitorreguladores

EXPLANTS SOURCES, REGULATORS AND CULTURES MEDIA FOR INDUCTION OF BRAZILIANWOOD CALLOGENESIS

ABSTRACT

Caesalpinia echinata Lam (Brazilwood) is a species of flora that is threatened with extinction. It is distributed in the state of Rio Grande do Norte to the State of Rio de Janeiro, in some fragmented populations. Its high rate of exploitation began with European colonization, because of the characteristics of its wood. The aim of this study was to evaluate the effects of different leaf explants, culture media and growth regulators on callus formation induction. For control of callus formation, *C. echinata* leaf explants with and without petiolule were grown in culture media MS and WPM,

with the presence of different concentrations of auxins (IAA and 2,4-D) and cytokines (BAP and TDZ). Approximately 70% of the healing callus formation were both in MS medium and WPM. MS + IAA treatments (15, 20 and 30 μ M), MS + BAP (2 and 10 μ M) and WPM + BAP (2 and 10 μ M) had more than 50% of the callus with nodular formation. In this experiment we can conclude that calluses monodulares *C. echinata* has a greater induction in MS medium with IAA and the auxin 2,4-D, and using mainly leaf explants with petiolule.

KEYWORDS: *Caesalpinia echinata*, callus, tissue culture, growth regulates

INTRODUÇÃO

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie muito explorada na Mata Atlântica, e sua exploração ocorre desde o descobrimento do Brasil no ano de 1500 devido aos pigmentos vermelhos dessa espécie, sendo a primeira fonte de riqueza dos portugueses. Até hoje, a madeira de pau-brasil é exportada para o exterior, principalmente, para a Alemanha onde são confeccionados arcos de violino. Calcula-se que foram devastados cerca de seis mil quilômetros quadrados de Floresta Pluvial Atlântica no primeiro século de exploração (WARREN, 1996).

Por ser uma espécie ameaçada de extinção, uma estratégia para sua preservação consiste na conservação de banco de germoplasma *in situ* e *ex situ*. A conservação *ex situ* é bastante conhecida, porém a micropropagação de plantas *in vitro* que resultam da diferenciação, dediferenciação ou rediferenciação do explante inicial, como cultivo de folhas ou ápices meristemáticos, e podem ser agrupados, conforme a sua natureza via morfogênese direta ou indireta (REY *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2012).

A cultura de tecidos é uma alternativa para a propagação em alta escala do material vegetal (NAMDEO *et al.*, 2012). É importante saber qual a porção do explante é mais responsiva aos tratamentos, as concentrações e quais são os reguladores de crescimento que apresentam as melhores respostas calogênicas (BERTONCELLI & OLIVEIRA, 2010)

Os experimentos foram conduzidos com o objetivo de testar a ação de auxinas e citocininas na indução e formação de calos em *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), visando a embriogênese somática.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal, setor de Cultura de Tecidos do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para a realização dos experimentos, utilizaram-se foliólulos jovens de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) (WERNER *et al.*, 2009) oriundos de mudas do viveiro da Universidade Federal de Viçosa. Os explantes foram lavados com detergente comercial e enxaguados em água corrente por 10 minutos. Em seguida ocorreu uma lavagem com álcool 70% (v/v) por dois minutos em ambiente estéril, posteriormente foi realizada lavagem em hipoclorito de sódio comercial (40%) e lavagem tripla com água destilada e autoclavada para finalizar a desinfestação, como sugerida por WERNER *et al.*, (2010).

Foram utilizados como explantes foliólulos com pecíolo (Fp) e foliólulos sem pecíolos (F) e os meios de cultura utilizados foram o de MS (MURASHIGE &

SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), acrescido 3% de sacarose e 0,3% de Gelrite[®], com o pH foi ajustado para 5,7.

Ao final da desinfestação dos explantes em ambiente estéril, os discos foliares com um cm de diâmetro foram obtidos e transferidos para os tratamentos mencionados no Quadro 1. O material foi acondicionado em sala de crescimento em obscuridade constante e temperatura ajustada para 25 °C.

A avaliação ocorreu 40 dias após o início do experimento. Os explantes foram avaliados quanto à presença de calos.

QUADRO 1. Distribuição dos tratamentos, MC= Meio de cultura; RC= Regulador de crescimento; F= Folha sem peciólulo; FP= Folha com peciólulo.

Tratamento	MC	RC	µM	Tratamento	MC	RC	µM
MSAI15/F	MS	AIA*	15	WPMAI15/F	WPM	AIA	15
MSAI15/FP	MS	AIA	15	WPMAI15/FP	WPM	AIA	15
MSAI20/F	MS	AIA	20	WPMAI20/F	WPM	AIA	20
MSAI20/FP	MS	AIA	20	WPMAI20/FP	WPM	AIA	20
MSAI30/F	MS	AIA	30	WPMAI30/F	WPM	AIA	30
MSAI30/FP	MS	AIA	30	WPMAI30/FP	WPM	AIA	30
MSB10/F	MS	BAP	10	WPMB10/F	WPM	BAP	10
MSB10/FP	MS	BAP	10	WPMB10/FP	WPM	BAP	10
MSB2/F	MS	BAP	2	WPMB2/F	WPM	BAP	2
MSB2/FP	MS	BAP	2	WPMB2/FP	WPM	BAP	2
MSB20/F	MS	BAP	20	WPMB20/F	WPM	BAP	20
MSB20/FP	MS	BAP	20	WPMB20/FP	WPM	BAP	20
MSD15/F	MS	2,4-D	15	WPMD15/F	WPM	2,4-D	15
MSD15/FP	MS	2,4-D	15	WPMD15/FP	WPM	2,4-D	15
MSD20/F	MS	2,4-D	20	WPMD20/F	WPM	2,4-D	20
MSD20/FP	MS	2,4-D	20	WPMD20/FP	WPM	2,4-D	20
MSD30/F	MS	2,4-D	30	WPMD30/F	WPM	2,4-D	30
MSD30/FP	MS	2,4-D	30	WPMD30/FP	WPM	2,4-D	30
MST10/F	MS	TDZ	10	WPMT10/F	WPM	TDZ	10
MST10/FP	MS	TDZ	10	WPMT10/FP	WPM	TDZ	10
MST2/F	MS	TDZ	2	WPMT2/F	WPM	TDZ	2
MST2/FP	MS	TDZ	2	WPMT2/FP	WPM	TDZ	2
MST20/F	MS	TDZ	20	WPMT20/F	WPM	TDZ	20
MST20/FP	MS	TDZ	20	WPMT20/FP	WPM	TDZ	20

*AIA: Ácido indolacético; BAP: Benzilaminopurina; 2,4-D: ; TDZ: Thidiazuron

Os dados foram expressos na forma de estatística descritiva, com demonstração das frequências calogênica em cada tratamento. Avaliando-se a frequência e o tipo de calo. O experimento foi conduzido no período de julho a agosto de 2011.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os calos de pau-brasil foram caracterizados como cicatriciais, calo monodular que foi caracterizado com um aspecto de aglomerado celular homogêneo e calo heteronodular que foi semelhante ao monodular, porém com a presença de

filamentos juntamente ao aglomerado celular. O processo de desdiferenciação iniciou-se na nervura central e na borda dos fragmentos foliares, assim como ocorreu com os explantes foliares obtidos por WERNER *et al.*, (2009).

Os meios de cultura MS e WPM permitiram a indução de aproximadamente 70% dos calos cicatriciais. O meio de cultura MS apresentou maior porcentagem de calos monodulares enquanto o meio de cultura WPM apresentou maior porcentagem de calos mistos (Figura 1). Os calos primários, que segundo GRANDO *et al.*, (1993) são calos recém formados, que não apresentam setores diferenciados. Estes calos poderão se desenvolver em calos friáveis que apresentam estruturas com células com alta capacidade mitótica (BESSE *et al.*, 1992).

Segundo GLOCKE *et al.*, (2006), o meio de cultura WPM é muito utilizado na calogênese e embriogênese de espécies florestais lenhosas. Porém WERNER *et al.*, (2009) obtiveram menor proliferação celular quando utilizaram o meio de cultura WPM em relação ao meio de cultura MS. Essa maior proliferação celular no meio de cultura MS pode ser em decorrência da presença de calos monodulares, que não se diferenciaram em nenhuma outra estrutura. Dessa maneira foi observado maior volume de massa celular não diferenciado (dados não apresentados) no meio de cultura MS.

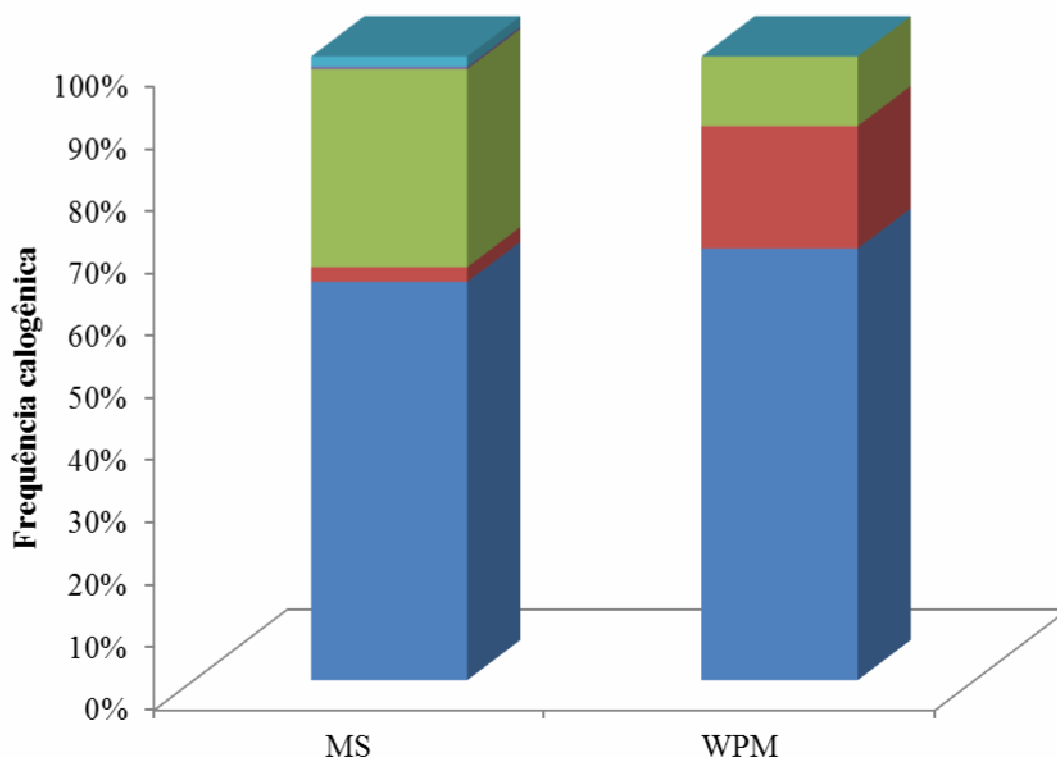


FIGURA 1. Reação calogênica aos 40 dias de indução de explantes foliares de *C. echinata* nos meios de cultura MS e WPM. (Oxidado ■; Heteronodular ■; Monodular ■; MISTO ■; Cicatricial ■).

Os foliólulos sem peciólulos apresentaram aproximadamente 20 pontos percentuais a mais de calos cicatriciais em relação aos foliólulos com peciólulos.

Porém os foliólulos com peciólulos apresentaram maiores percentagens de calos monodulares e mistos (Figura 2). Dessa forma os foliólulos com peciólulos apresentam maiores chances em se diferenciar em calos friáveis, pois seus calos apresentaram maiores volumes de massa celular. Os peciólulos apresentam essa maior diferenciação, pois as células da bainha perivascular são mais facilmente induzidas à proliferação celular (GUEYE *et al.*, 2009).

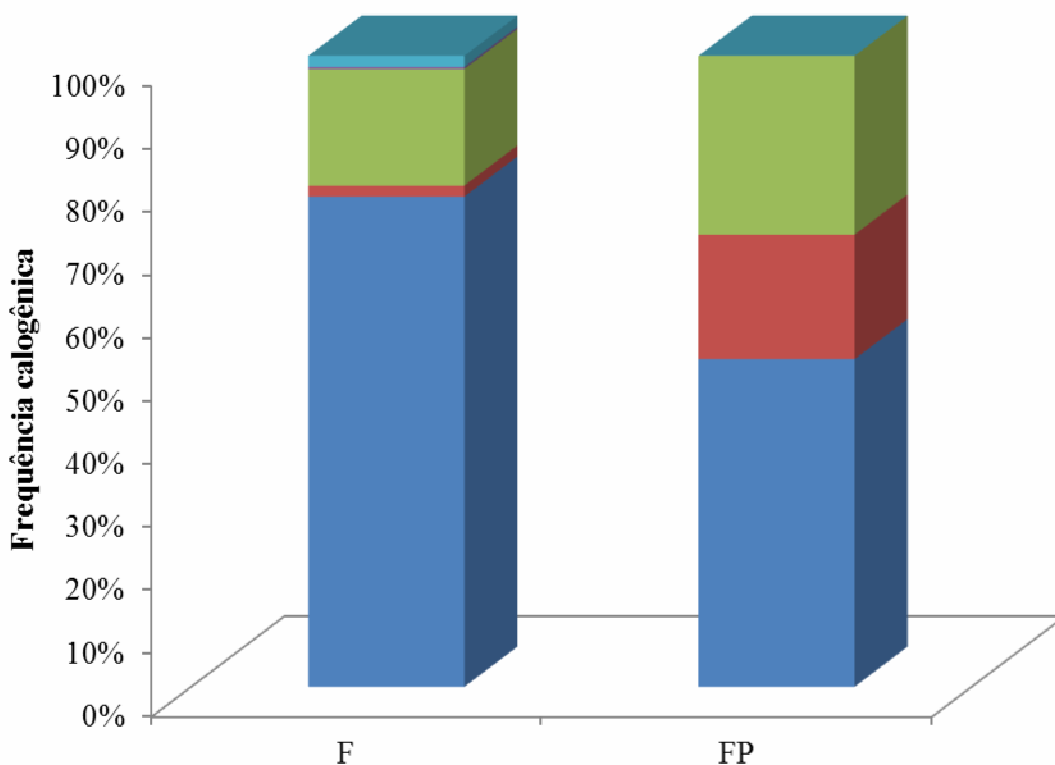


FIGURA 2. Reação calogênica aos 40 dias de indução de explantes foliares de *C. echinata* com foliólulo (FP) e sem foliólulo (F). (Oxidado ■; Heteronodular ■; Monodular ■; MISTO ■; Cicatricial ■).

Os explantes tratados com as auxinas AIA e 2,4D apresentaram as maiores percentagens de calos monodulares, enquanto os explantes tratados com citocininas BAP e TDZ induziram maior porcentagem de calos cicatriciais e mistos (Figura 3). O 2,4-D é a auxina mais freqüentemente usada na indução de calogênese e responde positivamente em explantes foliares (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Os calos monodulares por serem aglomerados de células indiferenciadas poderão ser utilizados para as etapas de organogênese (BESSE *et al.*, 1992). WERNER *et al.*, (2010) obtiveram maiores percentagens de calos utilizando as auxinas 2,4-D e AIB, porém não foi discriminado que tipo de calo esses reguladores de crescimento favoreceram a proliferação.

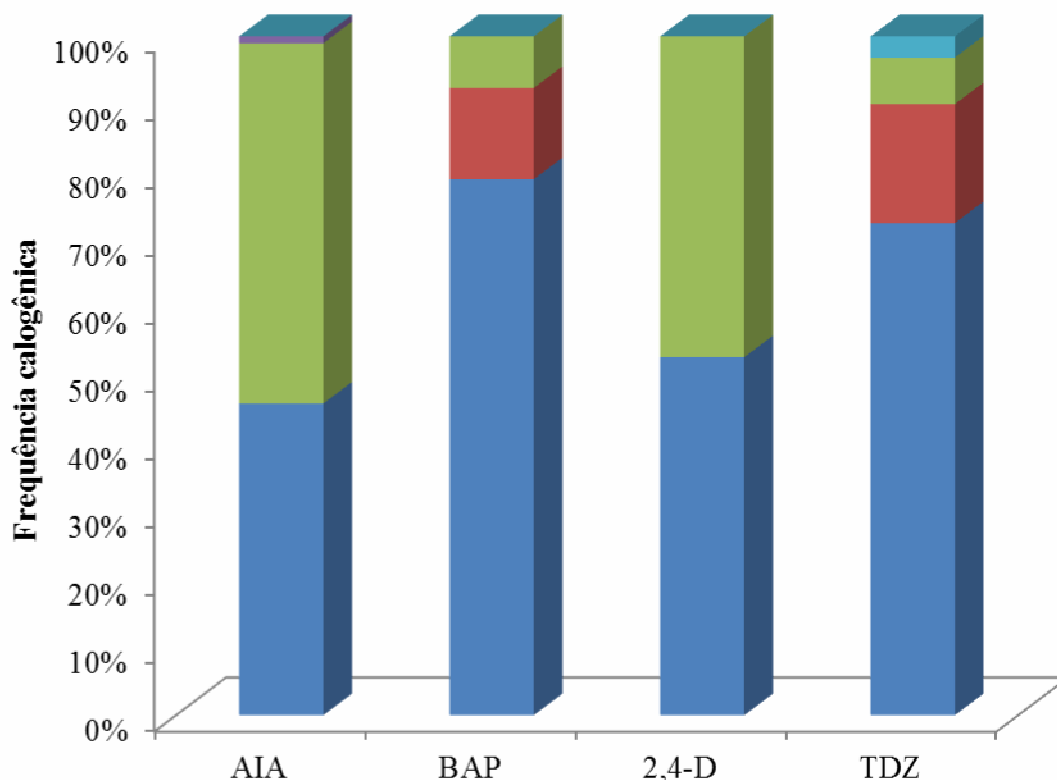


FIGURA 3. Reação calogênica aos 40 dias de indução de explantes foliares de *C. echinata* na presença dos reguladores de crescimento AIA, BAP, 2,4-D e TDZ. (Oxidado ■; Heteronodular ■; Monodular ■; MISTO ■; Cicatricial ■).

As combinações de meio de cultura MS com AIA e 2,4-D 30 μ M e o WPM com 2,4-D foram os tratamentos com as maiores frequências calogênica com valores em torno de 100% de calos monodulares. Enquanto os tratamentos utilizando explantes foliares com peciólulos com combinação de WPM com as citocinas BAP 2 μ M e TDZ 10 e 20 μ M. Todos os outros tratamentos induziram, principalmente, os calos cicatriciais (Figura 4). Os calos cicatriciais são apenas o início das formações de calos que terão competência na formação de embriões somáticos (GAJ, 2004; WERNER *et al.*, 2012). Em explantes de café esses calos são obtidos nas bordas dos fragmentos foliares (DUBLIN, 1981), assim como ocorrem com os explantes de pau-brasil. Dessa forma pode-se esperar que os calos cicatriciais formados tenham capacidade de desenvolvimento em calos friáveis, porém estudos posteriores deverão ser realizados para melhor caracterizá-los.

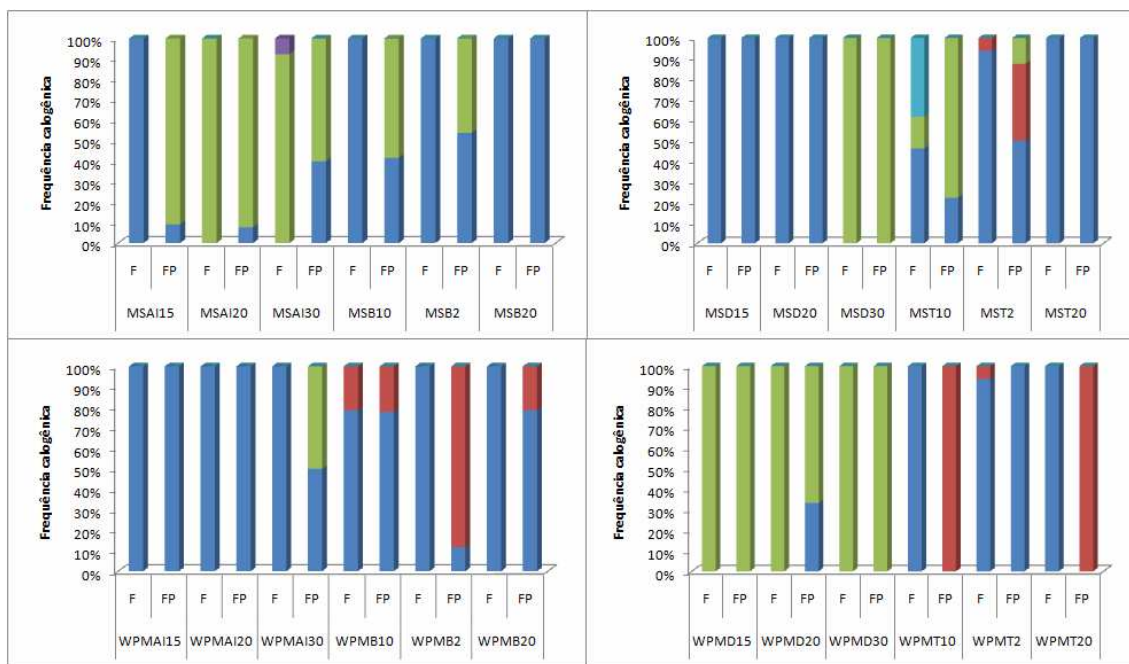


FIGURA 4. Reação calogênica aos 40 dias de indução de explantes foliares de *C. echinata* na presença da combinação dos reguladores de crescimento AIA, BAP, 2,4-D e TDZ e meios de cultura MS e WPM. (Oxidado ■; Heteronodular ■; Monodular ■; MISTO ■; Cicatricial ■).

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o meio de cultura MS suplementado com as auxinas AIA e 2,4-D foram os tratamentos que promoveram maior indução de calos monodulares de *C. echinata*, utilizando como fonte de explantes foliólulos com peciólulos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Viçosa, ao CNPq e FAPEMIG (pelas bolsas concedidas) e financiamento do projeto.

À seção Cultura de Tecidos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo do DBV-UFV, pela utilização das instalações.

Ao Dr. Antônio Teixeira Cordeiro, responsável pelo laboratório, pelas contribuições neste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTONCELLI, D. J.; OLIVEIRA, M.C. **Avaliação de diferentes explantes e combinações de reguladores vegetais (BAP e ANA) no cultivo *in vitro* de *Physalis pubences* L.** IV Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - Ciências Agrárias, Animais e Florestais. 2010.

BESSE, I.; VERDEIL, J.L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, R.; MIGININAC, E. Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clonal Fidelity: Endogenous

Cytokinins and Indoleacetic Acid in Embryogenic Callus Cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n.7, p.983-989, 1992.

DUBLIN, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao Thé**, Guatemala , v. 25, n. 4, p. 237-241, 1981.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 43, n.1, p. 27-47, 2004.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* Cv. 'Urrbae Gem'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v.42, n. 2, p. 139-143, 2006.

GRANDO, M.F.; EICHLER, L.; TANABE, C.R.; SANTOS, J.F.; SANTOS, C.M.. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campos dos Goytacazes, v.5, p.139-144, 1993.

GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D., HIL BERT, J.L.; VERDEIL, J.L.; BLERVACQ, A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.98, p. 47-58, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Ashville, v. 30, p.421-427, 1981.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. DE A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. DE O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

MENEZES, T.S.A.; SANTOS, T.C.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v.2, n. 1, p. 32-41, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAMDEO, A. G.; PRIYA, T.; BHOSALE, B. B. Micropropagation and production of camptothecin form in vitro plants of *Ophiorrhiza mungos*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p.662-666, 2012.

REY, M.S.; PINHO, D.S.; VIEIRA, A.P.; BRAGA, E.J.B.; PIEROBOM, C.R.; PETERS, J.A. Organogênese direta de mesocótilos de arroz (*Oryza sativa* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 521-526, 2010

WARREN, D. 1996. **A Ferro e Fogo: a história e a devastação da mata atlântica brasileira**. Companhia das Letras, São Paulo. 484 p.

WERNER, E.T.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P.; ROGER, J.A.; CUZZUOL, G.R.F. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.6, p.987-996, 2009.

WERNER, E.T.; PESSOTTI, K.V.; MENGARDA, L.H.G., VENDRAME, W.P.; CUZZUOL, G.R.F. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 24, n.4, p.1046-1051, 2010.

WERNER, E.T.; LIMA, A.B.P.; AMARAL, J.A.P. Expressão gênica na Embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14; p.552-580, 2012.