

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

CALOGÊNESE E VIABILIDADE CELULAR EM CALOS DE SISAL (*Agave sisalana* PERRINE)

**Fernando dos Santos Carneiro^{1,2}; Sandra Regina de Oliveira Domingos Queiroz^{1,3};
Cristina Ferreira Nepomuceno^{1,4}; Cláudia Elena Carneiro^{1,5}.**

¹Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Biologia, Unidade Experimental Horto Florestal, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), Av. Presidente Dutra, s/n, Santa Mônica, Feira de Santana, BA, CEP 44100-000;

²Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais, Bolsista PIBIC, e-mail: fernandobramar@yahoo.com.br;

³Dra. em Genética e Melhoramento de Plantas, Professora Visitante, e-mail: sandrarqueiroz@hotmail.com;

⁴Doutoranda em Botânica, e-mail: cfnbio@hotmail.com;

⁵ Dra. em Biologia Vegetal, Professora titular, e-mail: cecarneiro@gmail.com.

PALAVRAS-CHAVE: Calogênese; regulador de crescimento; trifeniltetrazólio

INTRODUÇÃO

O sisal é um vegetal pertencente ao gênero *Agave*, sua principal utilização consiste na extração das fibras contidas em suas folhas, dando origem à principal fibra dura produzida no mundo, contribuindo com mais da metade da produção comercial de todas as fibras desse tipo (EMBRAPA, 2010). Atualmente há um declínio contínuo dessa cultura, devido a uma doença denominada de podridão vermelha ou podridão do tronco, causada pelo fungo de solo *Aspergillus niger*.

A micropropagação é uma técnica que possibilita a rápida propagação clonal, em curto período de tempo e reduzido espaço, além de proporcionar plantas livres de doenças (Sá, 2001). Os processos pelos quais os tecidos produzem órgãos vegetais adventícios *in vitro*, podem ocorrer direta (sem a formação de calos) e indiretamente, por meio da formação de calos (Moura *et al.*, 2001). Calos são classificados como grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres *et al.*, 1990).

Durante o período da calogênese é possível determinar a viabilidade celular através do uso de corantes específicos, fornecendo importantes informações sobre as condições ideais para a indução de calos embriogênicos. Entre os corantes utilizados, destaca-se o CTT (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio). Esse método baseia-se no princípio do tetrazólio refletir a atividade de enzimas desidrogenases, relacionadas na atividade respiratória de tecidos vivos formando um composto vermelho (Hoekstra & Bruinsma, 1975). O trabalho teve como objetivo induzir calogênese em explantes de sisal (*A. sisalana* Perrine) e avaliar a viabilidade dos calos pelo teste de tetrazólio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental Horto Florestal e no Laboratório de Micromorfologia Vegetal, ambos na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Utilizou-se como fonte de explantes bulbilhos de sisal retirados do escapo floral, e estes foram desinfestados segundo Queiroz *et al.* (2006). Os explantes foram extraídos por cortes transversais realizados na base dos bulbilhos (1 cm). Para a indução de calos utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com a metade da concentração de sais, solidificado com ágar (7,0 g L⁻¹), suplementado com sacarose (3%) e com os reguladores de crescimento BAP (6-Benzilaminopurina) e 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), nas concentrações (0; 2,5; 5,0 mg L⁻¹) e (0; 0,5; 1,0 mg L⁻¹), respectivamente. O pH foi ajustado

em 5,8 antes da autoclavagem (121°C e 1,0 atmosfera por 15 minutos). Distribuiu-se 15 mL de meio de cultura em tubos de ensaio (150 x 25mm) e após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16h, e radiação fotossintética ativa de $40 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas - frias. Após 30 dias avaliou-se a porcentagem de explantes com calos, coloração e aspectos dos mesmos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de oito repetições, sendo cada uma composta por cinco tubos, cada tubo contendo um explante. Para avaliar a viabilidade celular e determinar o padrão das células e seu potencial embriogênico, amostras de calos (50 mg) foram homogeneizadas com o reagente CTT (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) 0,6 % (p/v), preparado em solução tampão fosfato pH 7,4 conforme metodologia proposta por Faria *et al.* (2009). Lâminas foram preparadas com água destilada cobrindo-as com lamínulas. As fotomicrografias foram realizadas com câmera digital Olympus acoplada em microscópio de luz transmitida, Zeiss Axioskop 2. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey, através do uso do software SISVAR 4.0 (Ferreira, 2003). Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\mathbf{X} + 1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Verificou-se efeitos altamente significativos ($p < 0,01$) do 2,4-D e da interação 2,4-D x BAP para a variável porcentagem de calos (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para porcentagem de calos (%C) em explantes de bulbilhos de sisal (*Agave sisalana* Perrine) em função de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP.

FV	GL	Quadrados Médios
		% Calos
2,4-D	2	0,223**
BAP	2	0,006 ^{ns}
2,4-D x BAP	4	0,027**
Resíduo	63	0,007
Média		45,70
CV (%)		6,76

** ,^{ns} = Teste F, significativo $p < 0,01$ ou não significativo. ^z Dados originais de % foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{\mathbf{X} + 1}$.

Na dupla interação entre os reguladores BAP e 2,4-D (Tabela 2) observou-se que o maior valor para porcentagem de calos em bulbilhos de sisal foi obtido quando se utilizou $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (80%) e valores baixos para porcentagem de calos nos tratamentos com ausência de 2,4-D.

Tabela 2. Dupla interação entre BAP e 2,4-D (nas diferentes concentrações) para valores médios de porcentagem de calos (%C) em explantes de bulbilhos de sisal (*Agave sisalana* Perrine).

TRATAMENTOS		2,4-D (mg. L ⁻¹)	
BAP (mg. L ⁻¹)	0,0	0,5	1,0
0,0	30 aA	50 aA	42,5 aB
2,5	15 cA	53,75 bA	80 Aa
5,0	15 cA	55,0 aA	70 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%) .

Os calos apresentavam coloração esverdeada sendo compactos na ausência da auxina e friáveis e translúcidos nas maiores concentrações de 2,4-D associadas com BAP. Pelas observações microscópicas, pode-se verificar a individualidade de células dissociadas e a divisão ativa assimétrica em suspensão (Figura 1A). O teste com o corante CTT (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) indicou a presença de enzimas desidrogenases ativas através da coloração vermelha das células de *A. sisalana* (Fig. 1B) e células inviáveis não reagindo com o corante (Figura 1B seta). Células isodiamétricas viáveis, pequenas foram observadas (Figura 1C), demonstrando características de células com um maior potencial embriogênico (Lima, 2009). Estes resultados corroboram os obtidos por Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (2009) onde detectaram com o uso dos corantes Carmin acético e azul de Evans a presença de células isodiamétricas em suspensão celular de *Agave tequilana* Weber. As auxinas, principalmente o 2,4-D são responsáveis pelo início do processo de desdiferenciação celular que confere um importante papel na indução de calos com competência embriogênica (Guerra *et al.*, 1999).



FIGURA 01. A - Células em divisão reagindo com o CTT (20 X); B – Células inviáveis (seta) (20 X) e C – Células embriogênicas em calos de *A. sisalana* (40 X). Barra = 50 μ m (A, B) e 100 μ m (C).

CONCLUSÕES

Os reguladores de crescimento BAP e 2,4-D são eficientes na indução de calos em explantes de bulbilhos de sisal. É possível a obtenção de calos friáveis com os reguladores de crescimento BAP e 2,4-D. O corante CTT permite uma eficaz e rápida identificação de material celular com potencial embriogênico.

REFERÊNCIAS

- EMBRAPA. 2010. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Informações gerais sobre o sisal. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/>> - Acesso em: 25 de abril de 2010.
- FARIA, C. V. N. DE; PAIVA, R.; VARGAS, P. D.; PINTO, M. DE S.; STEIN, V. C.; CARVALHO, M. A. DE F. 2009 - Calogênese a partir de segmentos foliares de gabioba. XVII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e IV Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Aracaju – Sergipe, anais: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais – SBFPO Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas – ABCTP.
- FERREIRA, D. F. SisVar – Versão 4.3. DEX/UFLA- Lavras-MG, 2003.
- GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-CBAB. v.2. p. 533-568.
- HOEKSTRA, F.A.; BRUINSMA, J. 1975. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. *Plant Physiology*, Washington, v.34, n.3, p.221 – 225,.
- LIMA, C. D. F. 2009 – Obtenção de suspensão celular e regeneração de embriões somáticos de banana Cv. Prata-anã. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras.
- MOURA, T. L. de A.; MENDES, W. A. B. de; JANUZZI, B. M. 2001. 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, ago.
- MURASHIGE, T.& SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- QUEIROZ, S. R. O. D. ; RIOS, A. P. S. ; OSUNA, J. T. A.; SANTANA, J. R. F. 2006. Estabelecimento *in vitro* de sisal (*Agave Sisalana* Perrine) I. Controle da contaminação e da oxidação. *Magistra*, V. 18, n. 3, Julho/Set, p. 130-139,.
- SÁ, M. E. L. 2001. Propagação *in vitro* de Diferentes Genótipos de Abacaxizeiro por Meio de Seccionamento de Plântulas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal – SP, v 23, n.1, p.017-020,
- SANTACRUZ-RUVALCABA F.; PORTILLO L. 2009. Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial crops and products* n° 29 pag. 609–614.
- TORRES, A.C.; CALDAS,L.S. 1990 - Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – NCPH,433 p .