

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR DE CALOS DE GENGIBRE ORNAMENTAL

Débora de Oliveira Prudente¹, Fernanda Carlota Nery¹, Renato Paiva¹, Patrícia Duarte de Oliveira Paiva¹, Marcela Carlota Nery²

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA), e-mail: deholiveira_bq@hotmail.com, fernanda.nery@dbi.ufla.br, renpaiva@dbi.ufla.br, patriciapaiva@dag.ufla.br

²Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, e-mail: nery.marcela@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se induzir a formação de calos e utilizar o corante CTT na quantificação da viabilidade celular dos calos a partir de gemas rizomatosas de gengibre ornamental. A maior porcentagem de formação de calos (89,33%) ocorreu na presença de 1,6 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). O teste de viabilidade utilizando CTT aponta que os calos devem ser subcultivados aos 20 dias após a inoculação devido a maior absorvância, pois atingiram a fase exponencial de divisão celular.

Palavras-chave: *Zingiber spectabile*, indução de calos, viabilidade celular

ANALYSIS OF THE CELLULAR VIABILITY OF ORNAMENTAL GINGER CALLUS

ABSTRACT

This study aimed to induce the formation of callus and use the CTT dye for the quantification of cellular viability of callus of rhizomatous buds of ornamental ginger. The largest percentage of callus formation (89.33%) occurred in the presence of 1.6 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP). The viability test using CTT shows that the callus must be subcultured at 20 days after the inoculation due to increased absorbance for they reached the exponential phase of cell division.

Keywords: *Zingiber spectabile*, callus induction, cellular viability

INTRODUÇÃO

A floricultura é uma atividade econômica importante dentro do agronegócio brasileiro (DUVAL, 2014). Segundo o Instituto Brasileiro de

Floricultura (IBRAFLOR), em 2014 estimou-se um crescimento no setor na ordem de 8% a 10%. Porém, esse segmento enfrenta um mercado cada vez mais exigente e competitivo, especialmente com relação ao

padrão de qualidade dos produtos, cuja certificação emprega diversos critérios, dentre esses, rápida multiplicação, assepsia e uniformidade (ASGHARI et al., 2014). Assim, o estudo da propagação assexuada de espécies introduzidas, que apresentam boa adaptabilidade às condições ambientais da região, pode ser um dos aspectos determinantes no agronegócio nacional de flores (DUVAL, 2014).

Dentre as espécies ornamentais tropicais introduzidas destaca-se *Zingiber spectabile* Griff., conhecida popularmente como gengibre ornamental. Pertencente à família Zingiberaceae é uma planta herbácea tipicamente tropical originária do sul da Tailândia (BEZERRA & LOGES, 2005). Possui inflorescências terminais, formadas no período de outubro a fevereiro, de cor amarela e forma cilíndrica (RIBEIRO, 2002). As inflorescências mostram muita resistência ao manuseio e são bastante utilizadas em jardins e como flor de corte (LAMAS, 2002). Além de todas as partes da planta exalarem o aroma característico do gengibre (BEZERRA & LOGES, 2005).

A propagação dessa espécie pode ser feita através de sementes, por divisão de touceiras ou rizomas (SALINGER, 1991). Contudo, a espécie é muito suscetível a

pragas e doenças, como podridão de raízes, causada por *Fusarium sp.*, nematóides (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*), bactérias (*Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium carotovorum*), pulgões, ácaros e formigas (CARVALHO et al., 2009), dessa maneira o ideal é a utilização de mudas micropropagadas, que entre as inúmeras vantagens, destacam-se a manutenção do genótipo e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (GIACOMETTI, 1990).

Na propagação assexuada, a calogênese, representa o passo inicial para a multiplicação *in vitro*, onde, uma massa de células é obtida a partir de um explante (FERREIRA et al., 2015). A calogênese é influenciada pelo genótipo, tipo de explante, constituição do meio de cultura e pelo ambiente de cultivo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A formação dessa massa, denominada calo, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática (REIS et al., 2007).

Assim, identificar, durante a fase de calos, a fase exponencial de divisão celular, através do uso de corantes como o cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (CTT), que é reduzido em um composto de coloração

vermelha intensa na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o formazan, o qual pode ser extraído em etanol e quantificado espectrofotômicamente, vem sendo amplamente utilizado na determinação da viabilidade celular de calos (ZAPATA et al., 1991; AMUTHA et al., 2007). O que faz dessa técnica uma ferramenta a ser aplicada em trabalhos que visam otimizar a propagação *in vitro*, e a programas de melhoramento genético, tornando-os mais ágeis e eficientes (FERREIRA et al., 2015). Nesta perspectiva, objetivou-se induzir a formação de calos e utilizar o corante CTT na quantificação da viabilidade celular dos calos a partir de gemas rizomatosas de gengibre ornamental.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a indução de calos, gemas rizomatosas oriundas de plantas com 60 dias de cultivo *in vitro* (1 cm²), foram excisadas e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹), 6-benzilaminopurina (BAP) (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹), acrescidos de 30

g L⁻¹ de sacarose e gelificados com 7 g L⁻¹ de ágar (Sigma®). Ajustou-se o pH para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob temperatura de 25°C ± 2°C no escuro. Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio com um explante com quatro repetições por tratamento, dispostas completamente ao acaso. Aos 30 dias de cultivo *in vitro* foi avaliada a porcentagem de formação de calos em cada tratamento. Após esse período, o tratamento que apresentou maior porcentagem de formação de calos, passou por três subcultivos (SUB1, SUB2 e SUB3) em intervalos de 10 dias a partir dos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Para a viabilidade celular, a amostragem foi feita de forma aleatória, coletando-se pequenas porções de calos que constituíram a amostra final de cada subcultivo. Em tubos de ensaio, 100 mg de cada amostra foram homogeneizada em três mililitros do reagente CTT 0,6% (p/v) preparado em solução-tampão fosfato pH 7,4. A mistura foi incubada por 24 horas, no escuro, à 28°C. Após esse período, foram adicionados sete mililitros de etanol 95% (v/v) em cada tubo, resultando em um composto colorido, o formazan. O formazan foi posteriormente extraído mediante

incubação dos tubos em água fervente durante quatro minutos, o material foi centrifugado por duas vezes a 6.000 rpm durante 20 minutos para a separação dos sólidos. O sobrenadante foi reservado para as leituras de absorbância. Foi feita a curva padrão, absorbância/peso fresco de calos com cinco leituras de absorbância para cada ponto da curva e a viabilidade celular foi expressa como absorbância/g de peso fresco de acordo com Benson (1994). Para cada subcultivo foram realizadas cinco leituras de absorbância por subcultivo. Cada unidade experimental foi constituída de dez tubos de ensaio com um explante com seis repetições por subcultivo, dispostas completamente ao acaso.

A análise de variância foi realizada utilizando-se o software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011). Aplicou-se a análise de regressão polinomial até segundo grau, para avaliar o efeito das concentrações de BAP, 2,4-D e picloram sobre a porcentagem de formação de calos. E as análises de viabilidade celular foram feitas comparando as médias pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estimou-se que a maior formação de calos em gemas rizomatosas de gengibre

ornamental foi alcançado com a utilização da concentração de 1,16 mg L⁻¹ de BAP, tendo-se obtido 89,33% de formação de calos (Figura 1B). As concentrações de BAP superiores a 1,6 mg L⁻¹ reduzem a porcentagem de formação de calos em gemas rizomatosas aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O aspecto visual dos calos obtidos foi registrado (Figura 2). Os calos formados em gemas rizomatosas na presença de 1,8 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,6 mg L⁻¹ de BAP exibiram calos de coloração bege claro e textura friável (Figuras 2A e 2B). Já os demais tratamentos com o regulador de crescimento picloram apresentaram calos de coloração bege escuro e de textura compacta (Figura 2C). Estes resultados corroboram com os encontrados por Sundarasekar et al. (2012), trabalhando com bulbos da espécie ornamental *Hymenocallis littoralis* cultivados em meio de cultura MS semi-sólido acrescido de 4,5 µM de BAP, obtendo alta taxa de indução de calos (93,75%). Geralmente, altas concentrações de auxinas e citocininas podem promover a proliferação celular abundante com a formação de calos em diferentes espécies de plantas (SHAH et al., 2003). (PIERIK, 1987; EKIZ & KONZAK, 1997).

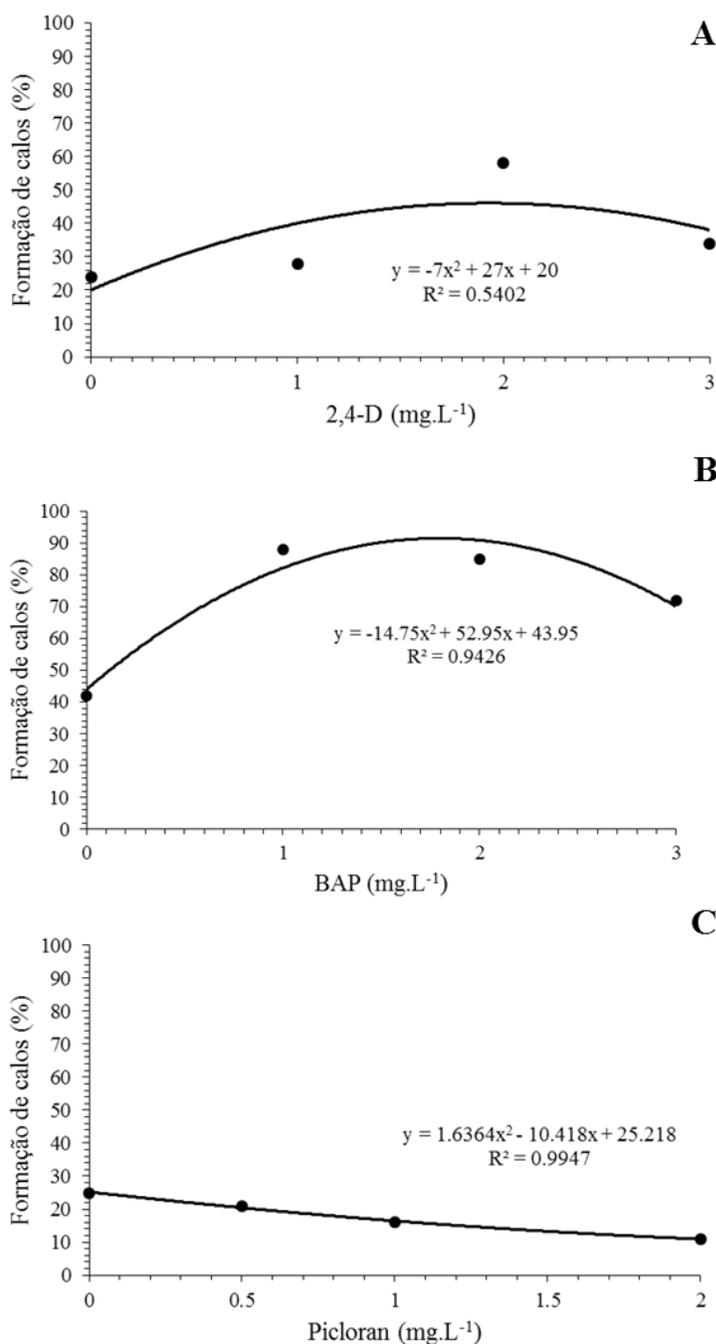


Figura 1. Porcentagem de formação de calos em gemas rizomatosas de gengibre ornamental em meio de cultura MS em função da concentração de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 mg L⁻¹) (A), BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 mg L⁻¹) (B) e picloram (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) (C), aos 30 dias de cultivo *in vitro* (São João Del Rei, MG, 2012).

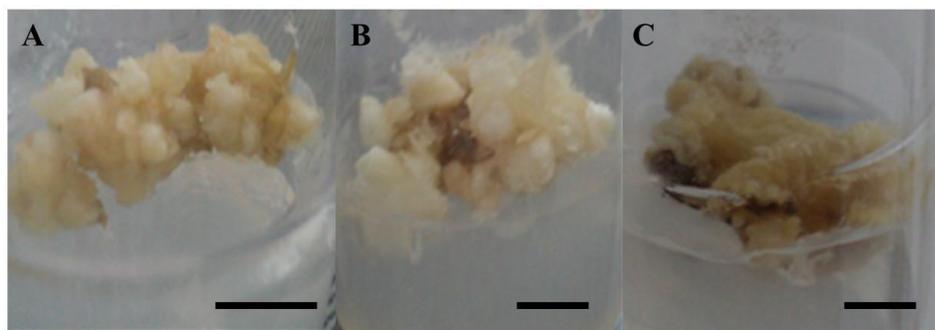


Figura 2. Aspecto visual de calos formados em gemas rizomatosas de gengibre ornamental em meio de cultura MS suplementado com $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (A), $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (B) e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de picloram (C). Aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Barra = 0,5 cm (São João Del Rei, MG, 2012).

Contudo, o ajuste das concentrações adequadas dos reguladores de crescimento utilizados, pode otimizar o tempo de indução, a porcentagem de formação de calos e os padrões de crescimento em diferentes tipos de explantes

Neste estudo o regulador de crescimento BAP, uma citocinina sintética, obteve taxas de formação de calos superiores para gemas rizomatosas, com calos de aspecto friável, que são considerados os mais indicados para o cultivo de células em suspensão, visando a produção de metabólitos secundários, embriogênese somática e técnicas de transformação genética (BARBOZA et al., 2014; VIDIGAL et al., 2014). Fato que se deve à atuação desse regulador a nível celular por indução de expressão de alguns genes relacionados ao crescimento e promoção de mitose (RIEFLER et al., 2006; YEW et al., 2010).

A auxina 2,4-D, não obteve elevada taxa de formação de calos em gemas rizomatosas neste estudo, fato este que pode estar relacionado à grande estabilidade deste regulador de crescimento no meio de cultura ao longo do tempo de cultivo, pois quando absorvido pelo tecido a taxa de degradação e conjugação pode ser rápida (GEORGE et al., 2008). Já o picloram é considerado como um regulador de crescimento potente capaz de estimular a embriogênese somática (PTAK, 2007; KAOUTHER et al., 2011), contudo, neste estudo, não foi eficiente na formação de calos rizogênicos, com formação de calos compactos e não-embriogênicos.

A extração de formazan permitiu a obtenção da curva padrão absorbância/massa fresca de calos. Os testes com CTT mostraram diferenças significativas com relação à absorbância máxima para os três subcultivos de acordo com o teste de Tukey

com nível de significância de 5%. Anotou-se o comportamento geral dos três subcultivos de calos cultivados utilizando $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (Figura 3). Indicando que no SUB2 ocorreu a maior absorvância (0,891), sugerindo, portanto, que o metabolismo celular é mais intenso durante

este período, e início de fase exponencial, onde se iniciam as divisões celulares, refletindo um claro aumento no número de células vivas bem como no seu metabolismo respiratório. O aspecto visual da coloração dos calos após a extração de formazan foi registrado (Figura 4).

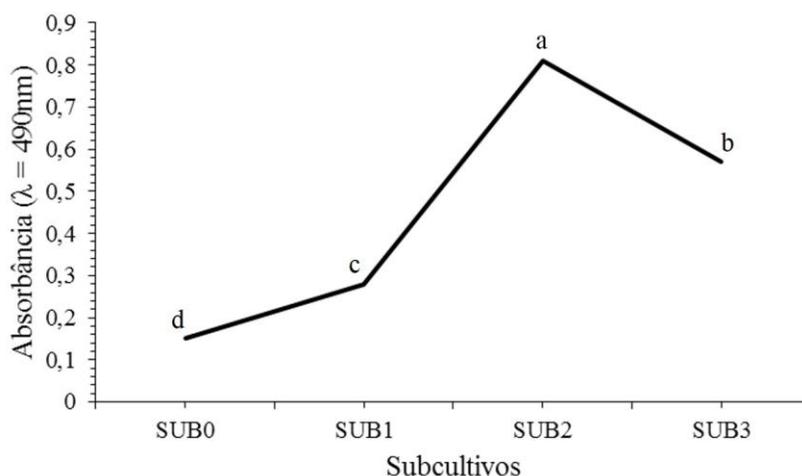


Figura 3. Média geral de absorvância para os três subcultivos (SUB1, SUB2 e SUB3). Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si com nível nominal de significância de 5% pelo teste de Tukey (São João Del Rei, MG, 2012).

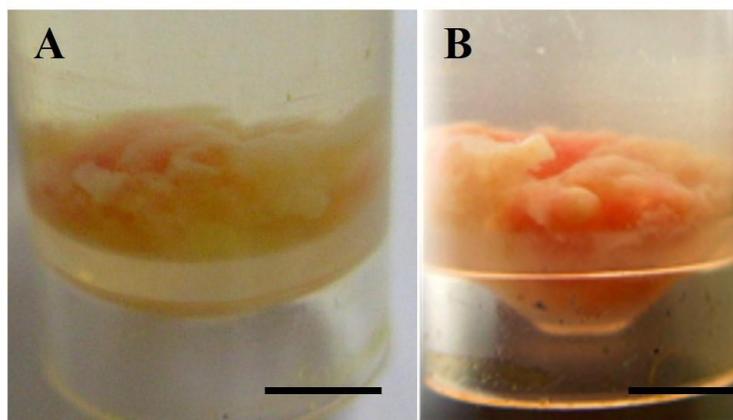


Figura 4. Aspecto visual de calos de gemas rizomatosas oriundos de meio de cultura MS suplementado com $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP após teste de viabilidade, observando coloração amarela no SUB1 (calo inviável) e no SUB2, apresentando coloração rosa (calo viável) (B) (São João Del Rei, MG, 2012).

Assim, conhecer os valores máximos de viabilidade pelo teste de CTT para cada subcultivo é relevante, pois podem auxiliar na tomada de decisão quanto ao tempo de subcultivo. A utilização do teste de CTT como medida de viabilidade tem sido reportada por muitos autores. Lyngved et al. (2008), trabalhando com massas pró-embriogênicas de *Cyclamen persicum*, também fizeram uso do teste de CTT. Xu & Huang (2008) testaram a viabilidade de raízes de *Agrostis scabra* submetidas a diferentes estresses por temperatura. Sadia et al. (2003), pesquisando os efeitos do descongelamento de suspensões celulares de *Solanum tuberosum* criopreservadas, utilizaram o teste de CTT como medida de viabilidade.

O CTT é uma substância solúvel em água que na sua passagem pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (AMUTHA et al., 2007) é convertida em formazan, uma substância insolúvel em água, mas solúvel em etanol (ZAPATA et al., 1991). O teste de CTT indica, portanto, não apenas a presença de células vivas, mas também, seu estado metabólico. Quanto maior o número de células vivas, e maior atividade metabólica, maior será a quantidade de formazan produzida, pois células mortas não convertem o CTT em

formazan, tornando um teste confiável para mensurar a viabilidade celular (NAM et al., 1998).

CONCLUSÕES

Altas taxas de formação de calos em gemas rizomatosas de gengibre ornamental ocorrem na presença de 1,6 mg L⁻¹ de BAP.

O teste de viabilidade utilizando CTT aponta que os calos devem ser subcultivados aos 20 dias (SUB2) após 30 dias de cultivo *in vitro*, quando atingem a fase exponencial de divisão celular.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMUTHA, R.; MUTHULAKSMI, S.; RANI, W.B.; INDIRA, K.; MAREESWARI, P. 2007. Physiological studies on evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high temperature stress. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, sl, v. 3, n. 4, p. 245-251.
- ASGHARI, R.; SALARI, A.; GHAREHDAGHI, S. 2014. Effect of

- pulsing solution and packaging type under exogenous ethylene on physiological characteristics and post harvesting quality of cut roses (*Rosa hybrida*). **American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Deira, v. 14, n. 4, p. 329-335.
- BARBOZA, T.J.S.; LAGE, D.A.; MOSS, V.B.; SOUZA, C.A.; ALBARELLO, N. 2014. Effect of different culture media and plant growth regulators for the optimization of callus induction of *Annona mucosa* (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 16, n. 4, p. 905-911.
- BENSON, E.E. **Cryopreservation**. 1994. In: DIXON, R.A.; GONZALES, R.A. (Ed.). *Plant cell culture – a practical approach*, Oxford: IRL, 2ª ed. 194p.
- BEZERRA, F.C.; LOGES, V. 2005. **Zingiberaceae**. In: TERAPO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; BARROSO, T.C.S.F. (Eds.) *Flores tropicais*. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 225p.
- CARVALHO, L.M.; BUENO, V.H.P.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; SILVA, R.A.; REIS, P.R. 2009. Pragas na floricultura: identificação e controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 249, p. 36-46.
- DUVAL, C.M. 2014. The flower production and family farming. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 241-241.
- FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042.
- FERREIRA, E.A.; PASQUAL, M.; REZENDE, J.C. 2015. Calogênese em plântulas de figueira. **Ceres**, Lavras, v. 54, n. 312, p. 112-117.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. 2008. **Plant propagation by tissue culture: 1**. The Background: 3ª ed. Springer, Dordrecht.
- GIACOMETTI, D. 1990. **Impacto atual da cultura de tecidos de plantas**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Empresa de Pesquisa Agropecuária, 7p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. **Micropropagação**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CBAB, v.1, p. 183-260.
- IBRAFLOR. **Números do setor: Mercado interno 2014**. Disponível em: www.ibraflor.com. Acesso em: 08 jan 2015.
- KAOUTHER, B.M.; NADHRA, E.; AHLEM, C.; JEMMALI, A.; DRUART, P. 2011. *In vitro* picloram-induced somatic embryogenesis from leaflets of cherry (*Prunus incisa* Thunb.). **Journal of Life Sciences**, New Delhi, v. 5, n. 1, p. 913-920.
- LAMAS, A.M. 2002. **Floricultura Tropical: técnicas de cultivo e pós-colheita de flores e folhagem**. Fortaleza: Instituto Frutal, 135p.
- LYNGEVED, R.; SNIPEN, L.G.; IVERSEN, T.H.; HVOSLEF-EIDE, A.K. 2008. Influence of potential growth factors on the production of proembryogenic masses of *Cyclamen persicum* Mill. in bioreactors. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 118, n. 2, p. 53-59.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497.
- NAM, B.H.; JIN, H.J.; KIM, S.K.; HONG, Y.K. 1998. Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 10, n. 1, p. 31-36.

- PTAK, A.; BACH, A. 2007. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, New York, v. 43, n. 1, p. 35-39.
- REIS, I.N.R.S.; LAMEIRA, O.A.; CORDEIRO, I.M.C.C. 2007. Indução da Calogênese em Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) Através da Adição de AIB e BAP. **Revista Brasileira de Biociências**, Bento Gonçalves, v. 5, n. S2, p. 501-503.
- RIBEIRO, T.R.; LOPES, G.G.O.; VIANNA, F.D. 2002. **Produção de Mudanças e Flores de Plantas Ornamentais Tropicais**. Petrolina, PE: Embrapa, 41p.
- RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. 2006. Arabidopsis cytokinins receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 1, p. 40-54.
- SADIA, B.; ANTONY, P.; LOWE, K.C.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. 2003. Culture treatments for enhancing post-thaw recovery of cryopreserved suspension cells of potato cv. *Desiree*. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wrocław, v. 8, n. 1, p. 979-989.
- SALINGER, J.P. 1991. **Producción comercial de flores**. Zaragoza: Acribia, 371p.
- SUNDARASEKAR, J.; Anthony, J.J.J.; Murugaiyah, V.; Subramaniam, S. 2012. Preliminary responses of 2, 4-D and BAP on callus initiation of an important medicinal-ornamental *Hymenocallis littoralis* plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, sl., v. 6, n. 11, p. 2088-2093.
- VIDIGAL, T.M.A.; SCHUSTER, I.; TEXEIRA, L.R.; COLAUTO, N.B. 2014. Regeneration of plants from two types of maize explants submitted to transformation by biolistic. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1804-1809.
- XU, C.; HUANG, B. 2008. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrotis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 15, p. 4248-4194.
- ZAPATA, M.J.; SALINAS, C.; CALDERÓN, A.A.; MUÑOZ, R.; BARCELÓ, A.R. 1991. Reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride by the KCN-insensitive, salicylhydroxamic acid-sensitive alternative respiratory pathway of mitochondria from cultured grapevine cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, p. 579-582.
- SHAH, Z.; SHAH, S.H.; PEOPLES, M.B.; SCHWENKE, G.D.; HERRIDGE, D.F. 2003. Crop residue and fertilizer N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 01-11.
- PIERIK, R.L.M. 1987. **In vitro culture of higher plants**. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 344.
- YEW, C.K.; BHAVANI, B.; JEEVANDRAN, S.; SREERAMANAN, S. 2010. The effect of cytokinins on *in vitro* shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. **African Journal of Biotechnology**, sl., v. 9, n. 44, p. 7446-7452.

Recebido em: 2/7/2015

Aceito para publicação em: 4/12/2015