

ARTIGO



AUTORES:

Vanessa Cristina Stein¹Renato Paiva²Rairys Cravo Herrera³Daiane Peixoto Vargas²

¹Universidade Federal de Goiás,
 Campus Jatobá. Rodovia BR364,
 km 192, n.3800, 75801-615,
 Jatai, GO, Brasil.

²Universidade Federal de Lavras,
 Departamento de Biologia,
 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

³Universidade Federal do Pará
 (UFPA), Campus Universitário de
 Altamira, PA, Rua José Porfírio, n°
 2515, Bairro de São Sebastião,
 68.372-040, PA, Brasil.

Recebido: 14/05/2009

Aprovado: 01/11/2010

AUTOR CORRESPONDENTE:

Vanessa Cristina Stein

E-mail:

vanessa.stein@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE:

2,4-D, Dapi,

Matéria fresca,

Inga vera Willd. subsp.

Affinis (DC.) T.D. Penn.

KEY WORDS:

2,4-D, dry matter, Dapi,

Inga Vera Willd. subsp.

Affinis (DC.) T.D. Penn.

Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro

Growth curve and cell division index of inga vera willd. Subsp. Affinis (dc.) T.d. Penn. Calluses

Resumo: O objetivo deste trabalho foi descrever a curva de crescimento de calos originados de explantes foliares de ingazeiro e observar o índice de divisão celular durante a curva. Os explantes foliares foram inoculadas em meio MS, 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 9 μ M de 2,4-D. Em intervalos de 10 dias, os calos foram pesados. Para a obtenção do índice mitótico, os calos foram coletados em intervalos de 20 dias, fixados em Carnoy, posteriormente transferidos para 0,5 mL de solução tampão McIlvaine, por 10 minutos, peneirados e centrifugados. O precipitado foi ressuscitado em tampão McIlvaine e 20 μ L desta suspensão celular foram transferidos para lâminas e corados com Dapi. A curva de crescimento apresentou as fases: lag (de 0 ao 40° dia de inoculação), exponencial (40° ao 50° dia), linear (50° ao 70° dia) e desaceleração (70° ao 90° dia). O índice de divisão celular acompanhou a curva.

Abstract: The objective of this work was to describe the callus growth curve of leaf explants and to observe the cellular division index during growth. To determine the growth curve, leaf explants were inoculated in MS supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar and 9 μ M 2,4-D and, at intervals of 10 days, the calluses were weighted. The calluses were collected at intervals of 20 days, fixed in Carnoy and transferred to 0.5 mL of McIlvaine solution for 10 minutes, sifted and centrifuged. The precipitate was suspended in McIlvaine solution and 20 μ L of this cellular suspension was transferred to slides colored with DAPI. The growth curve showed the following growing phases: lag (between 0 and 40 days after inoculation), exponential (40° to 50° day), linear (50° to 70° day) and deceleration (70° to 90° day). The cell division index accompanied the curve.

1 Introdução

O ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.) é uma árvore frutífera adaptada a terrenos úmidos, considerada importante para a recomposição de áreas ciliares degradadas. No entanto, o potencial desta espécie para programas de preservação ambiental e sua utilização comercial são prejudicados pela impossibilidade de armazenamento de suas sementes, classificadas como recalcitrantes.

Atualmente, técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais têm sido utilizadas com sucesso na multiplicação de plantas que apresentam dificuldades de serem propagadas sexualmente, constituindo-se em ferramentas relevantes na obtenção de um número expressivo de mudas de espécies ecológica e comercialmente importantes (SANTOS et al., 2005), como o ingazeiro. Uma das peculiaridades da micropropagação é a possibilidade do maior controle das diferentes fases do crescimento dos explantes *in vitro* (JARDIM et al., 2010).

Os processos pelos quais os tecidos produzem órgãos vegetais adventícios *in vitro* podem ocorrer direta ou indiretamente, por meio da formação de calos (MOURA et al., 2001). Neste último caso, para que a organogênese ocorra, as células devem passar pelos processos de desdiferenciação, aquisição de competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão.

Os centros ativos de divisão celular dos calos, em condições adequadas, respondem a determinados estímulos, sofrendo diferenciação e formando órgãos (GEORGE, 1996). No entanto, o que difere no comportamento de células vegetais com a mesma composição genética é a competência das células-alvo (TORRES et al., 2000), ou seja, a sua capacidade para responder a estímulos específicos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Sendo assim, a competência é o primeiro passo para a diferenciação celular, seguida da determinação das células competentes, que se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado (GEORGE, 1996).

O conhecimento das mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante o crescimento *in vitro* de tecidos vegetais de espécies lenhosas pode fornecer importantes informações relacionadas ao processo de estabelecimento e, conseqüentemente, propiciar a otimização das condições para seu cultivo *in vitro* (MESQUITA et al., 2002).

A determinação do índice de divisão celular de calos pode favorecer a compreensão dessas mudanças fisiológicas e auxiliar na otimização dos protocolos

de regeneração e transformação genética. Segundo Fogliatto (2001), a eficiência da introdução de genes é aumentada durante a fase de divisão celular. Há indicações, na literatura, de que a eficiência de transformação por métodos diretos (eletroporação, bombardeamento com microprojéteis) e indiretos (sistema *Agrobacterium*) está relacionada a esta taxa de divisão.

A partir da determinação das fases lag, exponencial, linear e estacionária da curva de crescimento de calos, pode-se determinar o índice mitótico para cada fase desta curva, o que torna possível estipular o intervalo médio dos subcultivos (GUERRA et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos originados de explantes foliares de ingazeiro e observar o índice de divisão celular durante a curva.

2 Material e Métodos

Plantas matrizes de ingazeiro, com aproximadamente 2 anos de idade, obtidas do viveiro de mudas das Centrais Elétricas de Minas Gerais (Cemig), localizado na represa de Camargos, município de Itutinga, MG (21°29'15"S, 44°38'33"O), foram mantidas em sala de crescimento, a 25 ± 2 °C de temperatura, irradiância de fótons de 43 mmol s⁻¹ m⁻² e fotoperíodo de 16 horas e utilizadas como fonte de explantes.

Para a desinfestação, folhas foram lavadas em água corrente por 20 minutos e, em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por 60 segundos e em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a tríplex lavagem em água destilada e autoclavada.

Para a obtenção dos calos, 400 explantes foliares com 1cm² foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e 9 µM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120° C, por 20 minutos. Após a inoculação, foram incubados no escuro, à temperatura de 27 ± 2 °C.

Para determinação da curva de crescimento, a partir do tempo 0 (dia da inoculação) até o tempo 90 (90 dias após a inoculação) em intervalos de 10 dias, 15 calos foram coletados, pesados em balança de precisão para a determinação da matéria fresca e, logo após, acondicionados em estufa de circulação forçada a 70 °C, por 72 horas, para a determinação da matéria seca. O delineamento estatístico utiliza-

do foi o inteiramente casualizado, com 15 repetições por ponto da curva, sendo cada repetição composta por um explante, inoculado em tubo de ensaio e distribuído aleatoriamente e selecionado aleatoriamente para a determinação do peso fresco e seco.

Na determinação do índice mitótico (IM), 15 calos de ingazeiro foram coletados aos 30, 50, 70 e 90 dias e fixados em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético), por um período de 2 a 24 horas, à temperatura ambiente, e acondicionados em freezer.

Para a análise, 0,5g de calos foram mantidos em 0,5 mL de solução tampão McIlvaine (pH 7) por 10 minutos, peneirados e centrifugados a 6.000 rpm por 1 segundo. O precipitado foi ressuscitado em tampão McIlvaine (pH 7) e 20 µL desta suspensão celular foram transferidos para lâminas, coradas com Dapi (4-6-diamino-2-fenilindole) e observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 60, utilizando-se o filtro WU, sob aumento total de 400X. Foram contadas, por meio da técnica de varredura, 1.200 células por ponto da curva. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células observado, multiplicando-se por 100.

3 Resultados e Discussão

O crescimento dos calos de explantes foliares de ingazeiro foi verificado a partir dos parâmetros: peso fresco, peso seco e índice de divisão celular.

A curva de crescimento seguiu um padrão sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca, em função do aumento do tempo de cultivo (Figura 1).

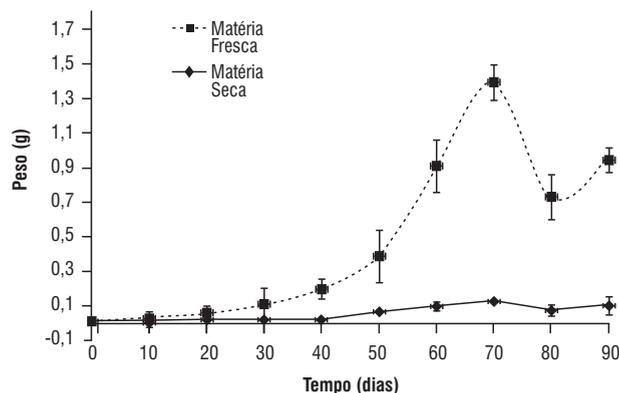


Figura 1. Curva de crescimento de calos de ingazeiro.

A fase lag foi verificada até o 40º dia, caracterizada pelo pequeno acúmulo de matéria seca dos calos. Durante este período, verifica-se número estacio-

nário de células, início da mobilização de metabólitos e síntese de proteínas, ou seja, uma preparação para a fase de divisão celular (Figura 2). Segundo Shimizu et al. (1977) e Scragg e Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia e a fase exponencial, como biossintética.

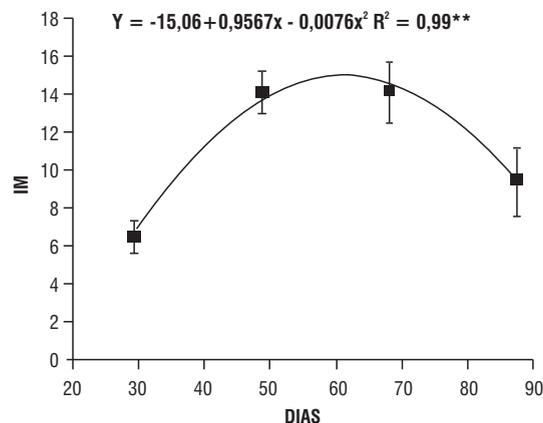


Figura 2. Índice mitótico (IM) de calos de ingazeiro
** Significativo a 1% de probabilidade.

Mezzetti et al. (1991) observaram a ocorrência da fase lag até o 30º dia após a inoculação de segmentos foliares de kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang e A. R. Ferguson]. Serra et al. (2000) também relataram, em calos de *Bertholletia excelsa* H. B. K., a ocorrência desta fase até o 30º dia de inoculação, e sugeriram que o longo período de duração da mesma poderia estar relacionado com a utilização de explantes primários retirados de plantas em diferentes estádios fisiológicos.

A fase log, ou de crescimento exponencial, período no qual ocorre a máxima divisão celular, foi observada entre o 40º e o 50º dia, caracterizada por acúmulo de matéria seca e aumento do índice de divisão celular dos calos (Figura 2). Santos et al. (2003) observaram a fase exponencial entre o 42º e o 77º dia de cultivo dos calos de *Coffea arabica* L., cv Rubi. Em calos de *Bertholletia excelsa* H. B. K., esta fase ocorreu entre o 30º e o 53º dia após a inoculação (SERRA et al., 2000).

A fase linear, período em que os calos diminuem a divisão celular e aumentam o volume, foi verificada entre o 50º e o 70º dia.

Finalmente, a fase de desaceleração do crescimento ocorreu entre o 70º e o 80º dia após a inoculação dos explantes foliares, com uma visível redução do índice mitótico (Figura 3). Soares (2003) constatou que a fase estacionária da curva de crescimento de calos de ingazeiro iniciou-se a partir do 70º dia da inoculação. Foi observada a manuten-

ção do peso alcançado na fase anterior a partir do 90º dia.

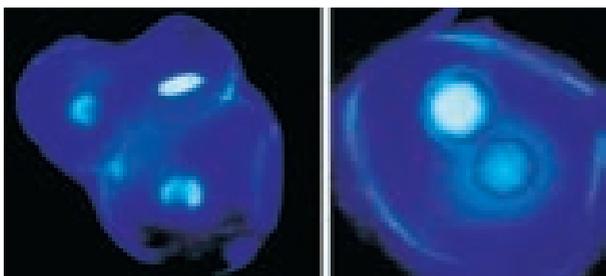


Figura 3. Células do calo de ingá em divisão celular.

Segundo Smith (1992), é nessa fase que os calos devem ser repicados, principalmente em decorrência da redução de nutrientes, secagem do ágar ou mesmo do acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura.

Portanto, o comportamento da curva de regressão do índice mitótico indica que os calos apresentam o ápice de divisão celular entre os 40 e 60 dias, sendo que este é reduzido após esse período, devido à redução de nutrientes no meio de cultura. A coloração com Dapi permitiu a visualização dos núcleos em diferentes fases do ciclo celular, como interfase e metáfase. O Dapi possui especificidade pelas ligações adenina-timina do DNA e, por isso, facilita a visualização dos núcleos em divisão. Bons resultados, utilizando essa metodologia, também foram obtidos em trabalhos com *Citrus* (HAO et al., 2002), *Nicotiana tabacum* (WINICUR et al., 1998) e *Helianthus maximiliani* (BINSFELD et al., 2000).

4 Conclusões

A curva de crescimento de calos de explantes foliares de ingazeiro apresenta padrão sigmoide, com as fases lag, exponencial, linear e de desaceleração.

A repicagem dos calos deve ser realizada entre o 70º e o 80º dia após a inoculação, durante o período de desaceleração, visando à indução de embriogênese somática.

Agradecimentos

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Referências

BINSFELD, P.C.; PETERS, J.A.; SCHNABL, H. Efeito de herbicidas sobre a polimerização dos microtúbulos e indução de micronúcleos em protoplastos de *Helianthus maximiliani*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 3, p. 263-272, 2000.

FOGLIATTO L.F.; DROSTE, A.; ZANETTINI, M.H.B. *Frequência de divisões celulares em tecido embriogênico de soja: eficiência de transformação via biolística*, 2006. Disponível em: http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/posters/02/02pdf/02-004.PDF. Acesso em: 05 maio 2006.

GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture*. 2. ed. London: Exegetics Limited, 1996.

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

HAO, Y.J.; YOU, C.X.; DENG, X.X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. *Plant Cell Report*, New York, v. 20, n. 3, p. 1123-1127. 2002.

JARDIM, L.S.; SAMPAIO, P. de T.B.; COSTA, S. de S.; GONÇALVES, C. de Q. B.; BRANDÃO, H.L.M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração in vitro de pau-rosa (*Aniba rosaeodora Ducke*). *Acta Amazônica*, v.40, n.2, 2010, p.275-279. [

MESQUITA, A.C.; PAIVA, R.; SANTIAGO, E.J.A. de; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, L. V.; GOMES, A. C. Análises bioquímicas de calos obtidos de segmentos foliares de lichieira (*Litchi chinensi* Sonn.). *Magistra*, Cruz das Almas, v.14, n.1, jan./jun. 2002.

MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 153-160, 1991.

MOURA, T.L. de; ALMEIRA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; FILHO, F. de A.M. Organogênese in vitro de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and biomass with tabaco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-92, 1962.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, P.D. de O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix (Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.3, p.510-514, maio/jun., 2005.

SANTOS, C.G. dos; PAIVA, R.; PAIVA, P.D. de O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. *Ci-*

ência e Agrotecnologia, Lavras, v. 27, n. 3, p. 571-577, maio/jun. 2003.

SCRAGG, A.H.; ALLAN, E.J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quasia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV*, 1993. Berlim:Springer-Verlag. v.21, p.249-268.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D. de O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 4, p. 833-840, out./dez. 2000.

SHIMIZU, T.; CLITTON, A.; KOMAMINE, A.; FOWLER, M.W. Changes in metabolite levels during growth of *Acer pseudoplanatus* (sycamore) cells in batch suspension culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 40, n. 2, p. 125-129. 1977.

SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992, 171 p.

SOARES, G. de A. *Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T. D. Penn. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.*

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. 2004.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. *Glossário de biotecnologia vegetal*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

WINICUR, Z.M.; ZHANG, G.F.; STAEHELIN, L.A. Auxin deprivation induces synchronous Golgi differentiation in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology*, v. 117, p. 501-513, 1998.