

Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. 9:4 (2016)

September 2016

Article link:

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=248&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



Calogênese *in vitro* a partir de folhas de *Cedrela fissilis*

In vitro callogenesis from *cedrela fissilis* leaves

A. P. Menezes¹, J. C. C. Almeida¹, R. A. Mergener¹, T. Gerber², A. H. Schneeberger¹

Universidade do Oeste de Santa Catarina
Faculdade de Concórdia

Author for correspondence: rafael.mergener@unoesc.edu.br

Resumo. A *Cedrela fissilis* é uma espécie nativa do Brasil, pertencente à família Meliaceae de grande valor econômico por apresentar madeira de alta qualidade, bem como, importância medicinal, por conter propriedades terapêuticas. Foram utilizadas sementes para estabelecimento *in vitro*, as quais foram submetidas a quatro tratamentos assépticos que variaram em relação ao tempo de imersão em hipoclorito de sódio 2.5%. As sementes foram inoculadas em meio de cultura Vacin&Went (V&W), suplementado com sacarose 20g/L e ágar 7g/L, pH ajustado em 5.8. Aos 56 dias de cultivo, foram retiradas folhas das plântulas obtidas *in vitro* e inoculadas em meio de cultura V&W com diferentes combinações de reguladores de crescimento para indução de calos, sendo T1 sem reguladores de crescimento; T2: 2,5 µM ANA e 2,5 µM BAP; T3: 2,5µM ANA e 5,0µM BAP; T4: 5,0µM ANA e 2,5µM BAP. O percentual de sementes germinadas foi de aproximadamente 10% e o tratamento asséptico que apresentou menor percentual de contaminação (78%), diferindo dos demais tratamentos foi o tratamento 4, aonde as sementes permaneceram imersas durante 100 minutos em hipoclorito de sódio 2,5%. Em relação à calogênese, o tratamento com combinações de 2,5 µM ANA e 2,5 µM BAP, mostrou-se o mais eficiente para a indução de calos, diferindo dos demais tratamentos, com 84%, aos 56 dias de cultivo. O tratamento 1, com ausência de reguladores de crescimento, foi o único a apresentar 26% de rizogênese.

Palavras-chaves: Cedro rosa, Calos, Semente.

Abstract. The *Cedrela fissilis* is a species native to Brazil which offers great economic value for its high quality wood as well as medicinal importance by contain therapeutic properties. Seeds were used for *in vitro* establishment which form submitted to four aseptic treatments that varied in relation to the time of immersion in 2.5% sodium hypochlorite. The seeds were inoculated in the culture medium Vacin & Went, supplemented with sucrose 20 g/L and 7 g/L agar. To 56 days of cultivation were removed leaves of seedlings obtained *in vitro* and inoculated in Vacin&Went culture medium with different combinations of growth regulators for callus induction being T1 (control); T2: 2,5 µM ANA e 2,5 µM BAP; T3: 2,5 µM ANA e 5,0 µM BAP; T4: 5,0 µM ANA e 2,5 µM BAP. The percentage of germinated seeds was approximately 10% and the aseptic treatment showed lower percentage of contamination (78%) differed from other treatments was T4 where the seeds remained submerged during 100 minutes in 2.5% sodium hypochlorite. About the calogênese treatment with combinations of 2,5 µM ANA and 2,5 µM BAP proved to be the most efficient for callus induction, differing from the others reaching 84% calogênicos of percentage 56 days of *in vitro* cultivation. T1 with absence of growth regulators was the only one to present the formation of roots 26%.

Keywords. Cedro rosa, Callus, Seeds.

Introdução

A *Cedrela fissilis* é uma espécie comumente encontrada no interior das florestas primárias, dispersando-se praticamente por todas as florestas dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, tendo como habitat a floresta

Estacional Decidual e Semi Decidual. Sua floração ocorre de setembro a dezembro e os frutos amadurecem após a queda das folhas, entre julho e agosto, dispersando suas sementes imediatamente após a mudança da coloração dos frutos. Possui porte de 25 a 30 metros de altura, com tronco

cilíndrico longo e levemente tortuoso, de madeira durável, apresentando um grande valor ecológico, econômico e farmacológico (REITZ, 1984). Na farmacologia a *C. fissilis* apresenta-se relevante (NUNES, 2000), pois segundo Laudano (2005), testes realizados *in vitro* a partir da indução de calos desta espécie, foram obtidos compostos como o linalol e limonóides de triterpenos (ANBROZIN *et al.*, 2006). A indução de calos de *C. fissilis* foi descrito por Gerber (2013), a partir da utilização de folhas de plântulas cultivadas *in vitro* em meio de cultura suplementado com BAP e ANA, aonde obteve uma taxa de calogênese de 100%. Resultados positivos também foram descritos por Laudano (2005), que utilizou segmentos nodais e ápices cotiledonares de plântulas de *C. fissilis* cultivadas *in vitro* em meio suplementado com ANA e BAP.

Material e métodos

Foram utilizadas como material vegetal para o estabelecimento *in vitro* de *C. fissilis*, sementes provenientes do horto florestal da cidade de Ijuí/RS. Inicialmente as sementes foram submetidas a um processo de lavagem em água corrente com detergente neutro e enxaguadas por 4 vezes. Em seguida, foram imersas em hipoclorito de sódio (2,5% cloro ativo), para desinfestação durante 25 minutos (T1); 50 minutos (T2); 75 minutos (T3) e 100 minutos (T4). Após a desinfestação, as sementes foram enxaguadas por 4 vezes com água destilada deionizada autoclavada e inoculadas em meio de cultura VW, com pH ajustado em 5,8, suplementado com 20g/L de sacarose e 7g/L ágar. Cada tratamento foi composto por 20 repetições e 6 subrepetições. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob foto período de 16 horas ($22 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Avaliou-se aos 14 dias de cultivo *in vitro* o percentual de contaminação das sementes. A partir das plântulas obtidas *in vitro* (8 semanas), foram retiradas as folhas e estas submetidas a 4 tratamentos com 15 repetições. Os tratamentos foram constituídos por T1 (controle); T2 (2,5mg/L de BAP e 2,5 mg/L de ANA); T3 (2,5 mg/L de BAP e 5,0 mg/L de ANA) e T4 (5,0 mg/L de BAP e 2,5 mg/L de ANA). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, onde permaneceram por 60 dias em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ na ausência de luz. As variáveis avaliadas foram porcentagem contaminação por microorganismos e calogênese. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos, submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Em relação aos métodos diferenciais de assepsia foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), entre os tratamentos assépticos estudados (Tabela 1). O tratamento 4, aonde as sementes permaneceram durante 100 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%) apresentou 78 % de contaminação,

superando os demais tratamentos, conforme tabela 1.

Tabela 1: Percentuais de sementes contaminadas de *Cedrela fissilis* submetidas a diferentes tratamentos assépticos, aos 14 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Contaminação (%)
T1	100 a
T2	99 a
T3	98 a
T4	78 b

Os resultados obtidos no presente estudo, diferem de Nunes (2000), que não obteve contaminação utilizando hipoclorito de sódio 2,5%, durante 75 minutos de imersão das sementes com este reagente, da mesma forma, Amaral (2006), que obteve percentual de contaminação de 7%, utilizando a concentração de hipoclorito de sódio 2%. Estas diferenças entre os percentuais de contaminação, segundo Nunes (2000), dependem da procedência da semente, do ambiente, do período, da forma de coleta, do beneficiamento e armazenamento das sementes. Além disso, Teixeira *et al.*, (1997), relatam que o alto índice de contaminação em sementes, pode estar associado à presença de endópatógenos que tornam a desinfestação ineficientes por não atingirem os tecidos mais internos da semente.

A suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento apresentou diferenças significativas, em relação ao número médio de calos obtidos aos 56 dias de cultivo *in vitro*. O destaque ficou por conta do tratamento 2 (2,5 μM ANA e 2,5 μM BAP) que obteve 84% de calogênese (Tabela 2). Isso significa que, pode existir um estímulo da calogênese quando utiliza-se pequenas doses de fitorreguladores, da mesma forma como descrito por Krikorian *et al.*, (1991), e uma inibição quando utilizado doses elevadas de fitorreguladores, como relatado por Stoyanova *et al.*, (2004).

Tabela 2: Percentuais de calogênese de folhas de *Cedrela fissilis* submetidas a diferentes suplementações de reguladores de crescimento, aos 56 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Calogênese (%)
T1	55 b
T2	84 a
T3	25 c
T4	55 b

Os resultados apresentados neste trabalho diferem dos dados obtidos por Gerber (2013), que trabalhou com *C. fissilis*, utilizando concentrações

de BAP 2,5 μM e ANA 5,0 μM , obtendo 74% de calogênese, a partir de explantes foliares. Cabe ressaltar que, Gerber (2013), utilizou outro meio de cultura denominado *Murashige&Skoog* o qual apresenta como característica principal, maior concentração de sais que o meio Vacin&Went utilizado no presente estudo. Calos obtidos por Nunes *et al.* (2003), a partir de segmentos nodais cotiledonares de plântulas de *Cedrela fissilis* tiveram resultados significativos, alcançando 100% de calogênese em tratamentos contendo reguladores de crescimento nas concentrações de 2,5 μM de BAP e 2,5 μM de ANA. O uso de segmentos nodais como explantes, pode justificar o fato de Nunes *et al.*, (2003), apresentarem resultados positivos.

Em relação à rizogênese, apenas o tratamento T1, com ausência de reguladores de crescimento, apresentou 26% de raízes. É provável que, a rizogênese tenha ocorrido apenas no tratamento 1, devido ao balanço endógeno de hormônios, em virtude do acúmulo de auxinas endógenas, provenientes das folhas jovens serem elevados (WAREING; PHILLIPS, 1981). A adição de citocininas ao meio pode ter provocado à inibição da rizogênese (TAIZ e ZIEGER, 2006), por alterar o balanço endógeno nas folhas jovens dos demais tratamentos. Em segmentos nodais cotiledonares, Pilatti (2011), utilizando BAP e ANA nas concentrações de 2,5 μM e 5,0 μM , obtiveram a formação de raízes. Gerber (2013), obteve rizogênese em todas as combinações de BAP e ANA, pois segundo a autora, os reguladores de crescimento atuaram de forma diferenciada, devido a variação de sacarose induzir alterações endógenas no balanço de auxinas e citocininas, que em combinação com todas as concentrações exógenas fornecidas, atingiu o nível ótimo para a proliferação de raízes.

Conclusões

A imersão de sementes durante 100 minutos em hipoclorito de sódio 2,5% foi o tratamento mais eficiente para descontaminação das sementes proporcionando percentuais de germinação *in vitro* de 10% para *Cedrela fissilis*.

A utilização do meio de cultura V&W, suplementado com 2,5 μM ANA e 2,5 μM BAP proporcionou boas condições para calogênese *in vitro*, mas não para a formação de raízes.

Referências

AMARAL, V.F.M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela odorata***. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, p.39-49, 2006.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. HEBLING, M. J. A.; BACCI JÚNIOR, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticida

lactivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 542-547, 2006.

GERBER, T. **Perfis metabólicos de Calos De *Cedrela Fissilis* Vell. (Meliaceae) Cultivados In Vitro**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 07-144, 2013.

KRIKORIAN, A.D. Meios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77

LAUDANO, W. S. **Cultura de calos e criopreservação de sementes de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, p. 54-130, Florianópolis, SC, 2005.

NUNES, E. C. **Sistemas de cultura e conservação *in vitro* para *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2000.

NUNES, E. C.; BENSON, E. E.; OLTRAMARI, A. C.; ARAUJO, P. S.; MOSER, J. R. and VIANA, A.M. In vitro conservation of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), a native tree of the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity and Conservation**, v. 12. p. 837-848, 2003.

PILATTI, F. K. **Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae)**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, p.58-59, Florianópolis, 2011.

REITZ, R. KLEIN, R. M. REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1984.

STOYNOVA, B.E. *et al.* Cell division and cell expansion in cotyledons of *Arabidopsis* seedlings. **New Physiologist**, v.162, p.471, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954p

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. Influência de *Colletotrichum gossypii* South no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. **Revista Brasileira de Sementes, Brasília**, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1997.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1981. 343p.

