

## MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE NIM A PARTIR DE EXPLANTES COTILEDONARES<sup>1</sup>

Marcelo Rodrigues<sup>2</sup>, Renato Paiva<sup>3</sup>, Rairys Cravo Nogueira<sup>4</sup>, Cristiano Martinotto<sup>5</sup> e Jessé Marques Silva Júnior<sup>6</sup>

**RESUMO** – *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecido como nim, é uma espécie arbórea que se destaca por possuir substâncias de ação inseticida, fungicida, bactericida e nematicida. Sementes de nim foram inoculadas em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) contendo diferentes concentrações de ácido giberélico ( $GA_3$ ) (0; 3,0; 6,0; 9,0; e 12,0 mg L<sup>-1</sup>). Após 30 dias, cotilédones obtidos a partir de plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio WPM suplementado com ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) e, ou, 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 mg L<sup>-1</sup>). As culturas foram incubadas no escuro, a 28 °C. Os calos formados foram avaliados com base na sua coloração e textura, e três subcultivos foram realizados mensalmente em meio WPM contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP, na presença de luz. A cada 30 dias, avaliou-se o número de brotos formados a partir dos calos subcultivados. Entre os meios testados, o mais apropriado para germinação *in vitro* de nim foi o WPM na ausência de  $GA_3$ . Explantes cotiledonares cultivados em WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveram a maior formação de calos com potencial morfogênico. Quando esses calos foram transferidos para meio de composição similar, obteve-se alta formação de brotações até o terceiro subcultivo.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, organogênese e BAP.

## *IN VITRO* MORPHOGENESIS OF NEEM FROM COTYLEDONARY-DERIVED EXPLANTS

**ABSTRACT** – *Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as neem, is a woody species widely used because of its insecticide, fungicide, bactericide, and nematocide properties. Seeds of neem were inoculated in WPM (Wood Plant Medium) containing different concentrations of gibberelic acid ( $GA_3$ ) (0, 3, 6, 9, and 12 mg L<sup>-1</sup>). After 30 days, cotyledons were inoculated in WPM supplemented with 0.0; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L<sup>-1</sup> acid 2,4-phenoxyacetic acid (2,4-D) and/or 0.0; 1.0; 2.0 and 3.0 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP). The cultures were kept in the dark at 28 °C. Differentiated calli were evaluated based on their coloration and texture, and three subcultures were carried out on a monthly basis in WPM medium with 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP, in the presence of light. Every 30 days, the number of differentiated shoot-buds was evaluated. WPM medium lacking  $GA_3$  promoted the highest *in vitro* seed germination indexes. Cotyledonary-derived explants cultured in WPM medium with 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP yielded calli with high morphogenic potential. When those calli were transferred to medium with similar composition, a high shoot formation was achieved up to the third subculture.

Keywords: *Azadirachta indica*, organogenesis and BAP.

<sup>1</sup> Recebido em 29.08.2007 e aceito para publicação em 26.01.2009.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

<sup>3</sup> Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. E-mail: <renpaiva@ufla.br>.

<sup>4</sup> Faculdade de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Pará (UFPA). E-mail: <rairys@yahoo.com.br>.

<sup>5</sup> Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG).

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia da UFLA



## 1. INTRODUÇÃO

*Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como nim, é uma espécie arbórea nativa da Índia, pertencente à família Meliaceae. Destaca-se por possuir substâncias de ação inseticida, fungicida, bactericida e nematocida (MARTINEZ, 1998). Segundo Schmutterer (1995), citado por Pletsch (1997), entre essas substâncias estão centenas de princípios ativos.

Dos compostos químicos presentes no nim com atividade biológica, o mais ativo é a azadirachtina, que, por possuir semelhança com o hormônio da ecdise dos insetos, atua alterando esse processo, podendo, inclusive, impedi-la (MARTINEZ, 1998). Apresenta, ainda, efeito repelente e intoxicante, afetando a biologia, a oviposição e a viabilidade dos ovos (NEVES e NOGUEIRA, 1996).

Vários são os mecanismos para a maximização da produção de compostos biologicamente ativos em plantas, destacando-se entre eles a micropropagação, por meio da seleção de clones altamente produtivos. A micropropagação oferece muitas vantagens para a prática agrícola, como maior rapidez na obtenção de grande número de mudas e a erradicação de pragas e doenças da cultura. Além disso, a clonagem *in vitro* é particularmente útil para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, propagação de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou de ciclo de vida longo. Também pode-se aplicar essa técnica em espécies vegetais produtoras de princípios ativos com grande potencial econômico a serem exploradas, como o nim. Desse modo, aplica-se a micropropagação para espécies leguminosas, frutíferas, florestais e ornamentais, de acordo com os objetivos desejados (KERBAUY, 1997).

Entre os inúmeros fatores que afetam o cultivo *in vitro* e a regeneração de plantas em condições controladas, sem dúvida são os reguladores de crescimento, tanto em seus aspectos qualitativos quanto quantitativos, que, por sua vez, merecem destaque. No caso da morfogênese *in vitro* em *Azadirachta indica*, brotações foram desenvolvidas a partir de explantes foliares e radiculares cultivados em meio MS com 8,8 mM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,57 mM de AIA (ácido indol 3-acético) (SALVI et al., 2001).

Tendo em vista a necessidade de buscar formas mais eficientes e seguras de propagação vegetativa do nim, possibilitando a exploração comercial de mudas, este trabalho teve como objetivo o estudo da morfogênese *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de nim, obtidas a partir de frutos verdes, foram submetidas à desinfestação em álcool 70%, durante 60 seg, e em hipoclorito de sódio (NaOCl) com 2,0% de cloro ativo, durante 10 min. Ao final dessa sequência, as sementes foram conduzidas para câmara de fluxo laminar para imersão em NaOCl durante 20 min, três lavagens em água destilada e autoclavada, passagem em solução 0,1% de fungicida Derosal® e, em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultivo previamente autoclavado a 120 °C, durante 20 min. O meio nutritivo utilizado foi WPM – Wood Plant Medium (LLOYD e McCOWN, 1981) contendo 1% de sacarose, pH = 5,8 e solidificado com 0,6% de ágar e suplementado com diferentes concentrações do regulador de crescimento ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0; 3,0; 6,0; 9,0; e 12 mg L<sup>-1</sup>).

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de fótons de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Aos 30 dias de cultivo, a porcentagem de sementes germinadas foi analisada.

Para a indução de calos, foram utilizados cotilédones obtidos de plântulas germinadas *in vitro* em meio WPM na ausência de regulador de crescimento e contendo 1% de sacarose.

Os cotilédones foram inoculados em meio de cultura WPM suplementado com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar e pH ajustado em 5,8. Totalizaram-se 16 tratamentos suplementados com os reguladores de crescimento ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) e, ou, 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 1). A autoclavagem do meio de cultivo foi realizada a 120 °C, durante 20 min. A incubação foi realizada no escuro, à temperatura de 27 ± 2 °C.

Aos 30 dias, avaliou-se a porcentagem da área do explante coberta por calos em cada tratamento, bem como a coloração e textura destes. Foram aplicadas notas de 0 a 3, referentes ao “score” (nota) de calos, em que 0 correspondia à ausência de calos, 1 e 2 à cobertura intermediária do explante e 3 a toda a superfície coberta. Do mesmo modo, foram dadas notas referentes à tonalidade (0 = escuros; 1 e 2 = mais claros; e 3 = calos brancos) e textura (0 = lisos; 1 e 2 = pouco granulados; e 3 = granulados).

**Tabela 1** – Concentrações de 2,4-D e BAP utilizadas em explantes de nim**Table 1** – Concentrations of 2,4-D and BAP used in neem explants

Tratamentos	2,4-D (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )
T0	0,0	0,0
T1	0,0	1,0
T2	0,0	2,0
T3	0,0	3,0
T4	1,0	0,0
T5	1,0	1,0
T6	1,0	2,0
T7	1,0	3,0
T8	2,0	0,0
T9	2,0	1,0
T10	2,0	2,0
T11	2,0	3,0
T12	3,0	0,0
T13	3,0	1,0
T14	3,0	2,0
T15	3,0	3,0

Após a avaliação de formação, coloração e textura dos calos, foram realizados três subcultivos, a cada 30 dias, em meio WPM contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 3% sacarose e solidificado com 0,6% de ágar. A incubação do primeiro subcultivo foi realizada no escuro, enquanto os demais subcultivos foram realizados em irradiância de fótons de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Em todos os subcultivos, avaliou-se o número de brotos formados na superfície dos calos.

Os dados do experimento de germinação foram analisados, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. As variáveis foram analisadas pelo teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade, pelo programa SISVAR®.

Os dados do experimento de calogênese foram analisados, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1977) a 5% de probabilidade, pelo programa SAS®.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na fase de germinação *in vitro*, verificou-se que, com o aumento da concentração de GA<sub>3</sub>, a taxa de germinação diminuiu. Assim, todas as concentrações utilizadas do regulador de crescimento inibiram o processo germinativo. A maior porcentagem de germinação foi apresentada no meio WPM na ausência de regulador

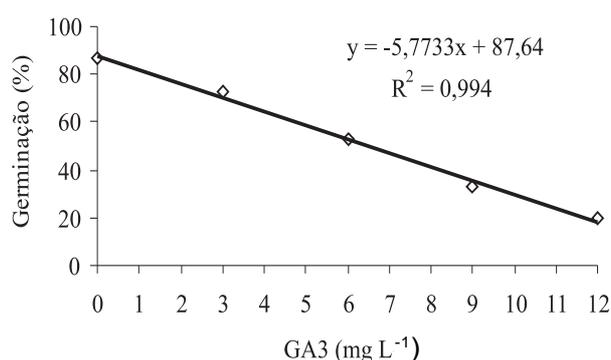
de crescimento, aproximadamente 90%. Na maior concentração de GA<sub>3</sub> utilizada, houve menor porcentagem de germinação, cerca de 20% (Figura 1).

Uma das explicações para esse fato seria o desbalanço hormonal causado pelo GA<sub>3</sub>. Provavelmente, as sementes de nim já possuíam concentração hormonal favorável para germinação e, portanto, com o aumento da aplicação de GA<sub>3</sub>, ele se tornou prejudicial às sementes.

Sousa et al. (2002) também verificaram que o ácido giberélico não influenciou a germinação de sementes dos porta-enxertos cítricos estudados. Já Scalón et al. (2006) observaram que a escarificação associada à embebição em 200 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> incrementou a emergência e o índice de velocidade de emergência em sementes de orelha-de-macaco (*Enterolobium contortisiliquum*).

Em *Didymopanax morototoni*, os reguladores de crescimento cinetina (KIN) e GA<sub>3</sub> estimularam a germinação das sementes na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> (FRANCO e FERREIRA, 2002).

Existem informações que evidenciam a ação benéfica da giberelina. Segundo Bewley e Black (1997), as giberelinas promovem a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos, auxiliando o alongamento embrionário e a protrusão da radícula. Além disso, podem atuar silenciando genes da dormência ou como agentes de quebra da dormência (KOORNNEEF et al., 2002).

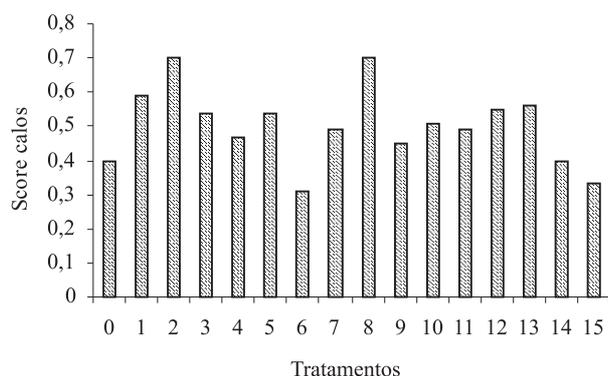
**Figura 1** – Porcentagem de germinação de sementes de nim (*Azadirachta indica* A.Juss), de acordo com o aumento da concentração de GA<sub>3</sub>.**Figure 1** – Percentage of germinated seeds of neem (*Azadirachta indica* A.Juss), according to GA<sub>3</sub> concentration increase.

Quanto à indução de calos, segundo o teste de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatística entre os tratamentos, no entanto a maior formação de calos ocorreu em meio constituído de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T2) e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (T8) (Figuras 2 e 3). Como o BAP é uma citocinina e o 2,4-D, uma auxina, nota-se que, isoladamente, diferentes classes de reguladores de crescimento podem induzir a formação de calos no mesmo explante, no entanto o tipo de calo proveniente de cada tratamento pode diferir quanto à competência embriogênica ou organogênica.

A combinação de auxina e citocinina pode desfavorecer a calogênese. Em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), os resultados demonstraram que a maior formação de calos ocorre em meio MS acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e que, ao testar a sua interação com BAP ou TDZ, não incrementou a calogênese (NOGUEIRA et al., 2007).

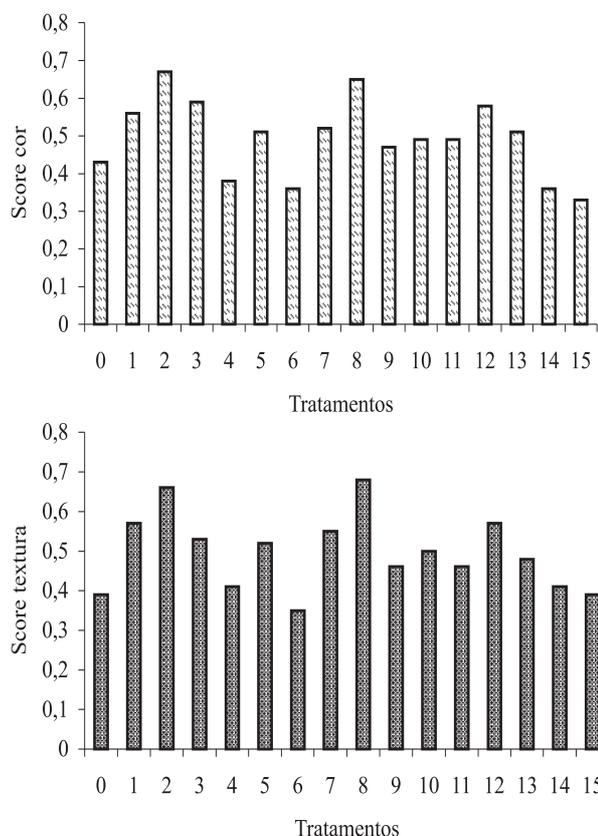
Já em mogno (*Swietenia macrophylla* King) segmentos de epicótilo foram inoculados em meio MS suplementado com combinações de BAP e ANA, e maior formação de calos ocorreu no tratamento composto por 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,25 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (BRUNETTA et al., 2006).

Quanto à coloração e textura dos calos, houve maior *score* também nos tratamentos T2 (2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e T8 (2,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), em que calos brancos prevaleceram, assim como o aspecto granular (Figura 3).



**Figura 2** – Score da formação de calos nos diferentes tratamentos contendo 2,4-D e, ou, BAP.

**Figure 2** – Callus formation score in the different treatments supplemented with 2,4-D and, or, BAP.



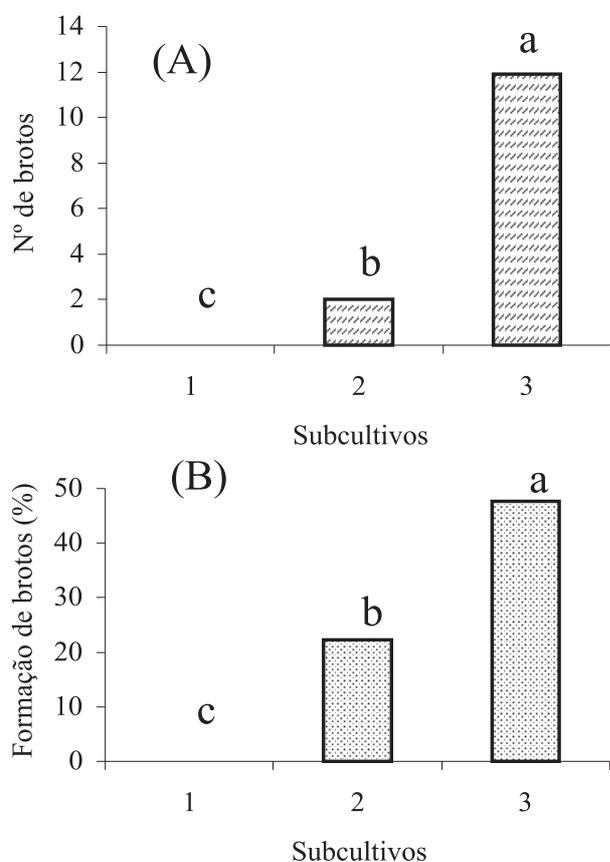
**Figura 3** – Coloração (A) e textura (B) dos calos nos diferentes tratamentos contendo 2,4-D e BAP.

**Figure 3** – Color (A) and texture (B) of the calli in the different treatments supplemented with 2,4-D and BAP.

Os parâmetros coloração e a textura de calos têm sido utilizados com indicativos de material vegetal com capacidade regenerativa. Figueiredo (2007), em calos de *Passiflora gibertii*, observou que calos de coloração clara e aspecto granular possuíam maior potencial morfofogenético.

A formação de brotos a partir do segundo e terceiro subcultivos é de, em média, 3 e 11 propágulos, respectivamente (Figura 4A), diferindo estatisticamente entre si. Quanto ao incremento de brotos na presença de luz, este foi superior a 20% de um subcultivo para outro (Figura 4B).

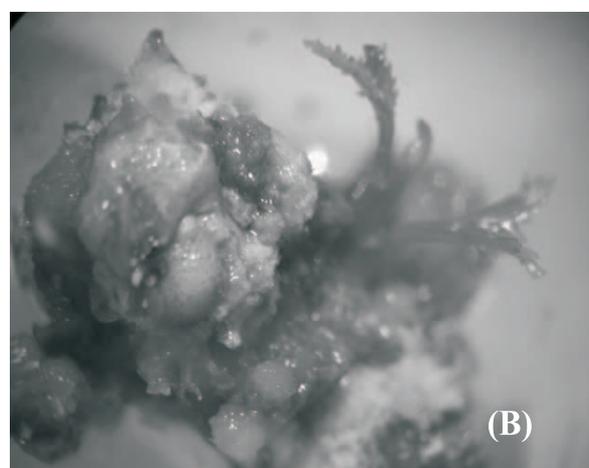
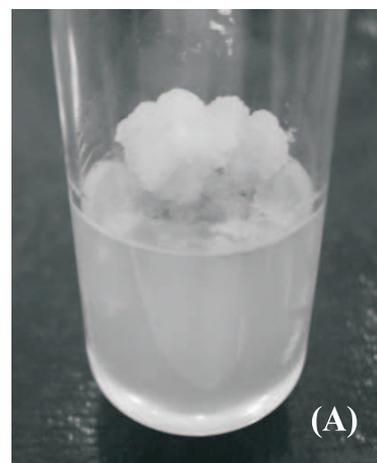
Essa formação pode ser atribuída à transferência dos calos da condição de escuro do primeiro subcultivo para a luz, uma vez que a luz atua na morfofênese vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004).



**Figura 4** – Número de brotos (A) e porcentagem de formação de calos (B) nos diferentes tratamentos contendo 2,4-D e BAP.

**Figure 4** – Number of shoots (A) and percentage of callus formation (B) in the different treatments supplemented with 2,4-D and BAP.

Alves et al. (2004), ao estudarem a organogênese *in vitro* em três clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, avaliaram a intensidade de calejamento, a textura e a coloração do calo em resposta aos tratamentos constituídos de TDZ ou BAP, em interação com ANA. A maior calogênese foi promovida na presença de TDZ (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), sendo a regeneração obtida com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP. Assim como Alves et al. (2004), Hervé et al. (2001) também observaram a relação entre a textura compacta e a capacidade de regeneração de gemas, pois verificaram o desenvolvimento de protuberâncias densas que culminavam na regeneração de gemas em *Eucalyptus gunnii*. Assim, a textura do calo é um parâmetro que deve ser usado na escolha de um tratamento objetivando a organogênese.



**Figura 5** – Calo no cultivo inicial (A) e calo com formação de brotações (B).

**Figure 5** – Initial cultivation of callus (A) and callus with shoot formation (B).

#### 4. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas neste estudo, pode-se concluir que:

- O meio de cultura apropriado para germinação *in vitro* de nim é o meio WPM na ausência de GA<sub>3</sub>.
- Explantes cotiledonares incubados no escuro em meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP promovem a maior formação de calos com potencial morfológico.
- Calos subcultivados em meio de cultura WPM suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP promovem a maior formação de brotações até o terceiro subcultivo.

## 5. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. S.C.; XAVIER., A.; CAMPOS, O. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex maiden x *e. Urophylla* s. T. Blake. **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.643-653, 2004.
- BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Calogênese in vitro em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com uso de 6-benzilaminopurina e ácido á-naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, n.71, p.19-24, 2006.
- FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* sp.**, 2007. Folhas. Dissertação (Mestrado Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161, p.645-53, 2001.
- KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biociência**, v.1, n.1, p.30-33, 1997.
- KOENNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.33-36, 2002.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v.30, p.421-427, 1981.
- MARTINEZ, S. S.; LIMA, J.; BOIÇA JÚNIOR, A. L. Avaliação agrônômica e fitoquímica de neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedências em vários locais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL, 16., Rio de Janeiro, 1998. Resumos... Rio de Janeiro, 1998. p.831.
- NEVES, B. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)**. Goiânia: Embrapa, CNPAF; APA, 1996. 32p. (Circular Técnica, 28).
- NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.366-370, 2007.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biociência**, v.11, n.1, p.12-15, 1997.
- ROCHA, S. C.; QUOIRIN, M. Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro*. **Ciência Florestal**, v.14, n.1, p.91-101,
- SALVI, D. N. et al. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.65, n.2, p.159-162, 2001.
- SCALON, S. P. Q. et al. Germinação e crescimento inicial da muda de orelha-de-macaco (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong): efeito de tratamentos químicos e luminosidade. **Revista Árvore**, v.30, n.4, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622006000400005&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622006000400005&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 24 Ago. 2007.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.271-297, 1990.
- SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica para ciências do comportamento**. Rio de Janeiro: McGraw, 1977.p.350.
- SOUSA, H. U. et al. Efeito do ácido giberélico sobre a germinação de sementes de porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.496-499, 2002.