

**ORGANOGENESE INDIRETA E EMBRIOGENESE SOMÁTICA DIRETA EM EXPLANTES
DE *Azadirachta indica* A. JUSS SOB EFEITO DE ESTRESSE ABIÓTICO**

MARCELO RODRIGUES¹, WAGNER C. OTONI², RENATO PAIVA³, LUCIANO COUTINHO⁴,
DAIANE PEIXOTO VARGAS⁵, VANESSA CRISTINA STEIN⁶

RESUMO

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família Meliaceae, a qual apresenta grande potencial para a produção de compostos de interesse comercial, dentre eles a azadirachtina (AZA). Contudo, essa espécie indiana possui sementes recalcitrantes, polinização do tipo cruzada e teor variável de AZA. Portanto, o objetivo principal para realização desse trabalho foi cultivar calos a partir de cotilédones de nim, viabilizando a multibrotação pela via indireta, e regeneração de embriões somáticos pela via direta, utilizando meio de cultivo WPM, 8,87 µM de BAP e diferentes concentrações de ANA. A formação de embriões somáticos se localizava preferencialmente nas folhas jovens dos brotos, se encontravam na fase globular e em grande quantidade. O tratamento que induziu maior taxa de brotação foi o T1 (meio WPM contendo 8,87 µM de BAP e 1,34 µM de ANA) com valor médio de 52 brotações, seguido do (T2) com 43. Portanto, os calos cotiledonares de nim apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias regenerativas, organogênese e embriogênese somática através do mesmo explante, associando estresses abióticos físicos e químicos *in vitro* a partir do quarto subcultivo, quando os explantes foram submetidos em meio WPM contendo 8,87 µM de BAP e 1,34 µM de ANA.

Palavras-chaves: nim, embriões somáticos, reprodução assexuada, calos, brotações, BAP, ANA.

INTRODUÇÃO

Popularmente conhecida como nim, *Azadirachta indica* A. Juss é uma espécie arbórea nativa da Índia, pertencente à família Meliaceae. Destaca-se por possuir substâncias de ação inseticida, fungicida, bactericida e nematocida. 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 essa transformação (MARTINEZ, 1998; CUNHA, 2002).

A clonagem *in vitro* é particularmente útil para propagação de espécies que possuem sementes recalcitrantes ou de ciclo de vida longo. A produção em larga escala de clones via cultura de tecidos, surge como importante alternativa para a produção de mudas selecionadas e sadias de nim. Essa técnica permite o isolamento asséptico de células ou tecidos da planta-mãe e seu cultivo em condições controladas, sendo que a expressão da totipotencialidade celular permite a regeneração de plantas inteiras idênticas à matriz (RODRIGUES et al., 2009).

Várias são as modalidades de cultura de tecidos de plantas, podendo ser por via direta, pelo desenvolvimento de novos órgãos diretamente do explante ou indireta, via cultura de calos. Estes calos podem ser submetidos a determinadas condições hormonais, as quais podem direcioná-los para o crescimento desorganizado ou para o desenvolvimento de órgãos, como gemas, raízes ou embriões, por organogênese ou embriogênese. Os principais grupos de reguladores desses processos são: as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico (PASQUAL, 2001).

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

⁵ Pós-doc PNPd-CAPES-Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA dvbio@hotmail.com

⁶ Professora Adjunta, UFG vanessastein@oi.com.br

As auxinas são substâncias que controlam o crescimento e a alongação celular, enquanto que as citocininas estimulam a divisão celular e reduzem a dominância apical. O balanço entre estes dois tipos de reguladores controla muitos aspectos da diferenciação celular e organogênese nas culturas de tecidos e órgãos (PASQUAL, 2001).

A partir de um balanço hormonal adequado, a regeneração *in vitro* pode ser realizada por organogênese ou por embriogênese somática. A organogênese envolve a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. Frequentemente, as brotações são induzidas em um meio de cultura enriquecido com citocininas e, subsequentemente estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina. A embriogênese somática é o processo pelo qual células haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (TORRES & CALDAS, 1990).

A clonagem de plantas *in vitro* oferece vantagens muito significativas para a produção de mudas, devido à possibilidade do melhoramento genético, que pode ser obtido por meio de seleção fenotípica (AKULA et al., 2003). Além disso, a embriogênese somática oferece o potencial de armazenamento e análise de clones, bem como um número ilimitado de produção de plantas, possibilitando vantagens relevantes em relação a outros métodos de propagação (SHARRY et al., 2006).

Outras vantagens do cultivo de células e tecidos *in vitro* podem ser a maior velocidade de multiplicação celular em condições pré-estabelecidas, assim como a ausência de pragas e doenças causadas por microorganismos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi induzir a multibrotação em calos de nim a partir de explantes cotiledonares de sementes germinadas *in vitro*, assim como a indução de embriogênese somática direta nos explantes regenerados.

MATERIAL E MÉTODOS

Germinação *in vitro* e inoculação de cotilédones

Sementes de nim (*Azadirachta indica*) foram coletadas no viveiro Nim Brasil de São José do Rio Preto (SP) e utilizadas para obter plântulas, a partir da germinação *in vitro* em meio WPM (Lloyd & McCown, 1981).

Indução de calos

Após a germinação, os cotilédones foram retirados e inoculados em tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultivo WPM acrescido 8,87 μM de BAP, previamente aferido o pH para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave a 120 $^{\circ}\text{C}$ e pressão 1,5 kgf cm^{-2} durante 15 minutos, e mantidos em sala de crescimento, no escuro, sob temperatura de 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$.

Os subcultivos foram feitos periodicamente a cada 30 dias de cultivo. No quarto subcultivo, os calos foram transferidos para em meio WPM contendo 1 mg L^{-1} de vitamina B5 (Gamborg et al., 1968), 8,87 μM de BAP e diferentes concentrações de ANA: T0 (controle); T1 (1,34 μM); T2 (2,68 μM); T3 (4,02 μM); e T4 (5,36 μM).

Cultivo de brotos

Foi avaliado a quantidade de brotos em cada massa de calo por tubo no quarto subcultivo. Após o desenvolvimento dos brotos, os mesmos foram submetidos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sala de crescimento a 27 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura, irradiância de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de aproximadamente 50 mm^2 da posição central do limbo foliar foram fixadas em glutaraldeído 2,5 % e paraformaldeído 2,5 % em tampão 0,1 M fosfato de sódio, a pH 7,2 durante 72

horas (KARNOVSKY, 1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica e secas em ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec CPD 030). Após a metalização com ouro (Balzers SCA 010), as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP) do Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 15 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante, onde o número de parcela experimental corresponde à quantidade de tratamentos avaliados multiplicado por 15. Na seqüência, 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 o nível de significância de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o quarto subcultivo dos calos, foi observado multibrotações, caracterizando o potencial regenerativo via organogênese indireta conforme apresentado na (figura 1-A). Além disso, pode-se observar que a condição de estresse físico *in vitro* associado ao estresse e indução de agentes químicos no meio de cultura, induziu a formação de embriões somáticos por via direta nas brotações proeminentes. Tais embriões somáticos se localizavam preferencialmente nas folhas jovens dos brotos, se encontravam na fase globular e em grande quantidade conforme indicado na seta (figura 1-B). Desse modo, a associação de estresses abióticos *in vitro* possibilita a regeneração organogênica e embriogênica através do mesmo explante. Possivelmente, o controle molecular para expressão de ambos os processos ou vias para espécie em estudo, seja direcionado pelos mesmos genes, diferindo a superexpressão por uma via ou outra, provavelmente pela transdução de sinais promovidos pelos diferentes estresses *in vitro* em níveis quantitativos e qualitativos, físicos e químicos.

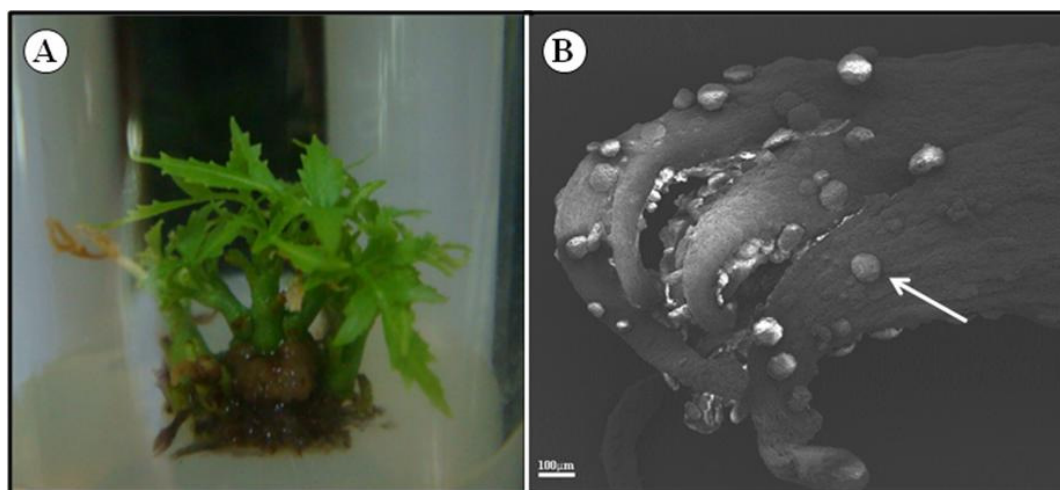


Figura 1: Cultivo *in vitro* de calos cotiledonares de *Azadirachta indica* A. Juss em meio WPM após o quarto subcultivo. A) Organogênese indireta com formação de multibrotações do tratamento T1 (8,87 µM de BAP e 1,34 µM de ANA); B) Embriões somáticos na fase globular formados pela via direta (seta) em folhas de brotações, observado em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

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).

Tais embriões somáticos foram observados após uma semana de cultivo sob efeito do regulador TDZ. Os cotilédones destas sementes germinadas *in vitro* também obtinham a capacidade de regenerar embriões somáticos, preferencialmente a partir de sua base ou bordas. Empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, foi possível detectar com mais precisão a formação de embriões somáticos em diferentes regiões das plantas de nim cultivadas *in vitro*. Quanto à eficácia do TDZ na indução de embriões somáticos, embora seja uma nonpurina derivada de fenil-uréia, tem demonstrado eficiente no processo de indução de embriogênese somática. Em trabalhos anteriores utilizando TDZ, foi observada no meio de cultivo a presença de prolina, ácido abscísico e 4-aminobutirato, caracterizando o estresse induzido pelo regulador (GAIRI & RASHID, 2004).

Conforme outros trabalhos, a constante ocorrência de embriogênese direta de nim, precedida por calos, foi observado em meio contendo 5 μM de BAP. No entanto, tais explantes teve crescimento médio de apenas 2 cm. Quando subcultivados em meio contendo 0,5 μM de BAP, 85 % dos brotos alongaram atingindo em média 6 cm, após 8 semanas de cultivo (CHATURVEDI et al., 2004).

Embriogênese somática indireta foi obtida a partir de embriões zigóticos imaturos de nim, com 40 dias de desenvolvimento. Tais embriões zigóticos foram cultivados em meio MS, suplementado com 1,11 μM de BA e 4,52 a 6,78 μM de 2,4-D. A maior taxa de embriões foi obtida após 8 semanas de cultivo (ROUT, 2005). A maturação e germinação dos embriões somáticos foram realizadas em MS/2, contendo com 0,38 a 0,94 μM de ácido abscísico (ABA) e 2 % de sacarose. O percentual máxima (64,2 %) de germinação foi obtida com 0,94 μM de ABA, após 2 semanas de cultivo *in vitro*.

Um sistema eficiente de embriogênese somática indireta e organogênese de *Melia azadirachta* foi desenvolvido por Sharry et al. (2006), a partir de explantes cotiledonares maduros em meio MS, contendo 2,4-D ou altas concentrações de citocinina (44,39 μM de BAP e adenina). No presente trabalho foi observado embriões apenas na fase globular. O tratamento que induziu maior taxa de brotação foi o (T1) com valor médio de 52 brotações, seguido do (T2) com 43. Ambos os tratamentos não diferiram entre si estatisticamente. Porém, diferiram dos tratamentos (T0; T3 e T4), com valores médios de 28, 20 e 16 brotações respectivamente. Entre estes, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% (Figura 2).

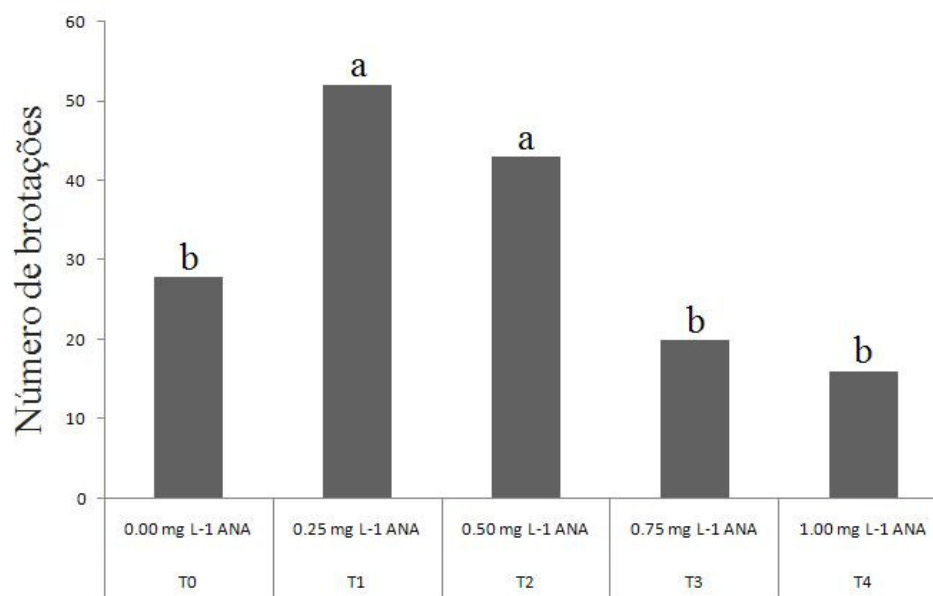


Figura 2: Número de brotações regeneradas em calos cotiledonares de *Azadirachta indica* A. Juss cultivados *in vitro* em meio WPM, sob a influência de diferentes concentrações de ANA após o quarto subcultivo. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Sendo assim, foi observado que a presença da auxina ANA influenciou diretamente no processo morfo genético de calos cotiledonares de nim, quando associado com 8,87 μM de BAP. O balanço hormonal favoreceu a multibrotação, o que implica em maior taxa de clones propagado *in vitro*, reduzindo os custos e possibilitando a padronização de produção. Já que o nim naturalmente é uma planta alógama (fecundação do tipo cruzada) resultando alta taxa de variabilidade genética da espécie.

A morfogênese *in vitro* de nim também foi obtida a partir de segmentos foliares e meristema apical caulinar. A associação de citocinina com hemissulfato de adenina causou efeito sinérgico, auxiliando na maior produção de brotos (VILA et al., 2003; ARORA et al., 2009). Porém, a taxa de brotação foi reduzida, quando foi adicionado ácido indol-acético (AIA) no meio de cultura, o que apóia a hipótese de que a *Azadirachta indica* possui elevada quantidade endógena de auxina, causando inibição de brotação na presença de auxina no meio de cultura em doses elevadas (Arora et al., 2009). A baixa produtividade de morfogênese na presença de auxina em doses elevadas também foi observada em outras espécies como *Dalbergia sisoo* Roxb e *Rosa damascena* Mill (SINGH et al., 2002; PATI et al., 2004).

CONCLUSÕES

Os calos cotiledonares de nim apresentaram alta capacidade de propagação nas duas vias regenerativas, organogênese indireta e embriogênese somática direta, a partir do quarto subcultivo, quando submetido em meio WPM contendo 8,87 μM de BAP e 1,34 μM de ANA.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

AKULA, C.; AKULA, A. & DREW, R. Somatic embryogenesis in clonal neem, *Azadirachta indica* A. Juss. and analysis for *in vitro* azadirachtin production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, p. 304–310, 2003.

ARORA, K.; SHARMA, M. & SHARMA, A.K. Control of pattern of regenerant differentiation and plantlet production from leaflet segments of *Azadirachta indica* Juss. (neem). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 371–378, 2009.

CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M.K. & BHOJWANI, S.S. In vitro clonal propagation of an adult tree of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. **Plant Science**, v. 166, p. 501–506, 2004.

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

CUNHA, R. A. S. Nim indiano: a árvore milagrosa. **Vetores & Pragmas**. Ano IV, nº 10, p. 1-5, março 2002.

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.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. & OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 150–158, 1968.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138, 1965.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

MARTINEZ, S.S.; LIMA, J. de; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Avaliação agronômica e fitoquímica de neem, *Azadirachta indica*, de diferentes procedências em vários locais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **XVII Congresso Brasileiro de Entomologia. Sociedade Entomológica do Brasil**, Resumos, p.831, agosto 1998.

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

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 127 p, 2001.

PATI, P. K.; SHARMA, M.; SOOD, A. & AHUJA, P. S. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa damascena* Mill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 40, p. 192-195, 2004.

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.

ROUT, G.R. *In vitro* somatic embryogenesis in callus cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. a multipurpose tree. **Journal of Forest Research**, v. 10, p. 263-267, 2005.

SHARRY, S.; PONCE, J.L.C.; ESTRELLA, L.H.; CANO, R.M.R.; LEDE, S. & ABEDINI, W. An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of chinaberry –tree *Melia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 189-194, 2006.

SINGH, A.K.; CHAND, P.K.; PATNAIK, S. & CHAND, S. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sisoo* Roxb., a timber yielding tree legume. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p. 203-209, 2002.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – NCPH, 433 p, 1990.

VILA, S.; GONZALEZ, A.; REY, H. & MROGINSKI, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 3, p. 283-287, 2003.