

CALOGÊNESE E REGENERAÇÃO IN VITRO DE BROTO A PARTIR DE RAIZ, ENTRENÓ E DISCO FOLIAR DE *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉC. (MORACEAE)

CALLOGENESIS AND REGENERATION IN VITRO OF SPROUTS FROM THE ROOT, INTERNODE AND LEAF DISC OF *BROSIMUM GAUDICHAUDII* TRÉC. (MORACEAE)

Douglas Ruan Cambraia de Alencar.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-UnB, Departamento de Botânica, Campus Universitário Darcy Ribeiro. CEP 70910-900 Brasília, DF, Brasil.

Contato: douglas_cambraia@hotmail.com

RESUMO: *Brosimum gaudichaudii* Tréc., conhecida popularmente como mamacadela, tem se mostrado uma espécie do Cerrado brasileiro de importante relevância para a área medicinal, visto que suas raízes possuem elevadas concentrações de bergapteno e psoraleno que são princípios ativos utilizados para a confecção de medicamentos para o tratamento de doenças cutâneas como o vitiligo e a psoríase o que tem provocado uma aceleração no processo de extração da espécie. Neste trabalho, testou-se o potencial organogenético de entrenó, disco foliar e raiz através de 12 combinações de tratamentos, envolvendo os fitorreguladores 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) diluído à metade, acrescentado de 6,5 g de ágar e 20 g.L⁻¹ de sacarose. Tendo-se como um dos principais objetivos o desenvolvimento de um protocolo de desinfestação para a raiz, sendo que o de maior sucesso foi a imersão destes explantes em hipoclorito de sódio por 2 horas. Conseguindo, desta maneira, induzir calos e brotamentos nestes segmentos desinfestados e calos em grande parte dos entrenós. No entanto, os tratamentos testados não foram capazes induzir calos em discos foliares. Com base nos experimentos

realizados, novos experimentos estão sendo realizados visando resultados estatisticamente significativos de indução de calogênese e brotamento em segmentos de raízes e ainda, regeneração dos calos obtidos para auxiliar na conservação da espécie.

Palavras-chave: regeneração *in vitro*, *Brosimum gaudichaudii*, calogênese, ANA, BAP.

ABSTRACT: *Brosimum gaudichaudii* TREC., Popularly known as mamacadela, has proven to be a species of the Brazilian Cerrado OF important relevance to the medical area, SINCE its roots have high concentrations of psoralen bergapten and active ingredients which are used for the manufacture of medicaments for the treatment of skin diseases such as psoriasis and vitiligo which has caused acceleration in the species extraction process. In this study, we tested the internode's organogenic potential, root and leaf disc via 12 combinations of treatments involving the growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA), in MS medium (Murashige & Skoog, 1962) diluted in half, added 6.5 g of agar and 20 g L⁻¹ sucrose. Having as a main goal to develop a disinfection protocol for the root, and the most successful was the immersion of these explants in sodium hypochlorite for 2 hours. Thus, it was possible to induce calluses and disinfected buds in these segments and calluses largely of internodes. However, the treatments were not able to induce calluses on leaf discs. Based on experiments, new experiments are being conducted to statistically significant results callogenesis induction and sprouting in root segments and also regeneration of the calluses obtained to assist in the conservation of the species.

Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro (Ribeiro & Walter, 1998), possuindo uma vasta extensão compreendendo cerca de 24% de todo território nacional, entretanto é um dos biomas mais seriamente devastados (Ratter et al., 1997), visto que está sendo convertido ao uso da agricultura moderna. Ele abriga uma grande biodiversidade em que possuiu uma riquíssima flora com cerca de 1000 espécies de árvore, 300 espécies de ervas ou arbustos e quase 500 trepadeiras (Mendonça et al., 1998).

Brosimum gaudichaudii Tréc., popularmente conhecida como mamacadela, pertence à família Moraceae, sendo a única espécie deste gênero presente no Cerrado (Almeida et al., 1998). Seu sistema radicular é composto por raiz pivotante profunda, com emissão de raízes secundárias (Palhares & Silveira, 2007), podendo possuir mais

de uma raiz pivotante (Scholz et al., 2002) e o xilopódio é capaz de promover uma regeneração natural da parte área da planta caso haja queimadas ou poda drástica (Ribeiro et al., 1985). A madeira da raiz apresenta mais parênquima e fibras com paredes mais finas quando comparado com a madeira do caule (Palhares et al., 2007 a-b).

O fruto de *Brosimum gaudichaudii* é comestível, entretanto a espécie é mais utilizada na medicina tradicional como depurativo e diurético (Barros, 1981). Indústrias farmacêuticas empregam-na para produção de medicamentos, pois suas raízes contêm concentrações elevadas de bergapteno e psoraleno (Pozetti, 1969), cuja ação é muito eficiente para o tratamento de doenças cutâneas como vitiligo, psoríase, entre outras (Auad, 1973). O que vem se tornando um problema é que tem sido realizado um extrativismo exacerbado tanto por indústrias quanto por comunidades da região reduzindo bruscamente a espécie na natureza podendo levá-la a extinção.

A produção de mudas a partir de sementes que tem alta germinabilidade, porém são recalcitrantes, impedindo a conservação do germoplasma (Wetzel, 1997), e ainda possuem uma curta longevidade e elevado grau de contaminação endógena. Entretanto tem-se mostrado melhor do que estudos anteriores, pois se conseguiu um eficiente protocolo de desinfestação para trabalhar com explantes desinfectados.

A regeneração *in vitro* é uma alternativa de propagação que ainda não foi testada para espécie, sendo portanto o grande objetivo do trabalho. A técnica está baseada na totipotência vegetal para a formação de plantas inteiras a partir de órgãos não usuais, como entrenós, discos foliares e raiz (Lowe, 1996). Os fatores que determinam a regeneração de explantes são a composição do meio de cultura e os reguladores de crescimento (Moraes Fernandes, 1990). Os reguladores são substâncias orgânicas que agem sobre o crescimento e a organogênese, dos quais os principais grupos são as auxinas e as citocinas (Taiz e Zeiger, 2002). Pode-se induzir a regeneração via embriogênese somática ou organogênese de gemas adventícias, produzidas diretamente das células dos explante ou indiretamente, através da indução inicial de calos que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células com um certo grau de diferenciação (Grattapaglia & Machado, 1998). A formação de calos é vista como muito importante pois é uma fonte potencial de propagação e ainda é fonte de moléculas bioativas da planta.

Dentre os fitorreguladores utilizados na regeneração *in vitro* tem se mostrado bastante eficaz as citocinas 6-Benzilaminopurina (BAP) – multiplicação em diversas

espécies – e Thidiazuron (TDZ) – regulador da morfogênese da planta e a auxina Ácido Naftaleno (ANA) – alongamento celular (Taiz e Zeiger, 2004).

Com a expansão da agricultura, esta e muitas outras espécies vegetais de uso medicinal vem desaparecendo, desta maneira este trabalho tem por objetivo verificar o potencial calogênico e organogênico de entrenó, disco foliar e raiz para a conservação e a produção de mudas da espécie.

Materiais e Métodos

Coleta do material vegetal. Sementes de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. coletadas em condições normais, no mês de setembro, de indivíduos saudáveis.

Obtenção dos explantes. As sementes foram postas para germinar em copos descartáveis com vermiculita e perfurados na base. Mantidos úmidos e sob um fotoperíodo de 12 horas, crescendo neste ambiente até tornarem indivíduos jovens.

Desinfecção. A parte aérea dos indivíduos jovens, oriundos da germinação das sementes foram cortados e submetidos, separadamente, a desinfecção em álcool etílico a 70% por um minuto, imersos por 15 min em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) com 2 a 2,5% p/p de cloro ativo (6g.L^{-1}). Posteriormente, foram feitos três enxágües de um minuto cada em água destilada, deionizada e autoclavada. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar.

A raiz dos indivíduos jovens, também oriundos das sementes foram cortados e submetidos, separadamente, a desinfecção em álcool etílico a 70% por um minuto, imersos por 2 horas em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial). Posteriormente, foram feitos três enxágües de um minuto cada em água destilada, deionizada e autoclavada. Todo o processo, assim como no da parte área, foi realizado em câmara de fluxo de laminar.

Estabelecimento das culturas às condições in vitro e ex vitro. Os segmentos de entrenó, seccionados para medirem 1 cm de comprimento, foram inoculados horizontalmente, enquanto os explantes de folha, seccionados para formar um quadrado de 1 cm de lado, preservando sempre a nervura central, foram inoculados com a porção abaxial em contato com o meio de cultura. Ambos os explantes foram inoculados em placas de Petri de 10 cm de diâmetro em meios de cultura diferentes.

Os entrenós foram colocados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), no qual foram testados diferentes combinações dos hormônios ANA e TDZ de acordo com a literatura concernente, cada combinação contendo cinco explantes por placa de petri,

sendo uma placa com luz e outra na ausência de luz por sete dias. Foi adicionado $8,0\text{g.L}^{-1}$ de ágar e 20g.L^{-1} de sacarose. Além desse tratamento, testou-se entrenós e discos foliares em meio MS diluído à metade, com $7,0\text{g.L}^{-1}$ de ágar e 20g.L^{-1} de sacarose, associado à um fatorial com os reguladores de crescimento ANA e BAP com três placas por tratamento (quatro discos foliares e entrenós por placa) e uma delas permaneceu sem luz por 15 dias. O pH foi ajustado a 5,7-5,8.

As raízes foram colocados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), combinados com concentrações de AIB e BAP 10mg.L^{-1} (5ml), de cinetina $0,01\text{mg.L}^{-1}$, adicionados a 7g.L^{-1} de ágar, 20g.L^{-1} de sacarose e 20 microlitros de extrato de *Brosimum gaudichaudii*.

Resultados

Desinfestação. Foram feitos tratamentos em diferentes tempos de imersão em hipoclorito de cálcio 65%. A imersão a 15 min permitiu a obtenção de 75% (tabela 1) dos entrenós e 93% dos discos foliares livres de contaminação (tabela 2). A imersão em hipoclorito de sódio de raiz a 2 horas teve um resultado significativo com obtenção de 67% já que anteriormente resultou 100% em contaminação ou morte dos explantes.

Tabela 1. Percentagem de contaminação de entrenós dos clones utilizados de *Brosimum gaudichaudii* em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio.

Tempo (min.)	Entrenós Contaminados (%)									
	Clone 4	Clone 6	Clone 10	Clone 11	Clone 12	Clone 13	Clone 14	Clone 15	Clone 16	Total de Entrenós(%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	0	0	17	0	20	13	25	0	0	25
30	0	0	1	0	0	2	4	0	0	7
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2. Percentagem de contaminação de discos foliares de *B. gaudichaudii*, em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio.

Tempo (min.)	Entrenós Contaminados (%)									
-----------------	---------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	Clone 4	Clone 6	Clone 10	Clone 11	Clone 12	Clone 13	Clone 14	Clone 15	Clone 16	Total de Entrenós(%)
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	0	0	0	0	0	7	0	0	0	7
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 3. Percentagem de contaminação de raízes e *B. gaudichaudii* em função dos tempos de imersão em hipoclorito de sódio

Tempo (min.)	Entrenós Contaminados (%)									Total de Entrenós (%)
	Clone 5	Clone 6	Clone 7	Clone 10	Clone 11	Clone 12	Clone 13	Clone 14	Clone 15	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	100	100	0	0	0	0	0	0	0	100
60	66	0	100	0	0	0	0	0	0	83
120	0	0	50	33	33	0	0	0	0	33

Após o quinto dia de cultura, observou-se a formação e o crescimento de calos nos tratamentos nas concentrações de BAP/ANA mg.L⁻¹ em entrenós e em raízes, porém muitas raízes contaminavam depois do primeiro mês. Um explante mostrou-se bastante interessante por apresentar, além de calos, brotamento, este foi colocado em um meio de cultura com a concentração de extrato de 20µL e com 0,01g.L⁻¹ de cinetina.

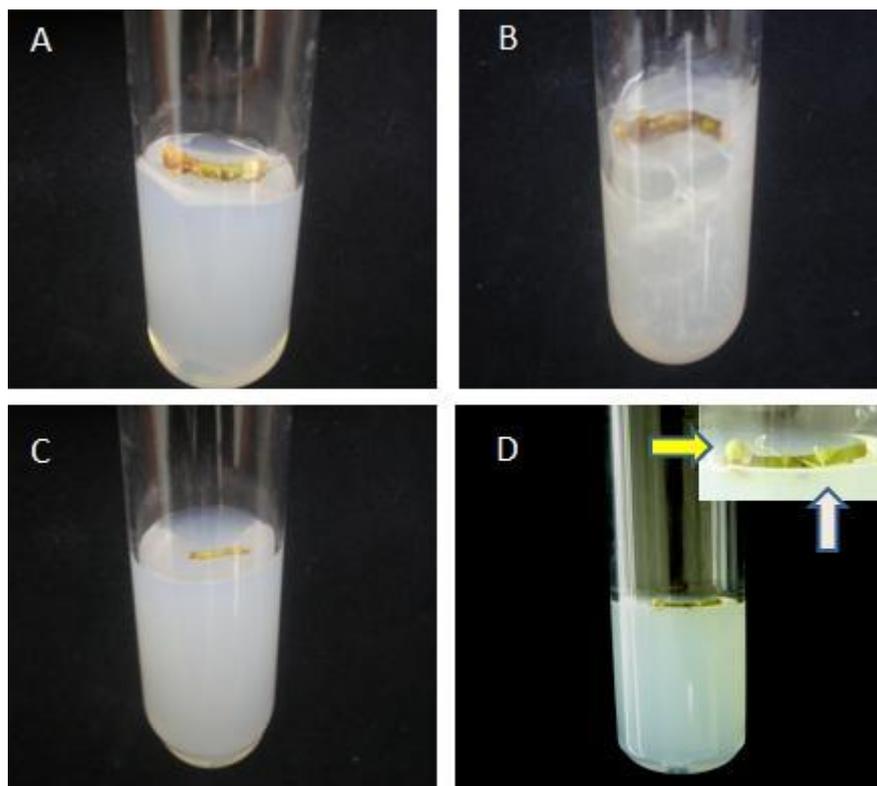


Figura 1. Calogênese em raiz de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. A) Explante desinfetado em hipoclorito de sódio por 2 horas (clone 10), evidenciando desenvolvimento de calos. B) Explante submetido à tratamento de 1 hora em hipoclorito de sódio (Clone 07), demonstrando tecido contaminado e morto. C) Explante desinfetado em hipoclorito de sódio por 2 horas (clone 11), evidenciando ausência de calogênese. D) Explante desinfetado em hipoclorito de sódio por 2 horas (clone 07), evidenciando desenvolvimento de calos (seta em amarelo) e brotação (seta em branco).

Discussão

A indução da rota embriogenética ou organogenética é influenciada e determinada pelo tipo de explante, genótipo, condições de cultivo, meio de cultura e fitorreguladores (Hou & Jia, 2004), percebe-se que o ANA exerce mais influência na proliferação dos calos.

As diferenças observadas na proliferação dos calos ocorrem porque os explantes podem variar em sua sensibilidade para os fitorreguladores ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios ou a interações entre eles (Karp, 1995). Provavelmente a redução da concentração na subcultura sucessiva possa estimular a formação de gemas ou embriões, uma vez que os calos não se diferenciaram.

O resultado obtido após desinfestar e inocular a raiz em tubo com extrato de *Brosimum gaudichaudii* e cinetina, mostra-se muito bom, visto que conseguiu-se induzir brotamento do mesmo. Espera-se realizar mais experimentos bem sucedidos para poder ter um resultado estatisticamente significativo.

Agradecimentos

À professora orientadora, Eneida Conceição dos Santos Silveira.

Aos alunos Matheus Paiva Silva e Mayara Rodrigues Lima.

Ao técnico do laboratório Fábio Nakamuro; e a FINATEC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, S. P.; Proença, C. P. B.; Sano S. M.; Ribeiro, J. F. 1998. Cerrado: Espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa – CPAC. p.81-84.
2. Ammirato, P. G. V. 1993. Embryogenesis, in: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. G. V.; Yamada, Y. Handbook of plant cell culture. New York: MacMilan Publisher Company, v.1, 123p.
3. Auad, A. 1973. Diagnose e terapêutica do vitiligo. Atualidades Médicas. v.9, n.9, p.85-88.
4. Barros, M. A. G. e. 1981. Plantas Medicinais: Usos e Tradições em Brasília - DF. VII Simpósio de Plantas Medicinais. Oreades. v.8, n. 14/15, p.140-151.
5. Bucher, J. 2002. Aspectos de conservação *in vitro* e Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii*. Dissertação de Mestrado em Botânica. UnB. Brasília - DF.
6. Dutta Gupta, S.; Ahmed, R.; De, D.N. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. Plant Cell Report, v.16, p.628-31, 1997
7. Fidelis, I., 1998. Micropropagação de mamacadela (*Brosimum gaudichaudii*), uma espécie medicinal. Dissertação de mestrado em Agronomia, UFL. Lavras - MG.
8. Flores, R.; Nicoloso, F.T; Vasconcellos, N.J.S. 2006. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.89-95.
9. Grattapaglia, D. & Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. TORRES, A.; CALDAS, S.; BUSO, J. A. EMBRAPA- SPI/ EMBRAPA – CNPH. . v 1. Brasília. p.183-260.

10. Hou, S.W.; Jia, J.F. 2004. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.79, p.95--100.
11. Lowe, K. C.; Darey, M. R.; Dower, J.B. 1996. Plant tissue culture: past, present and future. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* v. 2, p.175-186.
12. Martins, M. 1998. Micropropagação de mamacadela (*Brosimum gaudichaudii*), uma espécie medicinal do Cerrado. Dissertação de Mestrado, UnB. Brasília - DF.
13. Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva, M. C.; Rezende, A. R.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. 1998. Flora vascular do Cerrado. In: Cerrado ambiente e flora. Sano, S. M. & Almeida, S. P. EMBRAPA – CPAC. Planaltina – DF. p.286-556.
14. Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue. *Physiol. Plant.* v.15, p. 473-497.
15. Myers, N. R.; Mittermeir, R. A.; Mittermeir, C. G.; Fonseca, G. A. B. Kent, J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priority. *Nature* v. 403, p. 853-858.
16. Nicolau, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E. J. 1994. Total synthesis of taxol. *Nature*, v.367, p.630-634.
17. Palhares, D.; Paula, J. E. de; Silveira, C. E. S. 2006. Morphology of stem and subterranean system of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). *Acta Botânica Hungarica*, v.48, n. 1-2, p.89-101.
18. Palhares, D. & Silveira, C. E. S. 2007. Aspectos morfológicos de plantas jovens de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae) produzidas em condições alternativas de cultivo. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu.* 9, p.93-96.
19. Palhares, D.; Paula, J. E. de; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. S. 2007a. Comparative wood anatomy of stem, root and xylopodium of *Brosimum gaudichaudii* (Moraceae). *IAWA Journal*, v. 28 (1), p.83-94.
20. Palhares, D.; Paula, J. E. de; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. S. 2007b. Comparative anatomy of the bark of stems, roots and xylopodia of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). *IAWA Journal*, v. 28 (3), p.315-324.

21. Paviane, T. I. 1987. Anatomia do desenvolvimento do xilopódio de *Brasília sckii* G. M. Barroso. Estágio inicial. *Ci e Cut* 39, p.399-405.
22. Pozetti, G. 1969. Contribuição ao estudo químico do *Brosimum gaudichaudii* Trécul. - Isolamento e identificação de bergapteno e do psoraleno das raízes. *Rev. da Fac. de Farm. e Odont. de Araraquara* 3, p.215-223.
23. Proença, C.; Oliveira, R. S.; Silva, A. P. 2000. Flores e frutos do Cerrado. UnB Imprensa Oficial do Estado, São Paulo.
24. Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F. ; Bridgewater, S. 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*. v.80, p.223-230.
25. Ribeiro, J.; Silva, J.; Batmanian, G. 1985. Fitossociologia de tipos fisionômicos de cerrado em Planaltina. *Revista brasileira de botânica*. v.8, p.131-142.
26. Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do cerrado. In: Cerrado ambiente e flora. Sano, S. M. & Almeida, S. P. EMBRAPA – CPAC. Planaltina – DF
27. Sales, D.; Albuquerque, M.; Coelho, M; Pimenta, S.; Favalessa, O. 2002. Germinação de sementes de *Brosimum gaudichaudii* Trécul submetidas a diferentes pré-tratamentos. *Acta horticulturae* n. 569, p137-140.
28. Scholz, F.; Bucci, S.; Goldstein, G.; Meinzer, F.; Franco, A. 2002. Hydraulic redistribution of soil water by neotropical savanna trees. *Tree Physiology* v.22, p.603-612.
29. Wetzell, M. M. V. da S. 1997. Época de dispersão e fisiologia de sementes do Cerrado. Tese do departamento de Ecologia, UnB. Brasília.
30. Moraes Fernandes, M. I. B. de. 1990. Obtenção de plantas haplóides através da cultura de anteras. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. (eds). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA/CNPH. p.311-32.
31. Karp, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. 1995. *Euphytica*, v.85, p.295-302.
32. Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. *Fisiologia Vegetal*.. 3ªed.Artmed. Porto Alegre.p. 450 e 517.

33. Brum, G. R.; Silva, A. B. da; Pasqual, M. 2002. Efeito de Diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). Ciênc. agrotec., Lavras. Edição Especial, p.1403-1409.
34. Lu, C.Y. 1993. The use of Thidiazuron in tissue culture. Vitro cell development biology. v9, n2 p.92-96
35. Jones, M. P. A.; Yi, Z. Murch, P. K. S. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L. : Micropropagation in solid and liquid culture systems. Plant Cell Rep. 26:13-19.
36. Te-chato, S.; Lim, M. Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro* derived leaf explants. Sci. Hort. 86: 291–298; 2000.