

ANÁLISE CITOQUÍMICA DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE IPÊ-BRANCO

JORGE MARCELO PADOVANI PORTO¹, PATRICIA DUARTE DE OLIVEIRA PAIVA²,
RENATO PAIVA³, MILENE ALVES DE FIGUEIREDO CARVALHO⁴, ANA CRISTINA
DE SOUZA⁵, LUCIANO COUTINHO SILVA⁶

RESUMO

O ipê-branco [*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.] possui rápida perda da viabilidade das sementes e sua germinação é muito baixa correspondendo a aproximadamente 40%. Alguns estudos já foram realizados, induzindo calos em explantes foliares com o objetivo de formar embriogênese somática. O presente estudo teve por objetivo realizar análises citoquímicas de calos provenientes de diferentes explantes de ipê-branco. Foram realizadas análises citoquímicas, por meio de teste com carmim e azul de Evans, para os calos com características embriogênicas provenientes dos diferentes explantes utilizados (folha cotiledonar, hipocótilo e raiz). Os resultados indicaram a presença de células pró-embriogênicas na massa de calo dos diferentes explantes. Calos induzidos a partir de segmentos de folhas cotiledonares tiveram 46% de reação positiva ao corante carmim.

Palavras-chave: *Tabebuia roseo-alba*; carmim; azul de Evans, células pró-embriogênicas

INTRODUÇÃO

O ipê-branco é uma árvore nativa de ampla ocorrência em todo o território brasileiro. Em função de seu florescimento exuberante e de características arbóreas desejáveis, é de grande importância para o paisagismo, particularmente para a arborização de ruas, avenidas e, também para o reflorestamento em terrenos secos e pedregosos (Lorenzi, 2000).

As sementes do gênero *Tabebuia* perdem a viabilidade rapidamente quando armazenadas, mantendo-se por cerca de quatro meses (Cabral et al., 2003). Lorenzi (2000) também relata que sua germinação é muito baixa, de aproximadamente de 40%.

A embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando embriões que darão origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. Esta técnica apresenta grande potencial para produção de mudas em larga escala, entretanto, o seu sucesso em plantas lenhosas ainda é incipiente (Guerra et al., 1999).

Em geral, os explantes jovens oriundos de estruturas reprodutivas, como embriões imaturos (Lamb et al., 2002), cotilédones (Rout & Das, 1994), inflorescências (Teixeira & Marbach, 2002) e hipocótilos (Sun et al., 2003) são os mais responsivos para a embriogênese. No entanto, outros tecidos também podem ser utilizados como explantes na embriogênese, como ápices caulinares (Chee & Cantliffe, 1992), folhas (Ruffoni et al., 1990) e raízes (Park et al., 2005). É importante ressaltar que o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos presentes nos explantes são aspectos importantes. Em um determinado genótipo, a

¹ Doutorando em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, marcelo_pado@yahoo.com.br

² Professora associada, DAG/UFLA, patriciapaiva@dag.ufla.br

³ Professor associado, DBI/UFLA, renpaiva@ufla.br

⁴ Pós-doutoranda em Fisiologia Vegetal, DBI/UFLA, migueiredo@yahoo.com.br

⁵ Graduanda em C. biológicas, UNILAVRAS, acstina@yahoo.com.br

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

sensitividade das células dos explantes aos fitoreguladores explica o fato de que alguns explantes sejam competentes para a embriogênese e outros não (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2005).

As células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético em estudos citoquímicos, como relatado em *Prunus* (Garin et al., 1997), *Pinus* (Hägman et al., 1999) e *Medicago* (Monteiro et al., 2003).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a intensidade de células pró-embriogênicas de calos induzidos em diferentes explantes de ipê-branco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do teste de carmim visando à confirmação de que se haveria células pró-embriogênicas nos calos, induziu-se calos utilizando-se como explantes folhas cotiledonares, hipocótilos e raízes de plântulas de *Tabebuia roseo-alba* com 20 dias de germinação *in vitro*, inoculados em meio de cultura MS suplementado com 4 mg L⁻¹ de ANA.

Após 30 dias de cultivo, foram coletas as amostras constituídas de 100 mg de calos, as quais foram adicionadas de 3 a 5 gotas de corante azul de Evans (0,1%) (peso/volume) por 2 a 3 minutos em uma lâmina de microscopia ótica. Após este período, retirou-se o excesso do azul de Evans e adicionou-se 3 a 5 gotas de corante carmim (2 %) (peso/volume) pelo mesmo período de tempo. O excesso de corante foi retirado e em seguida adicionou-se uma a duas gotas de glicerina. As amostras foram cobertas com uma lamínula, e as lâminas prontas receberam leves batidas com um bastão de vidro, para espalhar o material. Em seguida as amostras foram fotografadas em microscópio de luz em um aumento de 10 vezes e analisados por meio do Software Image Tool[®].

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Scott-Knott, considerando significância de 5% no programa estatístico Sisvar[®] (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste com carmim confirmou a ocorrência de células pró-embriogênicas na massa de calos. Observou-se que 46% das células de calos induzidos a partir de segmentos de folhas cotiledonares apresentaram reação positiva ao corante carmim (Figura 1).

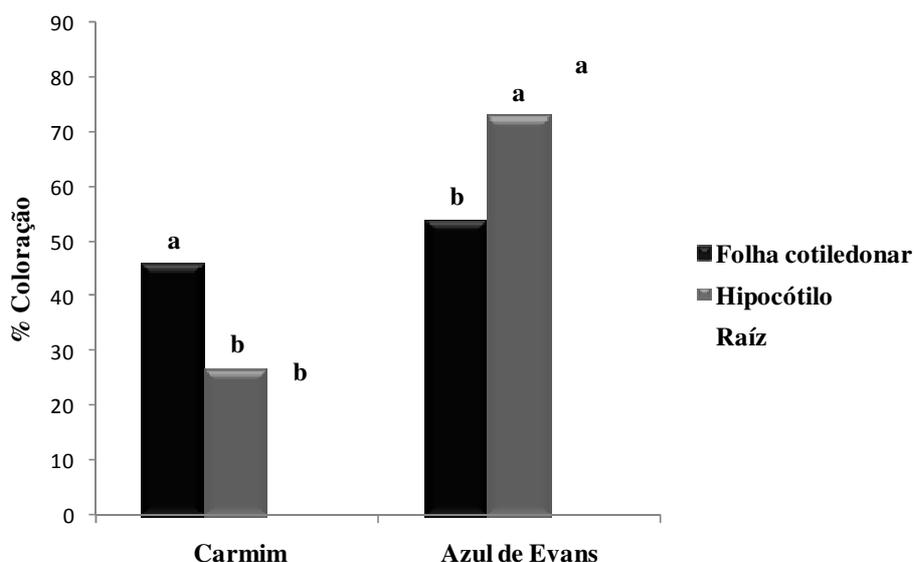


Figura 1 Porcentagem de coloração dos calos formados por diferentes explantes de ipê-branco cultivados *in vitro* por 30 dias. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de barras, não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Realizando a análise citoquímica das células dos calos, observou-se dois principais tipos celulares nas culturas embriogênicas de ipê-branco: as células pró-embriônicas, que são isodiamétricas, pequenas, reativas ao carmim acético e com citoplasma denso, e as células suspensoras que são alongadas, altamente vacuoladas e permeáveis ao corante azul de Evans (Figura 2). Essas células se apresentam em agregados celulares presentes nas culturas embriogênicas durante a multiplicação. Os agregados celulares apresentam variação no tamanho e morfologia, revelando diferentes afinidades com os corantes durante a análise citoquímica, conforme observado por Steiner et al. (2005) e Silveira et al. (2006). A reação positiva ao carmim acético está associada à competência da célula para o desenvolvimento celular (Durzan, 1988; Steiner et al., 2005). As diferenças na morfologia celular podem ser influenciadas por diversos fatores tais como fonte de explante, composição do meio de cultura e alguma forma de estresse (Fehér et al., 2003). Dessa forma, a análise realizada em ipê-branco indica que os diferentes explantes influenciam na porcentagem de formação de células pró-embriônicas após a indução de calos.

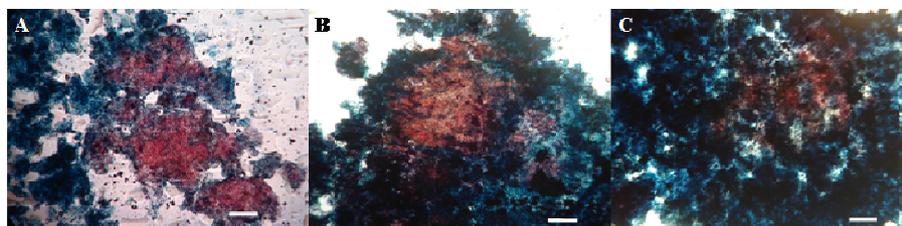


Figura 2 Análise citoquímica com carmim acético e azul de Evans em calos embriogênicos a partir de segmentos cotiledonares (A), hipocotilares (B) e radiculares (C) de ipê-branco, em meio de cultura MS suplementado com 4 mg L⁻¹ de ANA. Barra= 10 µm.

CONCLUSÕES

Os calos provenientes de folha cotiledonar de ipê-branco possuem maior quantidade de células pró-embriogênicas em relação aos calos provenientes de hipocótilo e raiz.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D.C. A.; SIMABUKURO, E. A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 609-617, out./dez. 2003.

CHEE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Somatic embryos in sweetpotato. In: HILL, W. A.; BONSI, C. K.; LORETAN, P. A. (Ed.). **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee, Alabama EUA: Tuskegee University, 1992. p. 39-46.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: SYMPOSIUM DEPARTMENT OF FOREST GENETICS AND PLANT PHYSIOLOGY, 1988, Swedish. **Proceedings...** Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. v. 8, p. 147-186.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, Sept. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GARIN, E.; GRENIER, E.; GRRNIER-DE MARCH, G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 83-91, Feb. 1997.

GUERRA, P. M.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Produção de Informação/ Embrapa Hortaliças, 1999. v. 2, p. 533-568.

HÄGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K.; ARONEN, T. Somatic embryogenesis of Scot pine: cold treatment and characteristics of explant affeting induction. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 341, p. 1769-1778, Dec. 1999.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1/2, p. 91-110, Nov. 2005.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 123-130, feb. 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. v. 1, p. 53.

MONTEIRO, M.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; VALARINI, M. J.; OLIVEIRA, C. A. de; VIEIRA, M. L. C. Plant regeneration from protoplasts of alfafa (*Medicago sativa*) via somatic embryogenesis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 683-689, Oct./Dec. 2003.

PARK, S.Y.; AHN, J. K.; LEE, W. Y.; MURTHY, K. N.; PAEK, K. Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, May 2005.

ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis in *Simarouba glauca*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 79-81, Apr. 1994.

RUFFONI, B.; DAMIANO, C.; MASSABÒ, F.; ESPOSITO, P. Organogenesis and embryogenesis in *Lisianthus russellianus* Hook. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p. 83-88, 1990.

SILVEIRA, V.; SANTA – CATARINA, C.; TUN, N. N.; SCHERER, G. F. E.; HANDRO, W.; GUERRA, M. P.; FLOH, E. I. S. Polyamine effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryogenic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Plant Science**, Limerick, v. 171, n.1, p. 91-98, July 2006.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, Nov. 2005.

SUN, Y.; ZANG, X.; JIN, S.; LING, S.; NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 247-253, Dec. 2003.

TEIXEIRA, B. J.; MARBACH, P. A. S. Otimização do processo de embriogênese somática em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 29, p. 100-103, 2002.