

CALOGÊNESE *in vitro* DE NIM A PARTIR DE SEGMENTOS INTERNODAIS

MARCELO RODRIGUES¹, WAGNER C. OTONI², RENATO PAIVA³, PATRÍCIA D. O. PAIVA⁴,
LUCIANO COUTINHO⁵, DAIANE PEIXOTO VARGAS⁶.

RESUMO

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente por nim, pertence à família Meliaceae, a qual apresenta grande potencial para a produção de azadirachtina (AZA); contudo, possui sementes recalcitrantes, polinização do tipo cruzada e teor variável de AZA. Desse modo, o processo de calogênese possibilita a utilização futura de células com capacidade de regeneração, seja pela via organogênica ou embriogênica. Além disso, podem ser aplicadas em diversas áreas e técnicas, tais como estudos da expressão gênica de nim, isolamento de protoplastos, transformação genética e produção biossintética *in vitro* de compostos de interesse econômico. O objetivo principal para realização desse trabalho foi avaliar a capacidade de totipotencialidade celular e multiplicação destas, a partir de segmentos internodais de nim, estimulando células do periciclo caulinar com aplicação do regulador de crescimento thidiazuron (TDZ). Os explantes assépticos foram inoculados em placas de petri descartáveis, contendo 25 ml de meio de cultivo MS. Os tratamentos foram formados em função da concentração de TDZ. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C de temperatura, na ausência de luz, a fim de definir o melhor tratamento com TDZ após 30 dias de incubação. Foi contabilizada a quantia de explantes que responderam ao regulador, com formação visível de calos na superfície dos segmentos internodais, e a quantidade de explantes oxidados. Foi observado no presente trabalho que a maior taxa de calos (88%) ocorreu quando aplicado 4,56 µM de TDZ. As menores taxas de oxidação ocorreram no meio de cultura com adição de 3,42 µM (16%) e 4,56 µM (20%) de TDZ.

Palavras-chaves: thidiazuron, segmento internodal, *Azadirachta indica*.

INTRODUÇÃO

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família Meliaceae, sendo originário no Sul da Ásia. É uma árvore utilizada para produção de madeira, produção de medicamentos, e tem sido muito utilizada para produção de bioinseticida. A azadirachtina (AZA) destaca-se como um dos compostos mais utilizados para esse fim (Prakash et al., 2002).

O calo constitui-se de massas celulares desorganizadas que se originam a partir de tecidos ou órgãos cultivados *in vitro*, podendo apresentar determinado grau de diferenciação. Tal proliferação celular pode ser devido a sinais causados por injúrias físicas ou químicas. Desse modo, o calo é considerado uma forma potencial de propagação em massa. Calos friáveis têm sido obtidos a partir do cultivo dos explantes em um único meio contendo apenas citocinina, ou o sistema pode ser bifásico, pela associação de auxinas. Em espécies de interesse econômico como o nim, o cultivo de calos tem sido uma estratégia valiosa e amplamente utilizada para produção de princípios ativos. Além disso, o calo pode ser utilizado na morfogênese, em estudos de desenvolvimento e diferenciação celular, e para o estabelecimento de suspensões celulares (Xavier et al., 2007). Dentre os reguladores utilizados para indução de calos *in vitro* de *A. indica*, podemos destacar o thidiazuron (TDZ) (Gairi & Rashid, 2005; Mamaghani et al., 2009).

¹ Doutorando em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA marcel.or.7@hotmail.com

² Professor Associado III, DBV/UFV wotoni@ufv.br

³ Professor Associado, DBI/UFLA renpaiva@dbi.ufla.br

⁴ Pós-doc PNPd-CAPES-Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA dvbio@hotmail.com

⁵ Professora Associada, DAG/UFLA patriciapaiva@dag.ufla.br

⁶ Doutorando em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA lucoutsilva@yahoo.com.br

Desse modo, o cultivo de calos em meio semi-sólido e posteriormente em suspensões celulares, tem possibilitado entender melhor a questão nutricional das células e também as vias metabólicas e enzimáticas envolvidas na síntese de compostos secundários bioativos. Teoricamente, a produção de células indiferenciadas *in vitro* pelo processo de calogênese pode ser feito a partir de qualquer explante, seja ele vegetativo ou reprodutivo. No entanto, esse processo é dificultado em plantas lenhosas como é o caso da espécie em estudo neste trabalho, devido à alta produção de compostos fenólicos, causando oxidação dos explantes (Arora et al., 2010).

Além disso, outros fatores também precisam ser considerados para promover resultados satisfatórios, como a idade do material biológico, época de coleta, o estado fisiológico e fitossanitário da planta matriz e do explante no momento da coleta, a desinfestação, o tamanho das amostras, as condições de incubação, a nutrição fornecida, o tipo de reguladores de crescimento aplicado, assim como a concentração destes (Xavier et al., 2007). As aplicações científicas para células tronco vegetal cultivadas *in vitro* são as mais diversas e promissoras. Podemos destacar a produção de clones por organogênese ou embriogênese somática, produção de compostos biologicamente ativos, produção de protoplastos, transformação genética, estudos de expressão gênica, dentre outras técnicas biotecnológicas (Cheng., et al 2010).

Outras vantagens do cultivo dessas células *in vitro* pode ser a maior velocidade de multiplicação celular em condições pré-estabelecidas, assim como a ausência de pragas e doenças causadas por microrganismos. Tais fatores colaboram particularmente para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, propagação de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou de ciclo de vida longo (Rodrigues et al., 2009).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito indutor do regulador thidiazuron em segmentos internodais do caule de nim, viabilizando a produção biológica de células tronco para posteriores cultivos e aplicações, além disso, averiguar a taxa de explantes oxidados.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Utilizou-se segmentos internodais como fonte de explantes, obtidos a partir de ramos de 5 matrizes de nim com 8 meses de idade, provenientes do viveiro Nim Brasil, da cidade de São José do Rio Preto (SP). Tais plantas foram estabelecidas a partir de sementes e desenvolvidas com idade média de 8 meses, em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal da UFV.

Os explantes foram imersos em água destilada imediatamente após a coleta. Posteriormente, efetuou-se a padronização das amostras (5 mm em secção transversal). Na primeira fase de assepsia, os segmentos internodais foram imersos em álcool etílico (70% v/v) por um minuto sob agitação. Em seguida, os segmentos foram submetidos à solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 50% v/v, com adição de 3 gotas da solução Tween 20, durante cinco minutos sob agitação. Logo após esse processo, as amostras foram submetidas à tríplice lavagem em água destilada autoclavada, para a retirada completa de toda a solução ácida e emulsiva. Na seqüência, os explantes foram transportados para a câmara de fluxo laminar, para início da segunda fase da assepsia, sendo o material imerso novamente em álcool etílico a 70% v/v durante 1 minuto sob agitação, e posteriormente realizado a tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada, sob agitação.

Os explantes assépticos foram inoculados em placas de petri descartáveis, contendo 25 ml de meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962). O pH foi aferido para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave a 120 °C e pressão 1,5 kgf cm⁻² durante 15 minutos. Foi adicionado no meio de cultivo 3% (p/v) de sacarose; 0,6% (p/v) de Ágar Merck®.

Os tratamentos foram formados em função da concentração de TDZ: T0 (controle); T1 (1,14 µM); T2 (2,28 µM); T3 (3,42 µM) e T4 (4,56 µM). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 27 ± 2 °C de temperatura, na ausência de luz, a fim de definir o melhor tratamento com TDZ após 30 dias de incubação. Após esse período, foi contabilizada a quantia de explantes que responderam ao regulador, com formação visível de calos na superfície dos segmentos internodais, e a quantidade de explantes oxidados.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), 60 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante, onde o número de parcelas experimentais corresponde à quantidade de placas (6) por tratamento (5), totalizando 30 parcelas. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa GENES, versão Windows/2004.2.1, desenvolvido por Cruz (2001), com as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando-se um nível de significância de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns explantes sofreram oxidação com maior destaque para o tratamento controle (T0), na ausência de TDZ (figura 1-A). A oxidação observada ocorreu possivelmente pela baixa taxa de divisão celular e crescente liberação de compostos fenólicos nas incisões, em função do tempo de cultivo. Outros autores também observaram a oxidação de explantes cultivados *in vitro* de nim (Prakash et al., 2002; Quraishi et al., 2004).

No entanto, nos demais tratamentos o regulador de crescimento TDZ demonstrou ser eficiente para induzir o processo de calogênese em segmentos internodais do caule de nim, provavelmente através da indução de células do periciclo, que por sua vez possui determinação gênica e capacidade de totipotencialidade celular. O tratamento T4 (4,56 μM) apresentou maior formação de calos com aspecto friável e de cor clara (figura 1-B). Citocininas e auxinas podem induzir a formação de calos no mesmo explante. No entanto, o tipo de calo proveniente pode diferir quanto à competência embriogênica ou organogênica (Rodrigues et al., 2009).

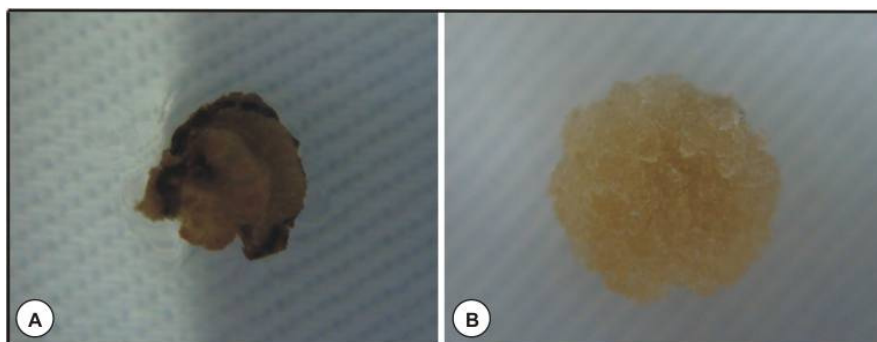


Figura 1: Cultivo *in vitro* de segmentos internodais do caule de *Azadirachta indica* A. Juss em meio MS após 30 dias. **A)** Explante do tratamento cultivado na ausência de TDZ (T0), com aspecto oxidado; **B)** Explante do tratamento cultivado com 4,56 μM de TDZ (T4), com aspecto friável e coloração clara.

Das 60 amostras do tratamento T0 apenas 12 unidades formaram calos na superfície dos segmentos, 26 sofreram processo de oxidação, enquanto que 22 explantes ficaram entumecidos (dados não apresentados). No tratamento T1 (1,14 μM), 28 formaram calos, 18 oxidaram e 18 entumeceram. Foi observado no tratamento T2 (2,28 μM) 25 explantes com formação de calos, 15 sofreram oxidação e 19 entumeceram. Tais tratamentos não foram significativos pelo teste de Tukey a 5%.

Os tratamentos T3 e T4 foram significativos em relação aos anteriores, porém, não diferiram estatisticamente entre si. Os valores do tratamento T3 (3,42 μM) foram: 41 explantes com calos, 10 oxidados e 9 entumecidos. Enquanto que foi observado no T4 (4,56 μM) 53 explantes com calos e 12 oxidados, conferindo 5 mortes de explantes com calos, além dos 7 entumecidos. Os dados correspondentes ao fator oxidação, não foram significativos entre os tratamentos (Figura 2).

Explantes cotiledonares de nim possui capacidade de regeneração com aplicação de 8,87 μM de BAP ou 9,04 μM de 2,4-D em meio de cultivo WPM. 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. (Rodrigues et al., 2009).

Mudas de nim propagadas *in vitro*, a partir de sementes germinadas em meio de cultura MS também foram capazes de induzir diferenciação direta de embriões somáticos com alta frequência e em alta densidade, quando aplicado 1,0 μM de TDZ. Devido ao estresse *in vitro*, foram observados embriões somáticos localizados em várias regiões dos explantes. Embriões somáticos globulares foram mais abundantes no hipocótilo, epicótilo, caule e folhas apicais de mudas de nim. Embriões em estágios mais avançados também foram observados, porém, com menor frequência. Após o isolamento e transferência para meio sem reguladores, os embriões puderam se desenvolver e formar novas mudas (Gairi & Rashid, 2004).

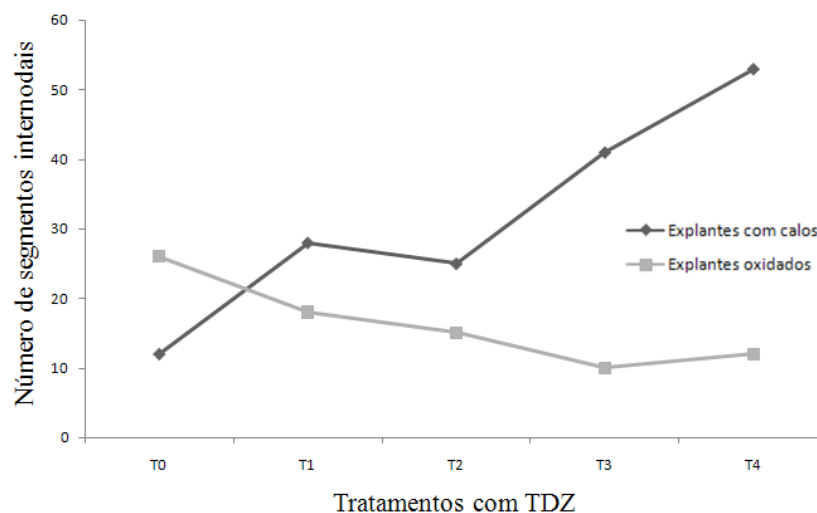


Figura 2: Número de segmentos internodais com formação de calos na superfície e oxidados, em função das diferentes concentrações de TDZ após 30 dias de cultivo.

Resultados em trabalhos anteriores demonstram que calos provenientes de hipocótilos possuem competência celular para induzir o processo de organogênese e embriogênese somática após 3 meses de cultivo com baixa taxa de oxidação, característica essa muito relevante em calos de nim (Zypman et al., 2001).

Pode-se observar no presente trabalho, que o valor médio de explantes com formação de calos na superfície dos segmentos internodais é inversamente proporcional ao valor médio de explantes oxidados ou seja, quanto maior a concentração do regulador de crescimento thidiazuron induzindo a frequente multiplicação celular, menor é a quantidade de explantes oxidados. Provavelmente as regiões incisadas que não formam calos, liberam grande quantidade compostos fenólicos a fim de cicatrizar as regiões que sofreram injúrias, favorecendo o processo oxidativo e necrose do material biológico.

CONCLUSÕES

A maior taxa de indução do processo de calogênese em segmentos internodais de nim ocorreu em meio de cultivo MS na presença de 4,56 μM de TDZ, conferindo o melhor tratamento. A menor taxa de oxidação ocorreu em meio nos tratamentos com concentração de 3,42 μM e 4,56 μM de TDZ. Portanto, tais massas celulares podem ser utilizadas para a produção de clones pela via organogênica ou ainda embriogênica, produção de compostos biologicamente ativos, produção de protoplastos, transformação genética, estudos de expressão gênica, dentre outras técnicas biotecnológicas.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ARORA, K.; SHARMA, M.; SRIVASTAVA, J.; RANADE, S. A. & SHARMA, A. K. Rapid in vitro cloning of a 40-year-old tree of *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) employing nodal stem segments. **Agroforest Syst**, v. 78, p.53–63, 2010.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M.K & BHOJWANI, S.S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 557–564, 2003.

CHENG, Z. J.; ZHU, S. S.; GAO, X. Q & ZHANG, X. S. Cytokinin and auxin regulates WUS induction and inflorescence regeneration in vitro in Arabidopsis. **Plant Cell Rep**, v. 29, p. 927–933, 2010.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**, release versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 2001.

GAIRI & RASHID. Direct differentiation of somatic embryos on different regions of intact seedlings of *Azadirachta* in response to thidiazuron. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, 1073–1077, 2004.

GAIRI, A. & RASHID, A. Direct differentiation of somatic embryos on cotyledons of *Azadirachta indica* A. Juss. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 169–173, 2005.

MAMAGHANI, M. S.; ASSAREH, M. H.; OMIDI, M.; MATINIZADEH, M.; GHAMARI-ZARE, A.; SHAHRZAD, S & FOROOTAN, M. The effect of thidiazuron level on in vitro regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. **Plant Growth Regul**, v. 59, p.199–205, 2009.

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

PRAKASH, G.; BHOJWANI, S. & SRIVASTAVA, A. Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 185–193, 2002.

RODRIGUES, M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; MARTINOTTO, C. & SILVA JÚNIOR, J.M. Morfogênese *in vitro* de nim a partir de explantes cotiledonares. **Revista Árvore**, v. 33, p. 21–26, 2009.

QURAIISHI, A.; KOICHE, V.; SHARMA, P. & MISHRA, S.K. *In vitro* clonal propagation of neem (*Azadirachta indica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 281–284, 2004.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (ed.). *Biotecnologia Florestal*. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, p. 53-74, 2007.

ZYPMAN, S.; APPLEBAUM, S.W. & ZIV, M. Production of Desert Locust Feeding Deterrents from *in vitro* cultured neem (*Azadirachta indica*). **Phytoparasitica**, v. 29, p. 1–8, 2001.