

## ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO DE CALOS DE *AMBURANA CEARENSIS* (Arr. Cam) SMITH

**Liliane Santos de Araújo<sup>1</sup>; Lenaldo Muniz de Oliveira<sup>2</sup>; Bruno Freitas Matos Alvim<sup>3</sup>**

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [lilyuefs@yahoo.com.br](mailto:lilyuefs@yahoo.com.br)
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [lenaldo.uefs@gmail.com](mailto:lenaldo.uefs@gmail.com)
3. Co-orientador, Mestrando em botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [brunoalvim18@hotmail.com](mailto:brunoalvim18@hotmail.com)

**PALAVRAS CHAVES:** plantas medicinais, cultivo *in vitro*, calogênese

### INTRODUÇÃO

*Amburana cearensis* (Arr. Cam) Smith, também conhecida como amburana de cheiro é uma espécie arbórea de porte médio, típica da caatinga. Suas cascas e sementes são utilizadas com frequência na medicina popular, como medicação caseira no tratamento de bronquites, asma, gripes e resfriados. Estudos fitoquímicos com essa espécie demonstrou que suas sementes apresentam 23% de óleos fixos, constituído, principalmente, de ácido palmítico (18,6%), linoléico (7,1%), oléico (53,1%) e esteárico (8,0%), além de cumarinas (Canuto e Silveira, 2005).

A intensa exploração de suas cascas e sementes na medicina popular tem prejudicado o repovoamento das populações naturais. Por conta disso, a espécie encontra-se na lista de espécies ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e da International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources (Leite, 2005).

A cultura de tecidos vegetais tem sido uma importante alternativa para a exploração comercial de espécies vegetais, objetivando a propagação rápida de genótipos selecionados, a conservação *in vitro* de germoplasma e a produção comercial de substâncias bioativas com alto valor agregado (Castro et al., 2009), via cultivo de calos ou suspensão celular. A calogênese representa ponto de partida para o cultivo de suspensões celulares, sistema mais utilizado para produção de metabólitos *in vitro*. A cultura de células em meio líquido é um excelente sistema para pesquisas voltadas para a exploração de compostos bioativos de interesse comercial, possibilitando o estudo das vias metabólicas envolvidas com a produção do composto de interesse, bem como para identificação de fatores estimulantes dessas vias.

Assim, este trabalho teve como objetivo induzir a formação de calos friáveis em diferentes tipos de explantes juvenis de *Amburana cearensis*, utilizando-se diferentes tipos de meio de cultura, visando a obtenção da cultura celular dessa espécie em meio líquido.

### MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental do Horto Florestal da UEFS. Para o estabelecimento das plantas *in vitro* as sementes de *Amburana cearensis*, compradas em feiras livres, foram lavadas em água de torneira e desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool a 70% durante um minuto e solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), com

acréscimo de uma gota de detergente neutro para cada 100 mL da solução por 10 minutos e, então, lavados por quatro vezes em água destilada estéril.

Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em tubos de ensaios (25 x 150mm) contendo 10ml do meio de cultura MS (Murashige e Scook, 1962), solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose. O meio de cultura foi autoclavado previamente à temperatura de 120°C por 15 minutos. Após inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas, umidade relativa de 50-70% e densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após 45 dias de cultivo as plantas foram utilizadas para montagem do experimento de calogênese.

Para indução dos calos foram utilizadas como fonte de explantes folhas cotiledonares, segmentos foliares, segmentos nodais e segmentos cotiledonares oriundos de plantas estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em diferentes meios de cultura: MS, MS/2 (com metade da concentração de sais) e WPM (Lloyd & Mccown, 1980), solidificados com 0,7% de ágar e suplementados com 3% de sacarose e 4,44 $\mu\text{M}$  do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D). Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C e no escuro, avaliando-se o peso fresco e a consistência dos calos 45 dias após a inoculação.

Após a definição do melhor tipo de explante e meio de cultura para calogênese dessa espécie um novo experimento foi montado, para obtenção da curva de crescimento dos calos. Foram utilizados cotilédones como fonte de explante, inoculados em meio de cultura MS/2, nas mesmas condições descritas no experimento anterior. Neste, amostras de calos foram coletadas a partir do dia da inoculação (tempo 0) até os 56° dia de cultivo, com intervalos de coleta de sete dias. Os calos foram retirados do meio de cultura, limpos com papel toalha e colocados em sacos de papel, que foram levados à estufa de circulação de ar forçado a 60°C, até peso constante. Posteriormente os calos foram pesados em balança analítica para determinação do peso seco. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dez repetições por período de coleta, com cada repetição constituída por um tubo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o tipo de meio de cultura afeta a taxa de indução de calos em *Amburana cearensis*, com maior indução de calos no meio MS e MS/2 (Tabela 1). Apenas quando se utilizou segmentos cotiledonares como explante verificou-se maior indução de calos no meio de cultura WPM (Tabela 1).

Tabela 1. Peso fresco de calos de *Amburana cearensis* obtidos a partir de diferentes tipos de explantes e cultivados em meios de cultura MS, MS/2 e WPM, suplementados com 4,44 $\mu\text{M}$  de 2,4D.

Meio de cultura	Peso fresco (mg)*				Médias
	Seg. Nodal	Cotilédone	Folha	Seg. Cotiledonar	
MS	136 Ab	1910 Aa	232 Ab	84 Bb	590 A
MS/2	176 Ab	1700 Aa	386 Ab	114 Bb	594 A
WPM	30 Bb	52 Bb	136 Ab	432 Aa	162 B

Médias	114 b	1220 a	251 b	210 b
CV (%)	32.56			

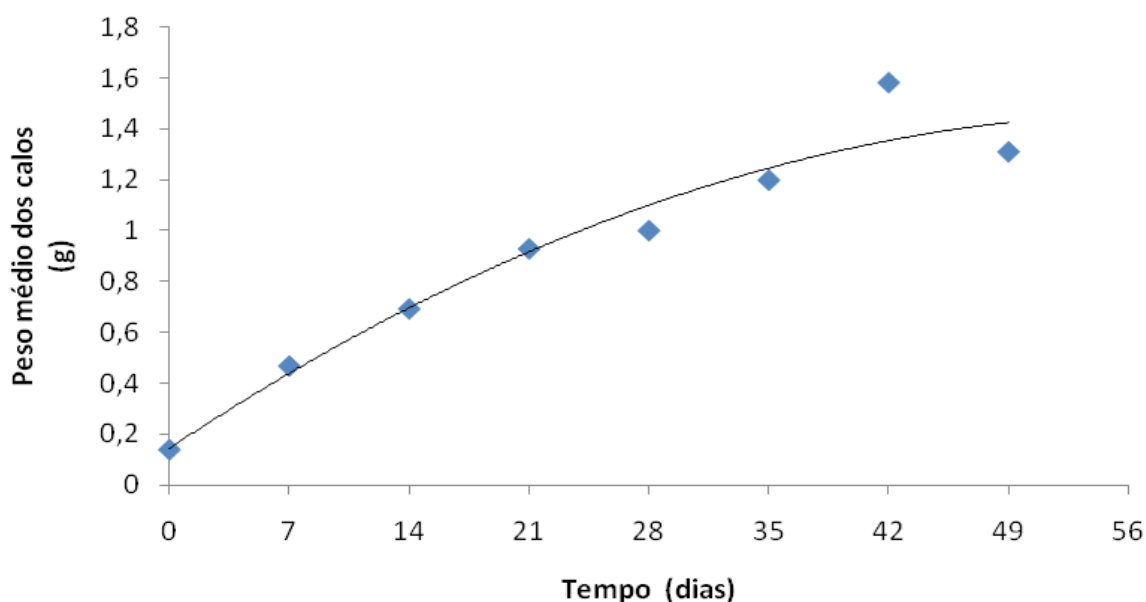
\*Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Kinott, em 5% de probabilidade de erro.

De modo semelhante, se verificou grande influência da fonte de explante sobre a indução de calos nessa espécie, demonstrando que os cotilédones apresentam o maior potencial calogênico quando inoculados em meio MS ou MS/2 suplementados com a auxina 2,4D (Tabela 1). A maior capacidade morfogênica dos cotilédones pode está relacionado à presença de mais tecido meristemático no mesmo, apesar de ser um tecido de reserva.

A coloração dos calos formados a partir de cotilédone variou de marrom claro a amarelo e apresentou consistência próxima do friável, tipo considerado ideal para o estabelecimento de suspensões celulares, pois suas células se dissociam facilmente em meio líquido. As maiores médias para peso fresco, encontradas nos tratamentos que utilizou cotilédone como fonte de explante, corroboram com os resultados obtidos por Venturiere e Venturiere (2004), com o híbrido *Theobroma grandiflorum* x *Theobroma obovatum*, onde verificaram maior frequência na formação de calos utilizando o cotilédone como fonte de explante.

Os resultados obtidos demonstram que a auxina 2,4D apresenta grande eficiência na indução de calos de *Amburana cearensis*. Para Nogueira et al. (2007) o 2,4-D é a auxina mais utilizada na indução de calogênese de plantas. As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento, podendo induzir a proliferação celular desordenada (George, 1996).

A análise do crescimento dos calos de *Amburana cearensis* demonstrou que a fase de maior crescimento ocorreu entre o 21° e 49° dia de cultivo, com comportamento próximo ao linear até os 49 dias após a inoculação, quando apresentou peso fresco médio de 1,42g, com tendência de estabilização a partir desse ponto (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de crescimento de calos de *Amburana cearensis* obtidos a partir de cotilédones inoculados em meio MS com metade da concentração de sais.

Contudo, no período analisado nesse experimento não foi observado o início da fase de desaceleração. Para Smith (1992), a determinação dessa fase é importante, pois indica o momento necessário para se transferir os calos para um novo meio de cultura (repicagem), devido à redução de nutrientes, secagem do ágar, acúmulo de substâncias tóxicas e/ou diminuição do oxigênio no interior das células dos calos. Landa (2000) verificou que para calos obtidos de segmentos foliares de pequiheiro, a transferência dos calos para um novo meio de cultura deve ocorrer entre o 46º e o 49º dia de cultivo.

## CONCLUSÕES

Cotilédone é o explante que apresenta o maior potencial calogênico em *Amburana cearensis*, possibilitando a obtenção de calos mais friáveis. O meio de cultura MS/2 permite uma elevada taxa de indução de calos nessa espécie. Os calos cultivados em meio MS/2 devem ser repicados para um novo meio de cultura por volta dos 50 dias após a inoculação.

## REFERÊNCIAS

- CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R **Uso de plantas jovens de *Amburana cearensis* A.C Smith alternativa para preservação e exploração econômica da espécie.** Documentos on line.ISSN 1808.9992. EMBRAPA. 2008.
- CASTRO, A.H.F. et al. Calogênese e teores de fénois e taninos totais em bartimão [ *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2,p.385-390, 2009.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology.** Edington: Exegetics,574 p. 1996.
- LANDA, F.S.L. et al. Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.56-63, dez 2000.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* ssp. **HortScience**. Alexandria, v.15, p.415, 1980.
- LEITE, E. J. State of knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, vol. 13, p. 49–65, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Indução de calos em explantes foliares muricipequeno(*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e agrotecnologia.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr., 2007
- SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments.** San Diego: Academic Press,171p. 1992.

VENTURIERI, G.A E VENTURIERI, G.C; Calogênese do híbrido Oct./Dec. 2004. YEPEZ, C.C.B. et al.; Carotenóides totais em *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Botucatu, v.10, n.2, p.89-93, 2008.