

**MARCELO RODRIGUES**

**MORFOGÊNESE *in vitro*, ANÁLISE FITOQUÍMICA E  
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE NIM (*Azadirachta  
indica* A. Juss)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696m  
2009

Rodrigues, Marcelo, 1982-

Morfogênese *in vitro*, análise fitoquímica e  
caracterização anatômica de nim (*Azadirachta indica* A.  
Juss) / Marcelo Rodrigues. – Viçosa, MG, 2009.  
ix, 78f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Nim - Propagação *in vitro*. 2. Folhas - Anatomia.  
3. Histoquímica. 4. *Azadirachta indica*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

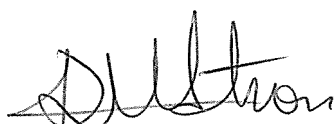
CDD 22.ed. 633.88378

MARCELO RODRIGUES

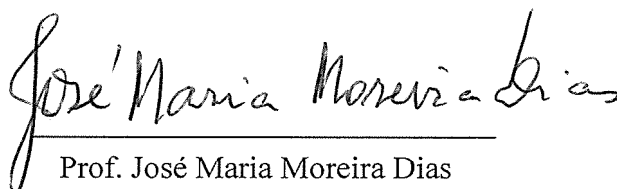
**Morfogênese *in vitro*, análise fitoquímica e caracterização  
anatômica de nim (*Azadirachta indica* A. Juss)**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*

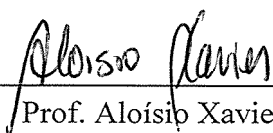
**APROVADA: 16 de julho de 2009**



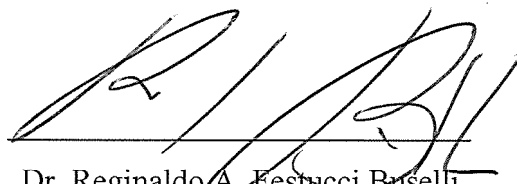
Prof.<sup>a</sup>. Renata M. S. Alves Meira



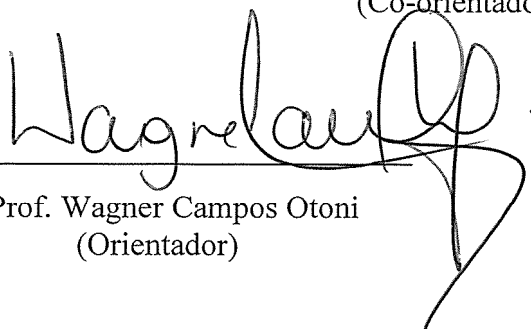
Prof. José Maria Moreira Dias



Prof. Aloísio Xavier



Dr. Reginaldo A. Festucci Buselli  
(Co-orientador)



Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar ao Autor da vida, Cristo Jesus, minha maior fonte de motivação em tudo que faço sem o qual eu seria como um barco à deriva, vivendo em minha própria justiça. Aos meus queridos pais Marcos Rodrigues e Marina Rodrigues, pelo grande amor, incentivo e pela confiança que depositam em minha vida. Ao meu irmão Marcos e sua esposa Mirela, assim como meu irmão Murilo e sua esposa Loênia, pelo grande apoio, entusiasmo e companheirismo.

Ao meu amigo, professor e exímio orientador Wagner Campos Otoni, que me ajudou a crescer profissionalmente com novas idéias, modo de ser e postura, além de fornecer oportunidades. Aos amigos co-orientadores Luzimar Campos da Silva e Reginaldo A. Festucci Buselli, que foram como colunas me auxiliando na condução e sustentação desse trabalho. Aos demais participantes da banca, José Maria Moreira Dias, Aloísio Xavier e Renata Maria Strozi Alves Meira, pelo grande apoio e colaboração.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela disponibilização do Laboratório de Análises Bioquímicas, e ao técnico Eduardo Rezende Pereira, pelo fundamental auxílio nas análises da azadirachtina.

Ao CNPq pela concessão da bolsa. À UFV, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao programa de pós-graduação em Botânica, pela sua excelência, contribuindo de modo efetivo na minha formação. Agradeço, também, a todos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas/BIOAGRO e Anatomia Vegetal, em especial o Thales e Diego, assim como todos que me ajudaram diretamente ou indiretamente em toda minha jornada no mestrado até a conclusão dessa obra. Aos meus amigos Caio, Lucas, Fabio e Gustavo que me ajudaram nesse percurso, edificando minha vida através do companheirismo e amizade.

São poucas palavras, mas sinceras e verdadeiras, pois por trás delas existe um contexto de vida pessoal, uma história e sentimentos. Por mais que eu tentasse expressar tudo isso em palavras, elas jamais poderiam demonstrar o real sentido do que sinto e procuro expressar em gestos e atitudes a fim de honrar a vocês quem me honraram. Fica aqui minha infinita gratidão a todos vocês, e que Deus vos abençoe muitíssimo e prospere vossos caminhos.

“Portanto, dai a cada um, o que deveis: a quem tributo, tributo; a quem imposto, imposto; a quem temor, temor; a quem honra, honra”. (Romanos cap. 13:7)

## BIOGRAFIA

MARCELO RODRIGUES, filho de Marcos Rodrigues e Marina Rodrigues, nasceu no dia 29 de julho de 1982, na cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil.

Ingressou no curso Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em 2003, concluindo o mesmo em 2007, com apresentação da monografia de conclusão do curso “Aspectos da germinação e calogênese *in vitro* de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.)” com auxílio financeiro de bolsa de iniciação científica do CNPq.

Atuou no ensino como professor titular da disciplina de Biologia do curso pré-vestibular PRÉ-UNI, no período de 2004 a 2007. Participou em projeto de extensão como membro do corpo de implantação de curso pré-vestibular para alunos carentes de Lavras e região, em parceria com a PRAECC/UFLA e prefeituras locais. Foi membro da comissão organizadora do Núcleo de Estudos em Fisiologia Vegetal (N.E.F)/UFLA em 2006.

Em fevereiro de 2008, ingressou no programa de pós-graduação em Botânica, em nível mestrado, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo-o em julho de 2009, com auxílio financeiro do CNPq.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	5

### **CAPÍTULO 1:** Influência da vedação dos frascos de cultivo com membranas de fluoropor e de reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Resumo.....	8
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Material e métodos.....	11
Resultados e discussão.....	14
Conclusões.....	20
Agradecimentos.....	21
Referências.....	22

### **CAPÍTULO 2:** Anatomia foliar de *Azadirachta indica* (Meliaceae) cultivada *in vivo*, *in vitro* e aclimatizada

Resumo.....	25
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e métodos.....	28
Resultados e discussão.....	31
Conclusões.....	41
Agradecimentos.....	42
Referências.....	43

**CAPÍTULO 3:** Efeito do BAP e ANA na organogênese e embriogênese *in vitro* em calos cotiledonares de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e métodos.....	49
Resultados e discussão.....	51
Conclusões.....	57
Agradecimentos.....	58
Referências.....	59

**CAPÍTULO 4:** Indução da biossíntese de azadirachtina em calos cotiledonares de nim a partir de agentes elicitores

Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	65
Resultados e discussão.....	68
Conclusões.....	74
Agradecimentos.....	75
Referências.....	76
Conclusões gerais.....	79

## RESUMO

RODRIGUES, Marcelo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Morfogênese *in vitro*, análise fitoquímica e caracterização anatômica de nim (*Azadirachta indica* A. Juss)** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Reginaldo A. Festucci Buselli e Luzimar Campos da Silva.

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente por nim, pertence à família Meliaceae, a qual apresenta grande potencial para a produção de azadirachtina (AZA); contudo, possui sementes recalcitrantes, polinização do tipo cruzada e teor variável de AZA. Com o objetivo de se entender os fatores que limitam o crescimento dessas plantas *in vitro* e a variação nos teores de AZA, foram conduzidos quatro experimentos: **i)** A propagação *in vitro* de nim pela cultura de segmentos nodais coletados; **ii)** Avaliação das anatômicas foliares de plantas cultivadas em três ambientes distintos (*in vivo*, *in vitro* e aclimatizado) por meio da técnica de micromorfometria; **iii)** Avaliação dos teores de AZA foram determinados por meio de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) em calos cotiledonares, cultivados em meio líquido WPM na ausência e presença de glicose (fonte de carbono), caseína hidrolisada (fonte de nitrogênio) e metil jasmonato (agente elicitador); **iv)** A propagação de embriões somáticos a partir de calos cotiledonares. Constatou-se que o meio MS apresentou os melhores resultados de taxa de brotação, número de folíolos e tamanho médio dos explantes em relação aos demais meios de cultivo (WPM e JADS). Não foi induzido enraizamento *in vitro* dos brotos, porém, o sistema radicular se desenvolveu *ex vitro*, durante a aclimatização, apresentando taxa de sobrevivência das mudas de 80%. Foi também analisado o conteúdo de lipídios gerais, óleos essenciais e óleos resinas, tanino e mucilagem. Verificou-se diferenças significativas na altura entre os tecidos foliares avaliados, epiderme adaxial e abaxial, assim como no mesofilo nos três ambientes de cultivo. Os testes histoquímicos evidenciaram que há produção de lipídios gerais, óleos essenciais e taninos em idioblastos foliares de nim enquanto o teste para mucilagem foi negativo nos três ambientes avaliados. As maiores concentrações de AZA (média de 0,2470  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) foram produzidas na primeira e segunda semana de cultivo na presença dessas três substâncias, demonstrando o efeito sinérgico quando a massa celular foi cultivada em meio suplementado com essas substâncias. Os calos apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias regenerativas, organogênese e embriogênese a partir do quarto subcultivo, em meio WPM, apresentando as maiores taxas de brotação e germinação de embriões somáticos. Os calos passaram do aspecto liso para o granular ao longo dos subcultivos, enquanto que a coloração passou de

marrom escuro para marrom claro e branco. A partir do sétimo subcultivo, houve redução brusca quanto à taxa de regeneração *in vitro* para ambos os tipos de calos cotiledonares de nim. Portanto, esse trabalho colaborou para maior entendimento das técnicas biotecnológicas visando a propagação *in vitro*, cultivo de células para produção de AZA e aspectos anatômicos de *A. indica*.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Marcelo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Morphogenesis *in vitro*, phytochemical analysis and anatomical characterization of neem (*Azadirachta indica* A. Juss).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Reginaldo A. Festucci Buselli and Luzimar Campos da Silva.

The *Azadirachta indica* A. Juss species, popularly known as neem, belongs to the Meliaceae family, which has great potential for azadirachtin (AZA) production; however, neem has recalcitrant seeds, cross-pollination and variable content of AZA. Four experiments were conducted in order to understand the *in vitro* growth limiting factors of these plants and changes in levels of AZA: **i)** *In vitro* propagation of neem by culture of collected nodal segments; **ii)** Evaluation of leaf anatomy of plants grown in three different environments (*in vivo*, *in vitro* and acclimatized), using the micromorphometric technique; **iii)** Evaluation of levels of AZA, which were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in cotyledonary callus, grown in WPM liquid medium with absence and presence of glucose (carbon source), hydrolyzed casein (nitrogen source) and methyl jasmonate (elicitor agent); and, **iv)** The propagation of somatic embryos from cotyledonary callus. It was found that MS medium has presented the best results for shooting rate, leaflet number and average size of the explants as compared to others culture media (WPM and JADS). It was not induced *in vitro* rooting of shoots; however, the root system has developed *ex vitro* during acclimatization, with seedling survival rate of 80%. It was also assayed the general content of lipids, essential oils, resins and oils, tannins and mucilage. It was found that there are significant differences in height between the evaluated leaf tissues, adaxial and abaxial epidermis, as well as in the mesophyll from three environmental conditions. The histochemical assay showed that there is general production of lipids, essential oils and tannins in leaf idioblasts of neem, meanwhile the mucilage test showed negative results for the three evaluated locations. The highest concentrations of AZA (mean 0.2470 mg g<sup>-1</sup>) were produced in the first and second cultivation week in the presence of these three substances, demonstrating the synergistic effect when the cell mass was cultured in medium supplemented with these. Calli showed high propagation capacity by both regenerative routes organogenesis and embryogenesis starting from the fourth subculture in WPM medium presenting the highest shooting and somatic embryos germination rates. Calli went from a smooth to granular appearance during the subcultures, while color went from dark brown to light brown and white. From the seventh subculture, there was dramatic reduction of *in vitro* regeneration rate for both

types of neem cotyledonary callus. Therefore, this work has contributed for a better understanding of biotechnology techniques aiming the *in vitro* propagation, cell cultivation for AZA production and anatomical aspects of *A. indica*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss), Amargosa, *syn Antelara azadirachta* ou *Melia azadirachta* L. pertence à família Meliaceae (Cunha, 2002). Sua origem é asiática, sendo natural de Burma e das regiões áridas do subcontinente indiano, onde existem, aproximadamente, 18 milhões de árvores. O nim é usado na medicina humana e animal, na indústria cosmética, no reflorestamento, como madeira de lei, como adubo verde, assim como em paisagismo. Por isso é cultivada atualmente na Austrália, países da África, e nas Américas (Neves et al., 2003).

Essa planta é resistente a climas secos e de crescimento rápido, podendo atingir até 25 m. O fruto é uma baga ovalada com 15 a 20 mm de comprimento e, quando maduro, apresenta polpa amarelada e casca (tegumento) branca dura contendo um óleo marrom no interior de uma semente ou, raramente, em duas (Neves & Nogueira, 1996).

A espécie produz mais de 300 metabólitos secundários, um terço dos quais são tetranotriterpenóides (limonóide) com diferentes aplicações comerciais e efeitos biológicos (Dai et al., 2001). Os princípios ativos mais conhecidos são: azadirachtina (AZA) (inseticida e repelente de insetos), nimbin (espermaticidade e antiinflamatório em vertebrados) e salanim (repelente a insetos). A AZA (Figura 1) é o metabólito mais importante e mais abundante, produzido pela *A. indica* (Mordue & Blackwell, 1993). Um número considerável de outros componentes foi isolado das sementes de nim, tais como: solanina, solanol, solanoacetato-3-dia-acetilsolanina, azadiractinadiradiona, 14-epoxia-zaridiona, gedunim, nimbineur e diacetil nimbinim (Neves et al., 2003).

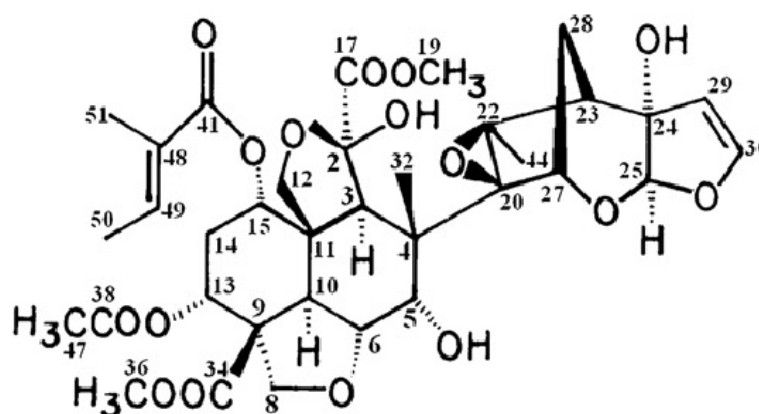
O nim e seus derivados chegam a afetar mais de 400 espécies de insetos das ordens *Coleoptera*, *Diptera*, *Heteroptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera* e *Neuroptera*, além de alguns fungos. Os extratos dessa planta provocam alterações na metamorfose, inibição do crescimento, malformação, redução da fertilidade e mortalidade, principalmente de certos artrópodes que ingerem ou entram em contato com substratos (Cunha, 2002).

O estudo do comportamento alimentar de diversas larvas como (*Spodoptera littoralis* e *Mamestra brassicae*), mostrou que a AZA reduziu o consumo alimentar das espécies testadas. Fêmeas de alguns gêneros de dípteros tiveram a oviposição detida, assim como alguns coleópteros (*Callosobruchus* sp.) em grãos armazenados (Neves et al., 2003).

A AZA pode provocar alterações no desenvolvimento de insetos, apresenta efeitos repelente e intoxicante, afetando a biologia, a oviposição e a viabilidade dos

ovos (Neves & Nogueira, 1996). A atividade inseticida do nim foi publicada pela primeira vez em 1958 por Chopra.

Entretanto, o primeiro inseticida comercial de nim foi registrado pela “Environmental Protection Agency” (APE) em 1985, para utilização em culturas não alimentares (Jacobson, 1988; Larson, 1993) e, desde então, o número de produtos comerciais utilizando essa espécie tem aumentado acentuadamente, como por exemplo, a produção de AZA pela empresa americana “Agridyne Technologies”. Posteriormente, a APE recebeu aprovação para utilização em culturas alimentares (Johnson et al., 1996).



**Figura 1:** A estrutura da molécula de AZA é um tetranotriterpenóide produzido em *Azadirachta indica*, armazenada principalmente nas sementes e folhas, sua fórmula molecular é  $C_{35}H_{44}O_{16}$ .

Apesar do potencial apresentado para a produção de AZA, o nim possui sementes recalcitrantes e polinização do tipo cruzada, causando sérios problemas na seleção de mudas uniformes, devido à perda da viabilidade das sementes e alta variabilidade genética. Esta afeta consideravelmente o teor de AZA em mudas, dificultando ainda mais a seleção de plantas potenciais (Ermel et al., 1986) e sua bioatividade (Singh, 1987). Além disso, as sementes de nim geralmente perdem a viabilidade após um mês de armazenamento, e muitas sementes perdem o vigor, podendo causar anormalidades durante o processo de germinação e desenvolvimento. Isso tem causado sérios problemas para a conservação dos recursos genéticos vegetais e para o estabelecimento de plantações em larga escala (Gamene et al., 1996).

A biotecnologia vegetal tem sido considerada útil para produção de clones, uma vez que o cultivo *in vitro* permite a obtenção de plantas idênticas à matriz (Torres & Caldas, 1990). Dentre os explantes que vêm sendo utilizados para clonagem de nim,

destacam-se folhas de árvores adultas (Ramesh & Padhya, 1990; Eeswara et al., 1998) e de gemas axilares coletadas de plantas de 2 a 5 anos de idade (Joshi & Thengane, 1996). Outra técnica utilizada é a organogênese indireta, a partir de calos de diferentes explantes jovens (Salvi et al., 2001) e de anteras (Gautam et al., 1993). Vários estudos e protocolos têm sido elaborados e propostos visando a maior produtividade de embriões somáticos. Nestes, já foram utilizados explantes de segmentos nodais (Yasseen, 1994; Drew 1996) e explantes foliares (Eeswara et al., 1998).

Durante o processo de aclimatização das plantas crescidas *in vitro*, ocorrem mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas, tornando-as capazes de crescer nesse novo ambiente (Sutter et al., 1992). Isto pode causar estresse para as plantas, sendo um fator limitante no processo de morfogênese *in vitro* (Sutter, 1988). As alterações anatômicas nas plantas cultivadas *in vitro* podem inviabilizar a aclimatização das mesmas (Albarello et al., 2001). Estudos anatômicos abordando essa plasticidade fenotípica, assim como testes histoquímicos para se identificar os sítios celulares e subcelulares onde provavelmente ocorre a biossíntese da AZA, dentre outros compostos de interesse em *A. indica* são desconhecidos.

Existem vários obstáculos que necessitam ser superados para que se possa produzir eficientemente AZA em escala industrial, seja por meio do cultivo tradicional de plantas melhoradas geneticamente, por meio de engenharia genética ou por meio do cultivo de células, tecidos e órgãos. Dentre eles destaca-se: **a)** a influência do sistema de vedação dos frascos; **b)** o estabelecimento de protocolo de propagação *in vitro* de nim via organogênese e, ou embriogênese que é pouco conhecido; **c)** o desenvolvimento de um protocolo para a obtenção da cultura de calos e células em suspensão que possibilite a produção em escala comercial otimizado; e, **d)** a análise dos aspectos anatômicos abordando a plasticidade fenotípica, assim como a identificação dos sítios celulares e subcelulares onde ocorre a biossíntese da AZA. A superação desses obstáculos pode ser particularmente útil para obtenção de calos, células em suspensão e clones que apresentem produção homogênea do princípio ativo desejado, assim como a compreensão do processo de biossíntese de AZA.

O presente trabalho teve como objetivos principais: **i)** a realização da propagação *in vitro* de nim pela cultura de segmentos nodais coletados de plantas com seis meses, cultivadas em casa de vegetação; **ii)** a identificação e quantificação das diferenças anatômicas foliares de plantas cultivadas em três ambientes distintos *in vivo*, *in vitro* e *ex vitro*, por meio da técnica de micromorfometria, assim como a aplicação de testes histoquímicos; **iii)** a análise dos teores de AZA por meio de Cromatografia

Líquida de Alto Desempenho (HPLC) em calos cotiledonares; e, **iv**) a propagação de plantas a partir de embriões somáticos derivados de calos cotiledonares.

Portanto, esse trabalho propõe a utilização da biotecnologia para propagação *in vitro* de *A. indica*, visando ao melhoramento da espécie, à caracterização anatômica foliar de plantas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas, bem ainda o cultivo de células para produção de AZA, devido a importância e valor econômico do composto.

## REFERÊNCIAS

ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S.F.L.; VIANA, V.R.C. & NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 35–46, 2001.

CHOPRA, R.N. The neem (*Melia azadirachta* L. - Meliaceae). In: CHOPRA, R.N. (Ed.). **Indigenous drugs of India**. 2<sup>nd</sup> ed. Nova Delhi: Academic Publishers, p. 360–363, 1958.

CUNHA, R.A.S. Nim indiano: a árvore milagrosa. **Vetores & Pragmas**, v. 4, p. 1–5, 2002.

DAI, J.; YAYLAYAN, V.; VIJAYA, A.; RAGHVAN, G.S.; PARE, J.R. & LIU, Z. Multivariate calibration for the determination of total AZRL and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1169–1174, 2001.

DREW, R. Clonal propagation of neem by tissue culture. In: SINGH, R.P.; CHARI, M.S.; RAHEJA, A.K. & KRAUS, W. (Eds.). **Neem and environment**. Science Publishers, Inc., Lebanon, New Hampshire, v. 2, p. 999–1005, 1996.

EESWARA, J.P.; STUCHBURY, T.; ALLAN, E.J. & MORDUE, A.J. A standard procedure for the micropropagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 215–219, 1998.

ERMEL, K.; PAHLICH, E. & SCHMUTTERER, H. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. **Proceedings of the third international neem conference**, Nairobi, p. 171–184, 1986.

GAMENE, C.S.; KRAAK, H.L.; PILJEN, J.G. & VOS, C.H.R. Storage behaviour of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds from Burkina Faso. **Seed Science and Technology**, v. 24, p. 441–448, 1996.

GAUTAM, V.; NANDA, K. & GUPTA, S. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss – a medicinal tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 13–18, 1993.

JACBSON, M. Focus on phytochemical pesticides. In: JACBSON, M. (Ed.). **The neem tree**, Boca Raton: CRC Press, p. 101–104, 1988.

JOHNSON, S.; MORGAN, E.D. & PEIRIS, C.N. Development of the major triterpenoids and oil in the fruit and seeds of neem (*Azadirachta indica*). **Annals of Botany**, v. 78, p. 383–388, 1996.

JOSHI, M. & THENGANNE, S. Potential application of *in vitro* methods for propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). In: CHARI, M.S.; RAHEJA, A.K. & KRAUS, W. (Eds.). **Neem and Environment**. Science Publishers, Inc., New Hampshire v. 2, p. 967–973, 1996.

LARSON, L.L. Materials under trial: information on composition, formulation and suppliers. **Insecticide Acaricide Tests**, v. 18, p. 375–390, 1993.

MORDUE, A.J. & BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p. 903–924, 1993.

NEVES, B.P. & NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)**, Goiânia: EMBRAPA, CNPAF; APA, (Circular Técnica, nº 28), 32p., 1996.

NEVES, B.P.; OLIVEIRA, I.P. & NOGUEIRA, J.C.M. **Cultivo e utilização do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.)**, Goiânia: EMBRAPA, CNPAF. APA (Circular Técnica, nº 62), 31p., 2003.

RAMESH, K. & PADHYA, M.A. In vitro propagation of neem, *Azadirachta indica* (A. Juss), from leaf discs. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 932–935, 1990.

SALVI, N.D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S. & EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 159–162, 2001.

SINGH, R.P. Comparison of antifeedant efficacy and extract yields from different parts and ecotypes of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) tree. In: SCHMUTTERER, H. & ASCHER, K.R.S. (Eds.) Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.) and other tropical plants. **Proceedings of the 3rd international neem conference, Nairobi, German Agency for Technical Cooperation, Eschborn**, p. 185–194, 1987.

SUTTER, E. & NOVELLO, S.K. Physiological and anatomical aspects of water stress of cultured plants. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 113–119, 1988.

SUTTER, E.G.; SHACKEL, K. & DÍAZ, J.C. Acclimatization of tissue cultured plants. **Acta Horticulturae**, v. 314, p. 115–119, 1992.

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

YASSEEN, Y.M. Shoot proliferation and plant formation from neem with thidiazuron. **Hortscience**, v. 29, p. 515, 1994.

## CAPÍTULO 1

### **Influência da vedação dos frascos de cultivo com membranas de fluoroporo e de reguladores de crescimento na propagação *in vitro* de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.)**

#### **RESUMO**

As sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) apresentam recalcitrância e as técnicas de propagação *in vitro* oferecem vantagem para a seleção fenotípica, uniformidade e taxa de multiplicação potencialmente rápida em relação aos métodos convencionais de cultivo. Com o objetivo de se otimizar o sistema de propagação *in vitro* de nim, foram avaliados **i**) diferentes meios de cultivo (MS, JADS e WPM); **ii**) diferentes concentrações de reguladores de crescimento (BAP, KIN e ANA); e, **iii**) uso de membranas fluoroporo hidrofóbica para a vedação dos frascos. Os segmentos nodais cultivados em meio MS apresentaram as maiores taxas de brotação por explante (1,67%), maior número médio de folíolos (4,58) e os maiores tamanhos (1,23 cm) em relação aos meios JADS e WPM. Os explantes cultivados em frascos vedados com tampas contendo 2 membranas PTFE e meio MS (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA) apresentaram um maior número (4,04), comprimento (5,38 cm) de brotações e número de folíolos (53,4). Tais brotações apresentavam vigor, enquanto que as cultivadas em frascos sem a presença de membranas, freqüentemente apresentavam senescência das folhas. As plantas que foram aclimatizadas em substrato contendo fibra de côco e compostagem de casca de eucalipto proporção (1:1) apresentaram oitenta por cento de sobrevivência. O processo de propagação *in vitro* foi mais eficiente, quando os segmentos nodais foram cultivados em meio MS, contendo BAP, KIN e baixa concentração de ANA, na presença de frascos com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios, cobertos com membrana fluoroporo hidrofóbica, que possibilitou aumento nas trocas gasosas.

**Palavras chave:** Propagação *in vitro*, 6-benzilaminopurina (BAP), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA), cinetina (KIN), trocas gasosas.

## **Influence of flask sealing with hydrophobic fluopore membrane and growth regulators in *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)**

### **ABSTRACT**

The seeds of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) are recalcitrant and *in vitro* propagation techniques offer the advantage to phenotypic selection, consistence and potentially rapid multiplication rate as compared to conventional cultivation methods. In order to optimize the *in vitro* propagation system of neem, it was evaluated: **i)** different culture media (MS, WPM and JADS); **ii)** different growth regulators concentrations (BAP, KIN and NAA); and, **iii)** use of fluoroporo hydrophobic membranes to seal flasks. Nodal segments cultured on MS medium showed the highest shooting rates per explant (1.67%), the highest mean number of leaflets (4.58) and the largest sizes (1.23 cm) as compared to JADS and WPM media. The explants cultured in sealed with caps flasks containing 2 PTFE membranes and MS medium (0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.5 mg L<sup>-1</sup> KIN, 0, 05 mg L<sup>-1</sup> NAA) showed a high number (4,04) and length (5.38 cm) of shoots and number of leaflets (53.4). These shoots grew intensely; meanwhile those grown in flasks without the presence of membranes, often presented leaf senescence. The plants which were acclimatized in a ratio (1:1) of coconut fiber and eucalyptus bark composted substrate showed 80% survival. The *in vitro* propagation process was more efficient when nodal segments were cultured on MS medium containing BAP, KIN and low concentration of NAA in the presence of flasks with rigid polypropylene two hole cap, covered with fluoroporo hydrophobic membrane, which enabled increase in gas exchange.

**Keywords:** 6-benzylaminopurine (BA),  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA), kinetin (KIN), gas exchanges, micropropagation, *Azadirachta indica*

## INTRODUÇÃO

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss), que literalmente significa “árvore generosa livre da Índia”, pertence à família Meliaceae. É nativa de Burma e de regiões áridas do subcontinente Indiano (Akula et al., 2003). Devido as suas propriedades medicinais e ação repelente contra insetos pragas, o nim tem sido descrito como uma planta promissora conforme apresentado pelo National Research Council – USA (1992).

Do ponto de vista químico, uma característica comum a todas as espécies dessa família é a presença de triterpenos oxigenados, limonóides (tetranotriterpenóides), conhecidos como meliacinease. Entre esses compostos, a azadirachtina (AZA) é o mais ativo agente anti-alimentar, estando presente nas folhas e principalmente nas sementes (Oliveira et al., 2005; Shahin-uz-zaman et al., 2008).

Devido à recalcitrância de suas sementes, técnicas como a propagação *in vitro* oferecem vantagem para a seleção fenotípica, uniformidade e taxa de multiplicação potencialmente rápida em relação aos métodos convencionais de cultivo de nim (Quraishi et al., 2004). A propagação de nim tem sido relatada utilizando-se explantes foliares de árvore adultas (Ramesh & Padhya, 1990; Eeswara et al., 1998), gemas axilares (Joshi & Thengane, 1996) e também pela via indireta com formação de calos (Salvi et al., 2001).

Os principais problemas enfrentados no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas são: dificuldade para enraizamento dos explantes, contaminação bacteriana e fúngica, além de oxidação fenólica e baixa trocas gasosas entre o recipiente de cultivo e o meio externo (Assis et al., 2004). Diante desse problema em especial, tem-se aplicado membranas nas tampas de frascos, favorecendo o mecanismo de trocas gasosas, resultando em maior desenvolvimento dos explantes cultivados *in vitro*.

Ao analisar os padrões de crescimento de *Pfaffia glomerata* na presença de fonte de carboidrato, independente do tipo de tampa utilizada, as folhas apresentaram organização bem definida. Já as plantas cultivadas sem sacarose e com duas membranas apresentaram organização típica das plantas cultivadas *in vitro*. No entanto, esse tratamento apresentou maior área foliar entre os tratamentos, e seu crescimento não ficou comprometido (Iarema, 2008).

O presente trabalho tem como objetivo otimizar o sistema de propagação *in vitro* de nim, por meio do aumento das trocas gasosas com utilização de membranas fluoroporo hidrofóbica, avaliar três meios de cultivo (MS, JADS e WPM) e combinação dos reguladores de crescimento BAP, KIN e ANA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Indução de brotações

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Utilizou-se segmentos nodais como fonte de explantes, obtidos a partir de ramos jovens de 5 matrizes de nim, selecionadas dentre 10. Para selecionar as 5 melhores matrizes, foi quantificado o número de brotações sobreviventes em meio MS basal após 25 dias de cultivo.

Tais plantas são provenientes do viveiro Nim Brasil, da cidade de São José do Rio Preto (SP), estabelecidas a partir de sementes e desenvolvidas com idade média de 6 meses, em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal da UFV. Tais matrizes foram submetidas a podas e adubação periódica a cada 60 dias, induzindo novas brotações.

Para a indução de brotações *in vitro*, os explantes, contendo uma gema lateral cada, foram imersos em água destilada imediatamente após a coleta. Posteriormente, efetuou-se a padronização das amostras (20 mm) e foram imersos novamente em água destilada. Após a padronização, foi realizada a primeira fase de assepsia com a imersão dos explantes em álcool etílico a 70 % v/v por um minuto sob agitação. Em seguida, os segmentos foram submetidos à solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 50 % v/v, com adição de 3 gotas da solução Tween 20, durante cinco minutos sob agitação. Logo após esse processo, as amostras foram submetidas a três sucessivas lavagens com água destilada autoclavada, para a retirada completa de toda a solução ácida e emulsiva.

Na seqüência, os explantes foram transportados para a câmara de fluxo laminar, para início da segunda fase da assepsia, sendo o material imerso novamente em álcool etílico a 70 % v/v durante 1 minuto sob agitação e enxaguados três vezes, em água desionizada e autoclavada, sob agitação. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 X 150 mm), coberto com tampas de polipropileno, contendo 10 mL de meio de cultura, previamente aferido o pH para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave a 120 °C e pressão 1,5 kgf cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos.

Foram testados os meios [WPM (Lloyd & McCown, 1981), MS (Murashige & Skoog, 1962) e JADS (Correia et al., 1995)], adicionado de 3 % (p/v) de sacarose; 1,0 g L<sup>-1</sup> de PVP (Polivinilpirrolidona) e 0,6 % (p/v) de Ágar Merck®. Os mesmos foram

mantidos em sala de crescimento a  $27 \pm 2$  °C de temperatura, irradiância de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, a fim de definir o melhor meio para estabelecer e cultivar segmentos nodais *in vitro* de nim. Após 25 dias de cultivo, os tratamentos foram avaliados por meio da contagem do número médio de brotações por explante, tamanho médio das brotações e número de folhas por brotação, aplicando esse método de avaliação para os subcultivos posteriormente.

Na segunda etapa (subcultivo II), foi adicionado  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) no melhor meio de cultura para espécie em estudo, distribuídos nos seguintes tratamentos: T1 ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA); T2 ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA); e T3 ( $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  ANA).

Na terceira etapa (subcultivo III), o melhor tratamento foi selecionado e adicionado  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada (CH) em meio MS completo e com meia força (MS/2), tratados com diferentes concentrações de BAP, cinetina (KIN) e ANA, formando os seguintes tratamentos: T1 (MS controle); T2 (MS +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  ANA); T3 (MS +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA); T4 (MS/2 controle); T5 ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  KIN +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  ANA); e T6 (MS/2 +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA). Dos seis tratamentos, foram selecionados os T2, T3 e T6, para o subcultivo IV. Ao final de 25 dias após a avaliação, foi selecionado o melhor tratamento dentre os três.

Os explantes foram subcultivados a cada 25 dias em frascos de vidro de 50 mm de diâmetro x 90 mm de altura, com capacidade aproximada de 280 mL no segundo subcultivo e frascos de vidro de 50 mm de diâmetro x 120 mm de altura, com capacidade aproximada de 370 mL no terceiro e quarto subcultivo, contendo 40 mL de meio de cultivo por frasco. Os frascos foram vedados com dois tipos de tampas: i) tampas rígidas de polipropileno (TR) autoclavável; e ii) com dois orifícios de 10 mm (T2M), cobertos com membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE) de  $0,22 \mu\text{m}$  de poro (MilliSeal® Air Vent, Tóquio, Japão).

### **Enraizamento *in vitro* das brotações**

Brotações obtidas a partir de segmentos nodais cultivados *in vitro* e submetidos aos tratamentos descritos anteriormente foram inoculadas no melhor meio de cultura avaliado (T2), com adição de diferentes concentrações de ácido-indol-3-butírico (AIB)

para enraizamento, compondo os seguintes tratamentos: T1 (controle); T2 (0,5 mg L<sup>-1</sup>); T3 (1 mg L<sup>-1</sup>); T4 (1,5 mg L<sup>-1</sup>) e T5 (2 mg L<sup>-1</sup>). Nessa etapa a KIN foi suprimida e a concentração de BAP reduzida para 0,2 mg L<sup>-1</sup>. Após 30 dias de cultivo, foi avaliado o número de brotações com raízes, o número de raízes por brotação e o comprimento médio das raízes. Porém, devido à baixa taxa de enraizamento *in vitro*, os brotos foram aclimatizados, ocorrendo enraizamento na etapa *ex vitro*.

### **Aclimatização**

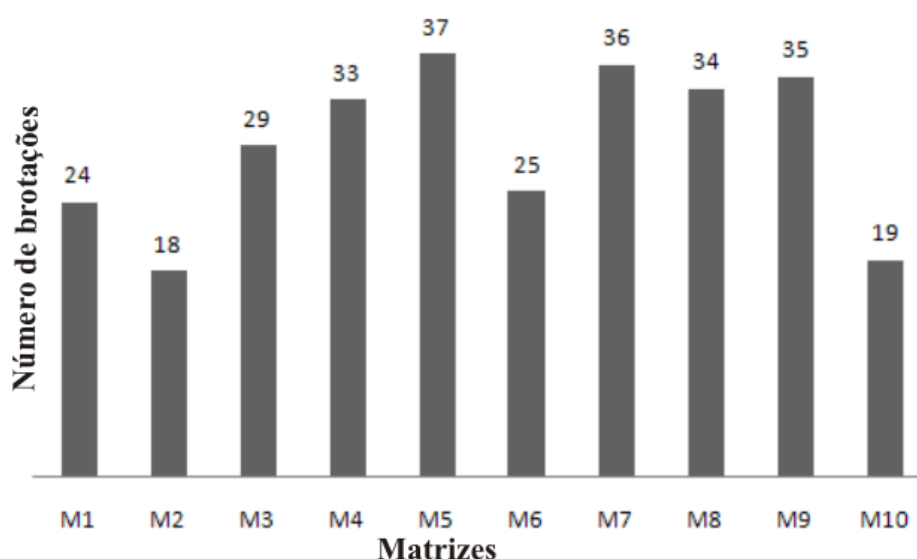
As brotações obtidas *in vitro* não foram enraizadas nesse ambiente. No entanto, houve desenvolvimento das mesmas no ambiente *ex vitro* durante a aclimatização feita em copos plásticos contendo diferentes substratos: i) fibra de coco triturada; ii) fibra de coco triturada e compostagem de casca de eucalipto (Eucatex, São Paulo) na proporção de 1:1 (v/v); e, iii) compostagem de casca de eucalipto. Após a transferência, as plantas foram envolvidas por sacos plásticos transparentes, para manutenção da umidade relativa do ambiente, sendo mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de 25 ± 1 °C e irradiância de 14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> inicialmente, aumentando-se gradualmente até 75 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante 20 dias, depois transferidas para casa de vegetação. Após a fase de aclimatização, avaliou-se a taxa de sobrevivência das brotações dentro de cada tratamento.

### **Delineamento experimental**

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), 12 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante, onde o número de parcelas experimentais corresponde à quantidade de tratamentos avaliados em cada subcultivo multiplicado por 12. 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 um nível de significância de 5 % para as seguintes características: número de brotações, número de folíolos e tamanho dos explantes. Para senescência e número de explantes com presença de calos na base, foi feita estatística descritiva com base nos valores médios.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das dez matrizes cultivadas como fonte de explante, foram coletados 40 segmentos nodais de cada uma, totalizando 400 amostras. Ao término de 25 dias de cultivo, foi avaliado o número de explantes sobreviventes, das quais foram selecionados os cinco melhores genótipos para serem cultivados *in vitro* (Figura 1).



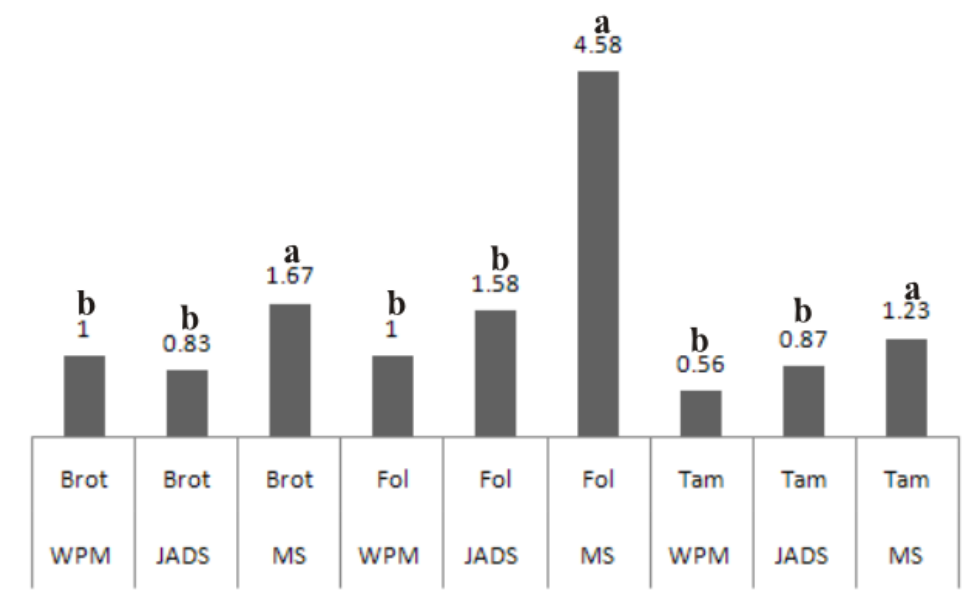
**Figura 1:** Número de brotações de *Azadirachta indica* sobreviventes após 25 dias de cultivo *in vitro* de segmentos nodais provenientes de 10 plantas matrizes (M1-10), em meio MS.

De acordo com os resultados obtidos da estabilização dos segmentos nodais *in vitro*, foram selecionadas, com base nas taxas de sobrevivência (%), as seguintes matrizes como fontes de explantes para a continuidade da experimentação: M5 (92,5 %), M7 (90 %), M9 (87,5 %), M8 (85 %) e M4 (82,5 %), onde a média geral dos 5 genótipos selecionados foi de 87,5% de sobrevivência.

Após a fase de estabilização, foi avaliado o número de brotações por explante, o número de folíolos e o comprimento de brotações após 25 dias de cultivo em três meios de cultivo: WPM, JADS e MS. O teste foi significativo para as características analisadas pelo teste de Tukey a 5 %, no qual o meio de cultura MS apresentou-se superior em relação aos demais para cultivo de segmentos nodais *in vitro* de nim, com taxa média de brotação por explante correspondente a (1,67), número médio de folíolos (4,58) e tamanho médio (1,23 cm) conforme apresentado na Figura 2.

Trabalhos anteriores relatam o cultivo *in vitro* e regeneração de nim utilizando anteras como fonte de explante (Gautam et al., 1993) e através de sementes maduras (Murthy & Saxena, 1998). Kearney (1994) relatou a formação de brotos a partir de

folhas em meio contendo BA e formação de gemas utilizando BA e AIA em meio MS. No entanto, Quraishi et al. (2004) obtiveram resultado significativamente melhor utilizando o meio DKW, que por sua vez possui maior concentração de sais em relação ao meio MS, com adição de 0,22  $\mu\text{M}$  de BA.



**Figura 2:** Avaliação do número médio de brotações (Brot), número de folíolos (Fol) e tamanho médio dos explantes (Tam), cultivados em meio WPM, JADS e MS, após 25 dias de cultivo. Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

A formação de brotos a partir de calos cotiledonares, no segundo e terceiro subcultivos, foi relatada por Rodrigues et al. (2009), utilizando-se 2  $\text{mg L}^{-1}$  de BA, resultando em média, 11 propágulos por explante. No presente trabalho os explantes foram cultivados em frascos com tampa rígida (TR) e com duas membranas (T2M) para aumentar as trocas gasosas, além da adição de diferentes concentrações de BAP e ANA, a partir do segundo subcultivo.

Os resultados estão descritos no Quadro 1. Para característica número de brotações o teste foi significativo, apresentando maior valor no subcultivo IV, em frasco com duas membranas e no tratamento T2 contendo 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  BAP + 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de KIN + 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA. O terceiro subcultivo com duas membranas apresentou a maior média (53,4) no número de folíolos. O tratamento mais promissor foi o T3, contendo 1  $\text{mg L}^{-1}$  BAP, 1  $\text{mg L}^{-1}$  de KIN e 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA. Do mesmo modo, o tratamento T3 apresentou maior média para a característica tamanho dos explantes (5,38 cm). Esse valor foi registrado no terceiro subcultivo na presença de frascos com duas membranas.

**Quadro 1:** Valores médios das características: número de brotações, número de folíolos e comprimento de brotações em função dos subcultivos (II, III e IV) e presença (T2M) ou ausência (TR) de membranas para troca gasosa

	TR			T2M		
	II	III	IV	II	III	IV
<b>Subcultivos</b>						
<b>Nº. de brotações</b>	2,58 c	3,41b	3,50 b	3,25 b	4,04 a	4,26 a
<b>Nº. de folíolos</b>	5,91c	4,58 c	4,50 c	37,1 b	53,4 a	50,9 a
<b>Comprimento (cm)</b>	1,28 c	1,53 c	1,59 c	3,88 b	5,38 a	5,34 a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Após o quarto subcultivo, o tratamento T2 contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de KIN +  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA com duas membranas, foi selecionado dentre os outros tratamentos, por apresentar melhores resultados, mantendo-se suas médias até o sexto subcultivo. De acordo com Ribeiro et al. (2009), avaliou-se, também, a influência do tipo de vedação no cultivo de berinjela durante a indução de embriogênese somática e organogênese. Os frascos foram vedados com filme plástico de PVC transparente, com tampa de polipropileno autoclavável (TR) e a mesma tampa contendo duas membranas (T2M). Observou-se que as plântulas mantidas nos frascos com T2M foram mais vigorosas, apresentando uma maior taxa de crescimento e desenvolvimento dos órgãos vegetativos.

Santos (2007), ao utilizar quatro tipos de vedações: 1) filme plástico de PVC transparente; 2) tampa rígida de polipropileno autoclavável sem orifício (TR); 3) tampa rígida de polipropileno com uma (T1M) e com duas membranas (T2M), permeáveis às trocas gasosas, associadas a diferentes concentrações de sacarose, verificou após 60 dias de cultivo de videira, que o número de folhas, a área foliar, o comprimento da parte aérea das plantas, assim como o comprimento do sistema radicular foram maiores em videira cultivada em frascos com uma e duas membranas, havendo interação com diferentes concentrações de sacarose até  $20 \text{ g L}^{-1}$ , conferindo características favoráveis para aclimatização *ex vitro*.

No presente trabalho, foi observada nos subcultivos em frascos com tampas sem membranas a presença de folhas com aspecto amarelo, clorótico e freqüentemente

ocorreu senescência das mesmas. Nos tratamentos com maiores concentrações de reguladores de crescimento, na presença ou ausência de membranas, observou-se a formação de calos na base dos explantes.

Plantas cultivadas *in vitro* crescem sob alta umidade relativa do ar, baixa luminosidade e trocas gasosas restritas, resultando em baixas taxas de transpiração e fotossíntese (Mosaleeyanon et al., 2004). Geralmente, os explantes *in vitro* são mantidos em frascos vedados, o que pode, dependendo do tipo de vedação, provocar baixa troca de ar entre o ambiente externo e interno (Tsay et al., 2006). A influência do sistema de vedação dos frascos, ainda não explorado em nim, é um dos vários fatores que limitam o crescimento de plantas *in vitro*.

Segundo Chaturvedi et al. (2004), após 5 semanas do cultivo de segmentos nodais de nim em meio MS/2 com adição de 1  $\mu\text{M}$  de BAP + 0,5  $\mu\text{M}$  de GA<sub>3</sub>, houve o surgimento de vários brotos e formação de calos na região basal dos explantes. Posteriormente, tais explantes foram subcultivados em meio MS/2 + 1  $\mu\text{M}$  de BAP + 250 mg L<sup>-1</sup> de CH. No entanto, as plantas não eram saudáveis, ocorrendo amarelecimento e abscisão foliar após 4 semanas de cultivo. Em média, houve formação de 7,5 brotos por explante. Contudo, o maior número dos brotos permaneceu compacto e pequeno, com média de 0,7 cm. A taxa média de enraizamento dos brotos formados *in vitro* de nim foi de 70 %, e a taxa média de sobrevivência foi de 87 %.

Após essa etapa, iniciou-se a indução do enraizamento *in vitro*. Porém, nessa etapa o resultado não foi significativo e nem satisfatório no presente estudo, pois ocorreu formação de poucas raízes e com aspecto afilado (dados não apresentados). Mas o processo desenvolveu-se bem durante a fase de aclimatização dos explantes, formando raízes grandes e espessas após 15 dias de cultivo em ambiente *ex vitro*. Pode-se observar que as plantas de nim cultivadas à partir de segmentos nodais, foram propagadas com a omissão da fase de enraizamento *in vitro* (Figura 3).

Em relação ao alongamento médio, segundo Chaturvedi et al. (2003), 80 % dos brotos atingiu, ao final de 5 semanas de cultivo, cerca de 4 cm com 3-4 nós. O alongamento dos brotos multiplicados via gemas axilares, foi realizado em meio MS com adição de 1  $\mu\text{M}$  BA + 250 mg L<sup>-1</sup> de CH, após 8 semanas de cultivo. Os mesmos autores registraram que 40 % dos brotos produzidos *in vitro*, desenvolveram raízes quando tratados com AIB, apresentando resultado semelhante ao de Eeswara et al. (1998), que obtiveram 50 % de enraizamento utilizando o mesmo regulador de crescimento.



**Figura 3:** Cultivo *in vitro* de explantes nodais de *Azadirachta indica* A. Juss. **A)** Segmentos nodais na fase de estabilização *in vitro*; **B)** Brotações cultivadas em frascos (TR) com 90 mm de altura, cujos explantes apresentam aspecto senescente; **C)** Brotações cultivadas em frascos (T2M) com 120 mm; **D)** Fase inicial de aclimatização; **E)** Retirada do plástico após a terceira semana de aclimatização; **F)** Explante aclimatizado após 60 dias em casa de vegetação, com desenvolvimento do sistema radicular em fibra de côco e compostagem de casca de eucalipto (1:1).

Eeswara et al. (1998) relataram 55 % de enraizamento utilizando 4,9  $\mu\text{M}$  de AIB em brotos formados a partir de calos de folhas de nim. Salvi et al. (2001) também relataram enraizamento com 4,9  $\mu\text{M}$  de AIB, após 7 dias de cultivo, e 90 % das plantas sobreviveram após aclimatização por 45 dias. Joshi & Thengane (1996) e Venkateswarlu et al. (1998), aplicaram de 2 a 3  $\text{mg L}^{-1}$  de AIA para promover o enraizamento de brotos de nim, enquanto Joarder et al. (1993) e Islam et al. (1997) aplicaram 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de AIB. Já Gill et al. (1996) e Roy et al. (1996) relataram o uso combinado de AIB e AIA para o enraizamento.

No presente trabalho, foram avaliados durante a fase de aclimatização, três diferentes tipos de substrato para plantas de nim propagadas *in vitro*, em função da taxa de sobrevivência das mudas, após 30 dias de cultivo. A melhor taxa de sobrevivência (80 %) foi em fibra de côco e compostagem de casca de eucalipto na proporção (1:1).

Shahin-uz-zaman et al. (2008) utilizaram ápice caulinar e radicular para promover a formação de plântulas *in vitro* de nim cultivados em meio MS, com adição de diferentes concentrações de BAP e ANA. Em ambos os materiais houve formação de gemas com capacidade de brotação. Os brotos formados foram subcultivados e enraizados em meio com adição de diferentes concentrações combinadas de AIB e AIA, posteriormente aclimatizadas em vasos. Segundo Oliveira et al. (2005), o tratamento com AIB foi mais eficiente para o enraizamento de estacas de nim. Porém, é possível obter enraizamento *ex vitro* sem a utilização de indutores, como também foi verificado nesse trabalho.

## CONCLUSÕES

Os segmentos nodais coletados de plantas jovens cultivados em meio MS + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de KIN + 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios de 10 mm (T20), cobertos com membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE) de 0,22 µm de poro, apresentam um melhor desenvolvimento. Os brotos apresentaram maior taxa de sobrevivência (80 %) no substrato fibra de côco e compostagem de casca de eucalipto na proporção (1:1). Os brotos de nim possuem capacidade rizogênica durante a fase de aclimatização *ex vitro*, tornando o processo de propagação *in vitro* mais econômico e mais rápido.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em especial nesse capítulo a técnica Elisonete Garcia Lani pelo auxílio no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Bioagro, UFV e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G. & ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: CHRISTIAN, W.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century**. Kerala: Research Signpost, p. 303–333, 2004.
- CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M.K & BHOJWANI, S.S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 557–564, 2003.
- 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.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; ZARATE DO COUTO, H.T. & RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48, p. 107–116, 1995.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**, release versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 2001.
- EESWARA, J.P.; STUCHBURY, T.; ALLAN, E.J. & MORDUE, A.J. A standard procedure for the micropropagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 215–219, 1998.
- GAUTAM, V.; NANDA, K. & GUPTA, S. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss – a medicinal tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 13–18, 1993.
- GILL, R.I.S.; GILL, S.S.; GOSAL, S.S. Protocol for *in vitro* asexual multiplication of *A. indica*, in: A.S. Islam (Ed.). **Plant Tissue Culture**, Oxford and IBH, New Delhi, p. 155–160, 1996.
- IAREMA, L. **Enxertia e propagação *in vitro* de fáfia *Pfaffia glomerata* (Spreng). Pedersen**. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 189p, 2008.
- ISLAM, R.; HOQUE, A.; KHALEKUZZAMAN, M. & JOARDER, O.I. Micropropagation of (*Azadirachta indica* A. Juss). from explants of mature plants. **Plant Tissue Culture**, v. 7, p. 41–46, 1997.

JOARDER, O.I.; NADERUZZAMAN, A.T.M.; ISLAM, R.; HOSSAIN, M.; JOARDER, N. & BISWAS, B.K. Micropropagation of neem through axillary bud culture, in: **Proceedings of the world neem conference**, Bangalore, p. 961–966, 1993.

JOSHI, M. & THENGANNE, S. Potential application of *in vitro* methods for propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). In: CHARI, M.S.; RAHEJA, A.K. & KRAUS, W. (Eds.). **Neem and Environment**, Science Publishers, Inc., New Hampshire v. 2, p. 967–973, 1996.

KEARNEY, M.L.; ALLAN, E.J.; HOOKER, J. & MORDUE (LUNTZ), A.J. Antifeedant effects of *in vitro* culture extracts of the neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust [*Schistocerca gregaria* (Forskål)]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 37, p. 67–71, 1994.

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

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S. & KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, p. 51–63, 2004.

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

MURTHY, B.N.S. & SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 469–475, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Neem: a tree for solving global problems**. Washington DC: National Academy Press, 1992.

OLIVEIRA, R.M.; FREIRE, A.B.; OLIVEIRA, I.P. & CASTRO, T.A.P. Estudo da influência de fitoreguladores no enraizamento de estacas de neem (*Azadirachta indica*). **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 1, n. 1, p. 65–71, 2005.

QURAIISHI, A.; KOICHE, V.; SHARMA, P. & MISHRA, S.K. *In vitro* clonal propagation of neem (*Azadirachta indica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 281–284, 2004.

RAMESH, K. & PADHYA, M.A. *In vitro* propagation of neem, *Azadirachta indica* (A. Juss), from leaf discs. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 932–935, 1990.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 4, p. 421–428, 2009.

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.

ROY, S.K.; ASSADUZZAMAN, M. & HOSSAIN, Z. Clonal propagation of *Azadirachta indica* by *in vitro* culture. In: ISLAM, A.S. (Ed.) **Plant Tissue Culture** Oxford and IBH, New Delhi, p. 149–154, 1996.

SALVI, N.D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S. & EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 159–162, 2001.

SANTOS, R.P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 128p, 2007.

SHAHIN-UZ-ZAMAN, M.; ASHRAFUZZAMAN, M.; SHAHIDUL, M.H. & LUNA, L.N. *In vitro* clonal propagation of the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 386–391, 2008.

TSAY, H.S.; LEE, C.Y.; AGRAWAL, D.C. & BASKER, S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.42, p. 445–449, 2006.

VENKATESWARLU, B.; KATYAL, J.C.; CHOUDHARI, J. & MUKHOPADHYAY, K. Micropropagation of plus neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) and evaluation of field transferred plants. **Indian Forester**, v. 124, p. 537–543, 1998.

## CAPÍTULO 2

### Anatomia foliar de *Azadirachta indica* (Meliaceae) cultivada *in vivo*, *in vitro* e aclimatizada

#### RESUMO

Plantas propagadas *in vitro* geralmente apresentam alterações fisiológicas significativas e mudanças morfológicas, quando comparadas com plantas cultivadas *ex vitro*. Objetivou-se mensurar os tecidos foliares de *Azadirachta indica* visando identificar as alterações estruturais das folhas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas, e avaliar se há produção de lipídios gerais, terpenóides, tanino e mucilagem nesses ambientes. A altura em corte transversal da face adaxial (Fad) e abaxial (Fab) da epiderme foliar cultivada no ambiente *in vivo* (Fad = 15.750  $\mu\text{m}$ ; Fab = 12.325  $\mu\text{m}$ ) e aclimatizada (Fad = 13.840  $\mu\text{m}$ ; Fab = 11.690  $\mu\text{m}$ ) apresentaram diferenças significativas, quando comparado com a *in vitro* (Fad = 11.462  $\mu\text{m}$ ; Fab = 9.825  $\mu\text{m}$ ), porém, entre elas não houve diferenças significativas. Quanto ao mesofilo, observou-se diferença significativa entre os três ambientes estudados, onde o maior valor médio foi no ambiente *in vivo* (185,520  $\mu\text{m}$ ), seguido do aclimatizado (132.876  $\mu\text{m}$ ) e *in vitro* (68.465  $\mu\text{m}$ ). Do mesmo modo, ocorreu para a área foliar, com maior valor no ambiente *in vivo* (2.361,184  $\mu\text{m}^2$ ), seguido da aclimatizada (2.236,520  $\mu\text{m}^2$ ) e *in vitro* (2.152,630  $\mu\text{m}^2$ ). Utilizando o microscópio eletrônico de varredura observou-se em ambiente *in vivo* que as células subsidiárias são bem sinuosas; já as folhas aclimatizadas apresentam pouca sinuosidade, enquanto que as *in vitro* não apresentam esse aspecto. As células estomáticas *in vivo* estão dispostas em plano abaixo das células epidérmicas, enquanto que no ambiente *in vitro*, as células estavam aparentemente túrgidas e no mesmo plano que as células epidérmicas, com seus estômatos constantemente abertos. Há produção nas folhas nos ambientes estudados de lipídios gerais, terpenóides e tanino em idioblastos foliares de *A. indica*, enquanto que o teste para mucilagem foi negativo nos três ambientes. O ambiente influenciou diretamente na diferenciação celular dos tecidos foliares evidenciado pelas alterações estruturais, porém, não influenciou qualitativamente na produção dos metabólitos avaliados.

**Palavras chave:** Anatomia foliar, micromorfometria, histoquímica, nim, *Azadirachta indica*.

## Leaf anatomy of *in vivo*, *in vitro* grown and acclimatized *Azadirachta indica* (Meliaceae)

### ABSTRACT

*In vitro* propagated plants generally have significant physiological and morphological changes as compared to *ex vitro* grown plants. The main goals of this work were to measure the *Azadirachta indica* leaf tissues in order to identify structural changes of *in vivo*, *in vitro* cultured and acclimatized leaves, and analyze whether there is production of general lipids, terpenoids, tannins and mucilage in these environments. The height in cross-section of the leaf epidermis adaxial (Fad) and abaxial (Fab) face grown *in vivo* environment (Fad = 15,750  $\mu\text{m}$ ; Fab = 12,325  $\mu\text{m}$ ) and acclimatized (Fad = 13,840  $\mu\text{m}$ ; Fab = 11,690  $\mu\text{m}$ ) showed significant difference as compared to the *in vitro* environment (Fad = 11,462  $\mu\text{m}$ ; Fab = 9825  $\mu\text{m}$ ), but between them there were no significant differences. Concerned to mesophyll, it was found significant differences between the three studied environments, where the environment *in vivo* presented the highest average value (185.520  $\mu\text{m}$ ), followed by acclimatized (132,876  $\mu\text{m}$ ) and *in vitro* (68,465  $\mu\text{m}$ ). Similarly, it occurred to leaf area, higher value to the *in vivo* environment (2361.184  $\mu\text{m}^2$ ), followed by acclimatized (2236.520  $\mu\text{m}^2$ ) and *in vitro* (2152.630  $\mu\text{m}^2$ ). Using the scanning electron microscope, it was observed in *in vivo* environment that the subsidiary cells are very sinuous; otherwise acclimatized leaves show little sinuosity, whereas *in vitro* ones does not exhibit this feature. *In vivo* stomatal cells are arranged in a flat below that of epidermal cells, while in *in vitro* environment, the cells were apparently turgid and in the same flat of the epidermal cells, with their stomata constantly open. In the studied leaves there is production of general lipids, terpenoids and tannin in *A. indica* leaf idioblasts, whereas the mucilage test was negative for the three environments. The environment had a direct influence on leaf tissue cellular differentiation which was evidenced by structural changes; however, it did not qualitatively affect the production of the evaluated metabolites.

**Keywords:** Leaf anatomy, micromorphometry, histochemistry, neem, *Azadirachta indica*.

## INTRODUÇÃO

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam características peculiares como a baixa diferenciação dos tecidos foliares, devido a plasticidade fenotípica das mesmas, em detrimento a elevada umidade relativa e baixas trocas gasosas com o ambiente externo. Esse problema de diferenciação celular, também está relacionado com a baixa irradiância no ambiente *in vitro*. Outros problemas freqüentes em plantas propagadas *in vitro* são: menor quantidade de colênquima e esclerênquima e hiperidricidade. Estes por sua vez, estão condicionados a quantidade de nutrientes disponíveis no meio de cultura, níveis elevados de reguladores de crescimento e baixa intensidade luminosa (Majada et al., 2000).

A diferenciação celular e a organização dos tecidos ocorrem quando há trocas gasosas em níveis ótimos nas folhas (Majada et al., 2000). Durante o processo de adaptação de plantas *in vitro* para *ex vitro*, muitas mudas podem ser perdidas, pois as mudanças fisiológicas e anatômicas necessárias para sobrevivência nem sempre são alcançadas de modo efetivo no processo de endurecimento (Apóstolo et al., 2005). Com o conhecimento das alterações estruturais que ocorrem durante essas etapas, é possível controlar e aperfeiçoar as condições, maximizando o estabelecimento das plantas cultivadas *in vitro* para a condição *ex vitro* (Apóstolo & Llorente, 2000).

Na literatura consultada não foi encontrado estudos anatômicos e teste histoquímico em tecidos foliares de *Azadirachta indica*. Considerando a importância da espécie como bioinseticida, pela produção de azadirachtina (AZA), tais estudos são imprescindíveis para se adequar as condições de cultivo para produção desse princípio ativo de alto valor econômico. Os testes histoquímicos são úteis se para localizar *in situ* as principais classes de substâncias químicas presentes em secreções de plantas. Estes podem ser produzidos e armazenados em tecidos e células especializadas (Kolb & Muller, 2004). O tipo e a posição da estrutura secretora têm sido utilizado como auxílio na identificação de espécies, e parâmetro no controle de qualidade farmacêutica, quanto a produção de medicamentos (Von Poser & Mentz, 2001).

Face ao exposto, o presente trabalho tem como objetivos, mensurar os tecidos foliares de *A. indica* visando identificar as alterações estruturais foliares em plantas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas, e verificar a presença de lipídios totais, terpenóides, tanino e mucilagem em folhas cultivadas nesses três ambientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Análise anatômica

Foram utilizadas plantas matrizes de *A. indica* com 6 meses de idade, cultivadas em casa de vegetação (*in vivo*), *in vitro* e aclimatizadas, nas condições apresentadas no capítulo 1. Destas plantas foram coletadas folhas na posição do quarto nó do ápice para base. O material *in vivo* foi coletado aos 30 dias de desenvolvimento, depois de feito a poda dos caules próximos a base. As folhas *in vitro* foram coletadas no final do terceiro subcultivo, totalizando 75 dias de cultivo dos explantes, enquanto que as folhas aclimatizadas foram coletadas aos 50 dias de cultivo, composto de 20 dias em condições controladas (mantidas em sala de crescimento sob temperatura controlada de  $25 \pm 1$  °C e irradiância de  $14 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inicialmente, aumentando-se gradualmente até  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante), e 30 dias em casa de vegetação.

### Microscopia de luz

Foi realizado amostragem de 5 indivíduos por ambiente, com 3 repetições cada. As amostras foliares dos três ambientes foram fixadas em FAA<sub>50</sub>, por 48 horas, e conservado em etanol 70 % (Johansen, 1940). Cada folha foi seccionada na posição central do limbo, coletando amostras quadrangulares de aproximadamente  $100 \text{ mm}^2$ . As mesmas foram desidratadas em série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin-Leica), conforme as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente com  $5 \mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo rotativo (modelo RM 2155, Leica), e os cortes corados com azul de toluidina 0,05 % a pH 4,0 para caracterização estrutural e análises micromorfométricas (O'Brien et al., 1964). As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount).

Para as análises histoquímicas foram utilizadas amostras de folhas frescas obtidas conforme as análises estruturais *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas. Foram obtidos cortes transversais em micrótomo de mesa (modelo LPC Rolemberg & Bhering) com aproximadamente  $60 \mu\text{m}$  de espessura. Os cortes foram submetidos aos seguintes reagentes:

I) Sudan Black B (Pearse, 1980) para detecção de lípidios totais. Como controle desse teste, os cortes foram previamente tratados com metanol/ clorofórmio/ água/ ácido clorídrico (66:33:4:1) durante 3 horas, à temperatura ambiente.

II) Reagente de NADI (David & Carde, 1964) para terpenóides. O controle é idêntico ao item I.

III) Vanilina Clorídrica (Mace & Howell, 1974) para taninos. Como controle secções foram montadas apenas em ácido clorídrico a 9%.

IV) Ácido Tânico/Cloreto de Ferro III (Pizzolato & Lillie, 1973) para mucilagem. Como controle cortes foram tratados com ácido tânico ou cloreto de ferro III.

As imagens foram obtidas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus) com sistema U-photo do Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Amostras de aproximadamente 50 mm<sup>2</sup> 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 CO<sub>2</sub> (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**

Em cada tratamento (*in vivo*, *in vitro* e aclimatizado), foram realizadas 3 repetições, sendo cada uma composta por 15 amostras, cada amostra corresponde uma imagem foliar em corte transversal. Em cada amostra foram mensurados 3 parâmetros: altura da face adaxial e abaxial da epiderme, e altura do mesofilo, quantificados 5 vezes por amostra. Desse modo, em cada tratamento avaliaram-se 45 amostras x 3 parâmetros x quantificado 5 vezes, resultando em 225 dados para cada parâmetro avaliado, totalizando 675 dados por tratamento. Para mensurar as áreas foliares em corte

transversal, foram realizadas 15 amostras x 3 repetições, totalizando 45 dados para cada tratamento. As medidas foram feitas em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$  respectivamente, utilizando-se o software Image Pro-Plus versão 4.1 para Windows<sup>®</sup> (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, USA). E na seqüência os dados foram submetidos ao fatorial simples e 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 nível de significância de 5 %.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar a anatomia foliar de *Azadirachta indica*, observou-se a presença de idioblastos grandes e arredondados com função de armazenar metabólitos secundários. As alturas da epiderme adaxial e abaxial em ambiente *in vivo* são semelhantes, bem como suas estruturas com paredes celulares espessas. A epiderme das folhas das plantas de *A. indica*, independente dos ambientes, é unisseriada (Figura 1 B, D e F), contendo estômatos na face abaxial da folha, portanto, classificando-a como hipoestomática. Entretanto, epiderme da face adaxial do ambiente *in vivo* apresentou valor médio (15,750  $\mu\text{m}$ ), enquanto que a aclimatizada (13,840  $\mu\text{m}$ ), não diferindo estatisticamente. Porém, estas diferiram da cultivada *in vitro*, que apresentou média (11,462  $\mu\text{m}$ ). O mesmo ocorreu para epiderme da face abaxial nos três ambientes, com valores médios (12,325; 11,690; e 9,825  $\mu\text{m}$ ), respectivamente (Quadro 1).

A altura do mesofilo das folhas nos diferentes ambientes está organizado em parênquima paliçádico e lacunoso, sendo a folha classificada como dorsiventral nas três condições de cultivo estudadas. No entanto, os valores médios foram significativos nos três ambientes, onde o maior valor (186,470  $\mu\text{m}$ ) corresponde ao ambiente *in vivo*, seguindo do aclimatizado (132,876  $\mu\text{m}$ ) e *in vitro* (68,465  $\mu\text{m}$ ). Quanto aos valores médios da área total em corte transversal foliar, os valores também foram significativos nos três ambientes de estudo, apresentando novamente o maior valor (2.364,365  $\mu\text{m}^2$ ) observado no ambiente *in vivo*, seguido do aclimatizado (2.236,520  $\mu\text{m}^2$ ) e *in vitro* (2.152,630  $\mu\text{m}^2$ ).

Segundo Mayer et al. (2008), folhas de *Cymbidium hort* (Orchidaceae) cultivadas nos três ambientes apresentaram células epidérmicas da face adaxial mais altas que as da face abaxial. Os feixes vasculares da nervura mediana de plantas cultivadas *in vitro* são menos desenvolvidos que nas folhas da planta matriz, como observado em plantas de *A. indica* cultivadas no mesmo ambiente. No mesofilo de todas as plantas foram observados idioblastos, assim como foi observado em corte transversal foliar de *A. indica*, podendo ser observado tais células contendo metabólitos também na região da nervura mediana.

Nas plantas *in vitro* e aclimatizadas de *A. indica*, as folhas são mais delgadas e possuem feixes de fibras menos evidentes e com paredes mais delgadas. Em geral o mesofilo das plantas cultivadas *in vivo* (matrizes cultivadas em casa de vegetação), possui células com conteúdo celular mais denso devido a maior quantidade de cloroplastos, ao ser observado cortes transversais em microscopia de luz.

**Quadro 1:** Dados de micromorfometria em  $\mu\text{m}$ , da epiderme adaxial e abaxial, mesofilo composto de parênquima paliçádico e lacunoso e área foliar em  $\mu\text{m}^2$  de folhas de *A. indica*, cultivadas em três ambientes: *in vivo*, aclimatizado e *in vitro*.

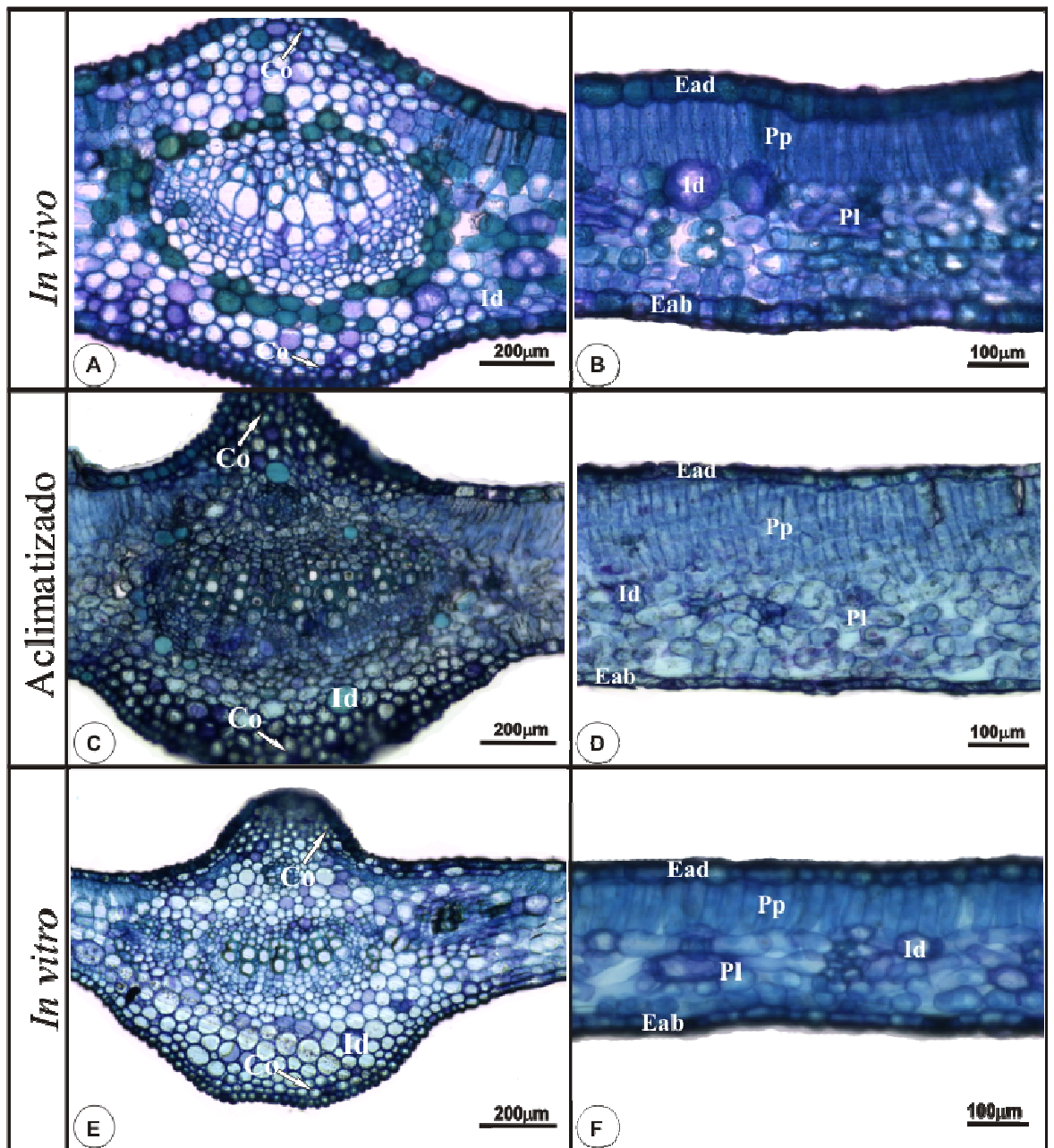
	<i>IN VIVO</i>	<i>ACLIMATIZADO</i>	<i>IN VITRO</i>
<b>Face adaxial</b>	15.750 a	13.840 a	11.462 b
<b>Face abaxial</b>	12.325 a	11.690 a	9.825 b
<b>Mesofilo</b>	186.470 a	132.876 b	68.465 c
<b>Área foliar</b>	2.364.365 a	2.236.520 b	2.152.630 c

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

Na região da nervura central das folhas das planta matriz, os feixes vasculares são de grande calibre, do tipo colateral, enquanto que o floema apresenta menor calibre. Já nas folhas das plantas *in vitro*, o feixe vascular da nervura mediana é pouco desenvolvido e de menor calibre, assim como o floema quando comparado às folhas cultivadas *in vivo*. Dados semelhantes foram observados por Mayer et al. (2008).

Conforme relatado por Apóstolo et al. (2005), a epiderme adaxial e abaxial de *Cynara scolymus* mostram invariavelmente parede celular e cutícula delgada, além de estômatos abertos. Já as plantas aclimatizadas apresentam cutícula conspícua, parede celular mais espessa, estômatos funcionais, mesofilo com tecidos mais organizados, feixes vasculares bem desenvolvidos e presença de esclerênquima. Tais características são mantidas em fases posteriores.

Na nervura mediana das folhas, abaixo da epiderme unisseriada, há uma ilhota de colênquima voltada para a face adaxial e abaxial da folha, nos três ambientes. Outra característica marcante em corte transversal foliar de *A. indica* é a presença de idioblastos na região da nervura mediana com reservas de metabólitos, assim como observado no mesofilo. O parênquima paliçádico de folhas de plantas cultivadas *in vivo* é, em média, 1,7 maior que de plantas aclimatizadas, e 4,7 maior que plantas *in vitro*. Desse modo, a técnica de micromorfometria possibilita mensurar as diferenças entre os diferentes tecidos foliares em função do ambiente em que as plantas foram cultivadas.



**Figura 1:** *Azadirachta indica* cultivada em ambiente *in vivo*, aclimatizada e *in vitro*. **A**, **C** e **E**) Região da nervura mediana com 30, 50 e 75 dias de cultivo respectivamente. **B**, **D** e **F**) Lâmina foliar entre a nervura mediana e a margem coletadas com 30, 50 e 75 dias de cultivo. Epiderme da face adaxial (**Ead**); epiderme da face abaxial (**Eab**); parênquima paliçádico (**Pp**); parênquima lacunoso (**Pl**); idioblasto (**Id**) e colênquima (**Co**).

A elevada umidade relativa no cultivo *in vitro* promove o rápido crescimento e desenvolvimento celular, mas também pode induzir formação de folhas anormais e pouca diferenciação dos tecidos (Apóstolo et al., 2005). Outro desequilíbrio freqüente em culturas *in vitro* é a troca de gases entre o recipiente utilizado e o ambiente externo.

Folhas de *Cynara scolymus* cultivadas *in vitro*, conforme relatado por Apóstolo et al. (2005), apresentam o mesofilo composto de parênquima paliçádico e lacunoso com grandes espaços intercelulares e poucos cloroplastos distribuídos nesses tecidos, características semelhantes foram observadas em folhas de *A. indica* do presente trabalho.

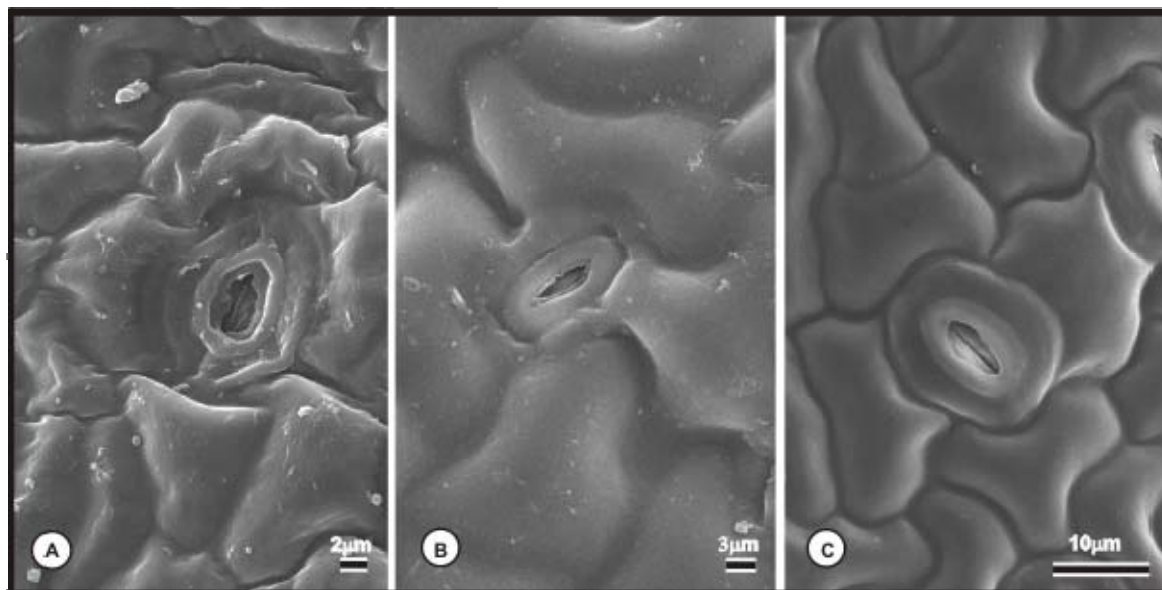
O conhecimento dos problemas anatômicos, quanto à diferenciação celular e dos tecidos, auxilia na otimização de protocolos de aclimatização. Fase essa responsável pela mortalidade de grande percentagem de plantas clonadas ou propagadas *in vitro*.

O mesofilo das folhas de ipê-amarelo cultivadas *in vivo* apresentou uma camada de parênquima paliçádico, porém, as células eram mais alongadas e justapostas, quando comparado com as células cultivadas *in vitro*, tais características também foram observadas em folhas de *A. indica*. Os tecidos foliares de ipê-amarelo com 40 dias aclimatizados, não apresentaram diferença significativa com os tecidos de folhas cultivadas *in vitro*. No entanto, após 60 dias de aclimatização, as células se assemelharam àquelas da condição *in vivo*, apresentando resultado significativo segundo relatado por Dousseau et al (2008), enquanto que isso foi observado em plantas de *A. indica* aclimatizadas aos 50 dias de cultivo.

A diferenciação de tecidos e a plasticidade na anatomia foliar é um fator importante no processo de absorção de luz, especialmente na estrutura do mesofilo. É esperado que quanto mais espesso o parênquima paliçádico, maiores sejam também as taxas fotossintéticas. Processo esse fundamental ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Dousseau et al., 2008).

As maiores alterações anatômicas em folhas de bananeira ocorrem após 42 dias de aclimatização, com acentuado espessamento dos parênquimas clorofilianos, bem como diferenciação dos demais tecidos foliares. Por essa razão, a fase de aclimatização é necessária e vantajosa, pois possibilita alterações fisiológicas e estruturais, para que a planta sobreviva no novo ambiente (Costa et al., 2009). Utilizando microscópio eletrônico de varredura, no presente trabalho foi observado estômatos com células guarda do tipo reniforme. Em ambiente *in vivo*, as células subsidiárias apresentaram-se

bem sinuosas, já as folhas aclimatizadas apresentam pouca sinuosidade, enquanto que as *in vitro* não apresentam esse aspecto (Figura 2).



**Figura 2:** Epiderme foliar da face abaxial de *Azadirachta indica* com presença de estômatos, observado em microscópio eletrônico de varredura (MEV). **A)** Folha proveniente de planta cultivada em casa de vegetação com 30 dias de cultivo, apresentando células estomáticas abaixo das células epidérmicas; **B)** Folha proveniente de planta cultivada *ex vitro* com 50 dias, apresentando células estomáticas pouco abaixo das células epidérmicas e **C)** Folha proveniente de planta cultivada *in vitro* com 75 dias de cultivo, apresentando células estomáticas no mesmo plano das células epidérmicas.

De acordo com Mayer et al. (2008), os estômatos foliares de matrizes de *Cymbidium hort* cultivadas em casa de vegetação também foram observados abaixo da linha das demais células epidérmicas e pequenos ostíolos. Já os estômatos das plantas *in vitro* foram observados levemente projetados acima da epiderme, e com ostíolo maior. Nas plantas aclimatizadas, o ostíolo é grande e os estômatos já retornam à posição levemente abaixo do nível das demais células epidérmicas. Tais características foram observadas também em folhas de *A. indica*.

As células estomáticas da epiderme da face abaxial de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação (*in vivo*) de *A. indica* estão dispostas em plano abaixo das células epidérmicas, formando um pequeno micro-clima evitando a perda de água, por manter a tensão superficial das células estomáticas e do ostíolo. Já o ambiente *in vitro* por ter umidade relativa elevada, as células guarda estão no mesmo plano que as células epidérmicas, e geralmente seus estômatos ficam constantemente abertos.

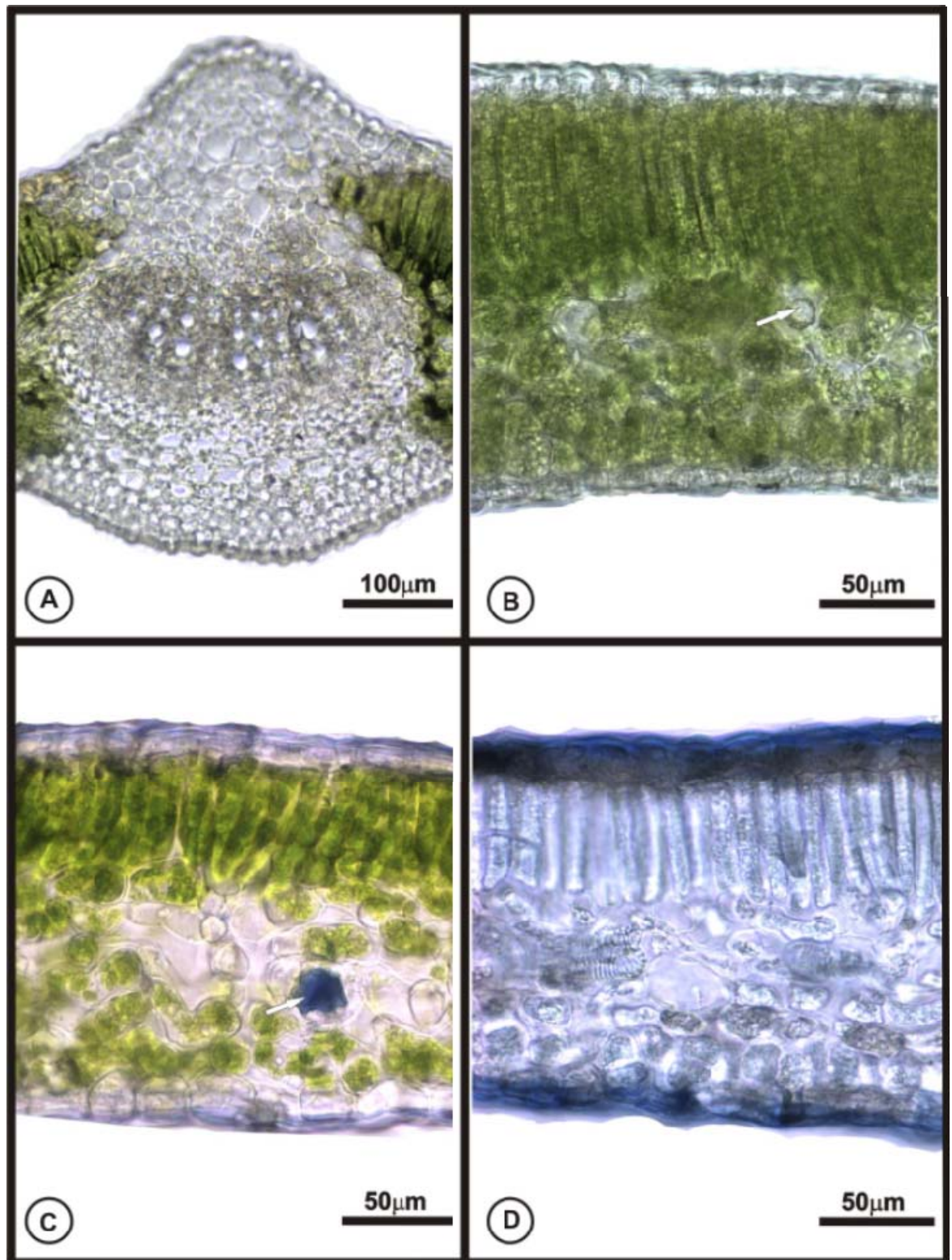
Na epiderme de folhas aclimatizadas, foi observado disposição em plano intermediário quanto a esse aspecto anatômico. O desequilíbrio gasoso nos diferentes

recipientes de cultura *in vitro* pode ser otimizado, utilizando mecanismos que aumentem a eficiência das trocas gasosas (Lai et al., 2005). Os estômatos desenvolvidos em folhas de plantas cultivadas *in vitro* geralmente ficam abertos, e as células estomáticas estão dispostas no mesmo plano ou acima das células epidérmicas. Conforme relatado por Chen et al. (2006), no ambiente *ex vitro* esses aspectos estão invertidos, onde as células estomáticas ficam dispostas num plano abaixo das células epidérmicas, formando um pequeno micro-ambiente, reduzindo a perda de água excessiva.

Estômatos levemente projetados e abertos como os observados nas folhas de *A. indica* cultivadas *in vitro*, também ocorreram em outras espécies cultivadas *in vitro* (Lee et al. 1988; Blanke & Belecher 1989). Quanto aos estômatos foliares da epiderme da face abaxial de plantas cultivadas *ex vitro* Johansson et al. (1992), relataram que é característico de ambientes com menor grau de umidade, ocorrendo a mesma alteração anatômica em plantas de rosa cultivadas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas *ex vitro*.

Normalmente os estômatos de folhas cultivadas *in vitro* apresentam menor diâmetro polar e menor relação entre o diâmetro polar e equatorial, tornando-os mais esféricos, quando comparados com plantas cultivadas em casa de vegetação. Tais alterações afetam diretamente a funcionalidade dos mesmos, sendo a forma mais elíptica característica de estômatos funcionais, e esférica a estômatos com baixa funcionalidade (Santana et al., 2008), como também observado em folhas de *A. indica*.

Na literatura consultada não foi encontrado estudos anatômicos e teste histoquímico em tecidos foliares de *Azadirachta indica*. Quanto a estes, o teste para detecção de terpenóides, foi utilizado o reagente de Nadi, que após sua oxidação forma o azul de indofenol. Esse composto por sua vez é fortemente lipossolúvel que altera a cor por variação de pH, permitindo a coloração diferencial na tonalidade azul em óleos essenciais e ácidos resinicos. Tal reação ocorreu na nervura central, mas preferencialmente no mesofilo, onde encontra-se maior quantidade de idioblastos grandes e arredondados com conteúdo, conforme mostra a (Figura 3C).



**Figura 3:** Cortes transversais de folhas de *A. indica* aclimatizadas aos 50 dias. **A)** Nervura mediana não submetida a reagente; **B)** Lâmina foliar entre a nervura mediana e a margem não submetida a reagente, com seta identificando idioblasto com conteúdo translúcido; **C)** Região entre nervuras submetida ao Reagente de Nadi evidenciando reação positiva para óleo essencial no interior de um idioblasto (seta); **D)** Controle para o teste de Nadi.

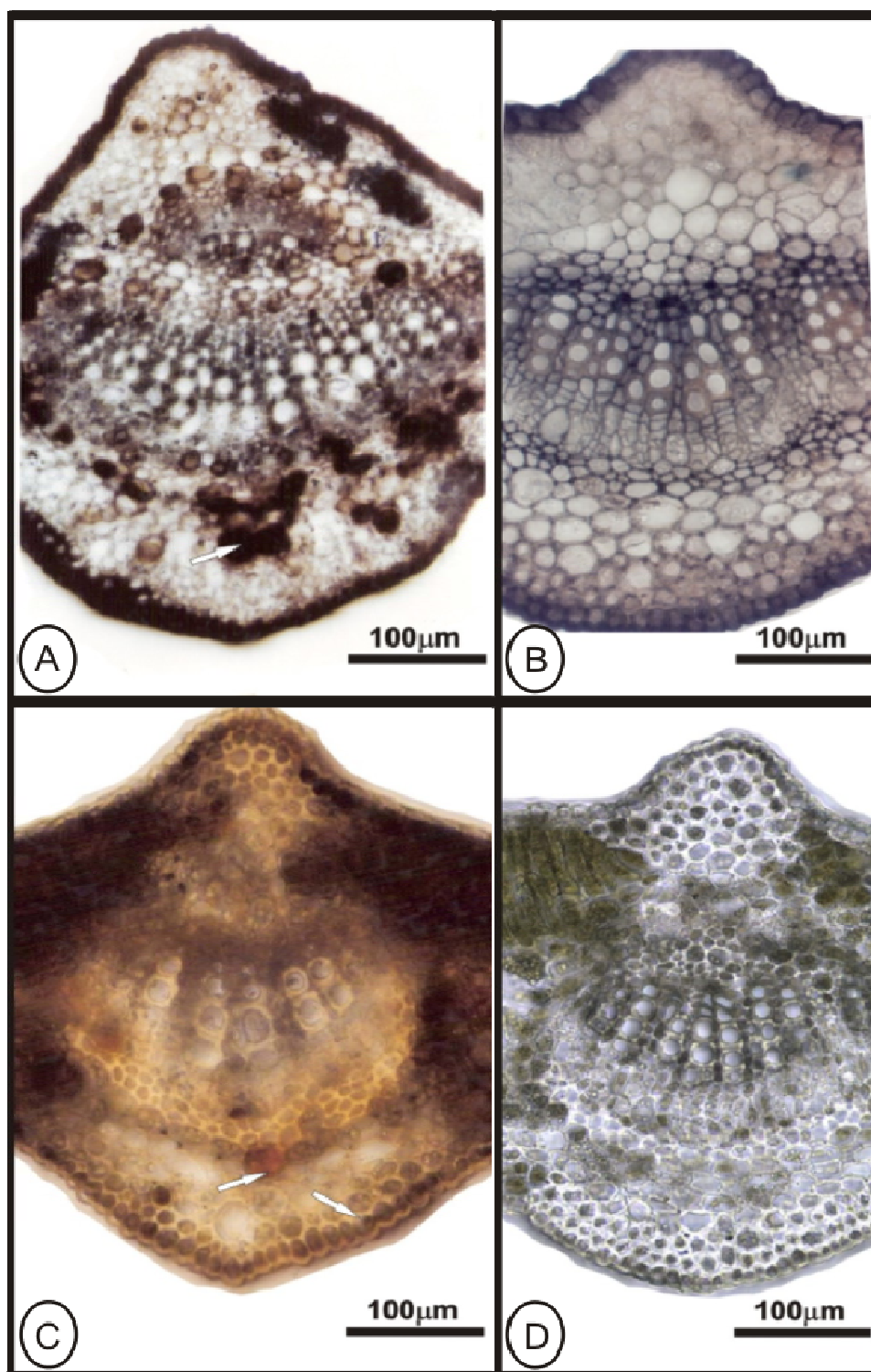
Segundo Hazarika (2006), a baixa irradiância usada no cultivo *in vitro*, associada ao acúmulo de etileno, a elevada umidade relativa no interior dos recipientes e o elevado teor de sacarose no meio de cultura, são fatores responsáveis pelo aumento na densidade estomática, acompanhada da reduzida capacidade de fechamento dos ostíolos. Conseqüentemente, as plantas que possuem essas características têm dificuldade no processo de aclimatização (Santana et al., 2008).

Para lipídios gerais com Sudan Black B foi positivo em células da nervura mediana e no mesofilo. O Sudan é um corante lisocromo que possui mais afinidade química com moléculas de lipídios, do que seu próprio solvente, favorecendo a reação físico-química, corando as células de preto (Figura 4A).

A detecção de taninos foi efetuada pelo teste com vanilina clorídrica, que fundamenta-se pela reação do grupamento aldeído da vanilina com fenóis, apresentando coloração vermelha. Essa reação ocorreu no mesofilo, mas preferencialmente na nervura mediana conforme mostra a (Figura 4C). No entanto, o teste para mucilagem com ácido tânico e cloreto de ferro III foi negativo, provavelmente devido à falta de especificidade desse teste para as mucilagens vegetais, que por sua vez são pobres em proteínas, pois o ácido tânico reage com os grupos amina das proteínas que constituem as mucilagens.

Em *Sigesbeckia jorullensis* Kunth, foi detectado óleo essencial do tipo sesqui, mono e diterpenos no espaço subcuticular da cabeça de tricomas glandulares (Heinrich et al., 2002). Em corte longitudinal foliar de *S. orientalis*, o lúmen dos ductos é alongado e reagiu positivamente aos testes para compostos fenólicos e alcalóides. Os fenóis incluem uma grande diversidade de compostos, como os flavonóides, taninos, ácidos benzóicos e cinâmicos (Simões et al., 2002). Estes últimos podem ser encontrados complexados com proteínas, alcalóides e terpenos (Aguilera et al., 2004).

Já em nectário extrafloral de *Triumfetta semitriloba*, a reação negativa do Sudan escarlate descarta a possibilidade da presença de compostos lipofílicos (Referência?). A reação positiva ao dicromato de potássio evidenciou compostos fenólicos, que são substâncias adstringentes que promovem impalatabilidade para herbívoros e fitófagos, tendo grande importância funcional na interação de plantas com animais (Carvalho et al., 2000).



**Figura 4:** Cortes transversais da nervura mediana de folhas de *A. indica* aclimatizadas aos 50 dias. **A)** Reação positiva com Sudan Black B, evidenciando lipídeos gerais corados em preto em idioblastos e epiderme; **B)** Controle para o teste com Sudan Black; **C)** Reação positiva com vanilina clorídrica, evidenciando taninos corados de vermelho em idioblastos e células da epiderme conforme indicado nas setas; **D)** Controle para o teste de taninos.

O resultado dos quatro testes avaliados em folhas de *A. indica* cultivado na fase de aclimatização, foram os mesmos para folhas de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* (dados não apresentados). De acordo com Segundo Sant'Anna-Santos et al. (2006), para detectar terpenóides, o teste com Reagente de Nadi foi positivo, desenvolvendo a reação no lume e no epitélio do ducto uma coloração azul-intensa característica de óleos essenciais. Verificou-se reação positiva para substâncias lipofílicas e hidrofílicas no lume dos ductos e reação negativa para alcalóides e taninos em caule de *Spondias dulcis* (Sant'Anna-Santos et al. (2006). Os testes com o Sudan Escarlata e Sudan Black B evidenciaram gotículas lipídicas nas células do epitélio do ducto e nas células da bainha.

A natureza lipofílica dessa secreção foi confirmada pela ausência de coloração, após tratamento das secções por uma mistura de clorofórmio-metanol, como também foi observado em folhas de *A. indica*. A presença de óleos essenciais na goma de espécies de Anacardiaceae já foi relatada, com ênfase em suas propriedades antimicrobianas (Alma et al., 2004).

A presença de taninos em idioblastos e na epiderme de *A. indica* após a reação com vanilina clorídrica, evidencia a função de defesa contra a herbivoria, contra a invasão de microrganismos patogênicos e vírus conforme também relatado por (Sant'Anna-Santos et al., 2006). Em *Lippia scaberrima* observou-se óleos essenciais, e flavonóides variando na coloração dependendo do tipo estrutural, em amarelo ou verde, armazenado nos tricomas glandulares uni/multicelulares e idioblastos. Além disso, em fluorescência azul abaixo de UV-365 nm pode ser observado presença de compostos fenólicos como cumarinas (Combrinck et al., 2007).

No lúmen das cavidades foliares de *Eucalyptus* sp. foi observado óleo essencial ou resina-óleo e lactonas de sesquiterpenos. Tais resultados evidenciam complexidade no produto segregado pelas cavidades. No mesofilo e na epiderme foram encontrados compostos fenólicos, como observado em folhas de *A. indica* (Santos et al., 2008).

Em folhas de *A. indica* a reação para taninos e lipídios gerais foram mais freqüentes e com maior intensidade, seguido da reação para óleos essenciais, enquanto que o teste para mucilagem foi negativo nos três ambientes de estudo. Conforme descrito por Combrinck et al. (2006), os terpenos voláteis são perdidos rapidamente, após a colheita, motivo esse do baixo rendimento desse tipo de composto em matéria seca. No entanto, os compostos fenólicos são menos voláteis, podendo ser observados com mais freqüência e maior concentração em material coletado.

## CONCLUSÕES

Plantas propagadas *in vitro* de *A. indica* apresentaram alterações significativas na diferenciação de tecidos e estruturas morfológicas, quando comparado os aspectos foliares cultivadas nos três ambientes: *in vivo*, aclimatizado e *in vitro*.

Nos três ambientes há produção de lipídios gerais pelo teste histoquímico com Sudan Black B, terpenóides pelo teste de Nadi e tanino pelo teste com vanilina clorídrica na nervura central e no mesófilo de *A. indica*. O teste para mucilagem com ácido tânico e cloreto de ferro III foi negativo nos três ambientes avaliados.

Os testes Sudan Black e Nadi apresentam uma relação indireta quanto à presença de azadirachtina (AZA) nas folhas de *A. indica*, pois esse metabólito é um óleo essencial (tetratriterpenóide). Considerando a importância da espécie como bioinseticida, pela produção desse composto, tais estudos foram imprescindíveis para que em outros estudos possa se adequar as condições de cultivo para produção desse princípio ativo de alto valor econômico em ambiente *in vitro*, utilizando técnicas biotecnológicas como embriogênese somática e ou organogênese realizando o melhoramento genético da espécie, ou ainda estimulando a produção de AZA em cultura de células em suspensão, utilizando agentes elicitores para aumentar sua biossíntese.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em especial nesse capítulo a professora Renata M. S. Alves Meira, pela utilização do Laboratório de Anatomia Vegetal/UFV, ao mestrando em Botânica, Diego Ismael Rocha pela colaboração, e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

- AGUILERA, D.B.; MEIRA, R. M. S. A. & FERREIRA, F.A. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v. 22, p. 483–489, 2004.
- ALMA, M.H.; NITZ, S.; KOLLMANNBERGER, H.; DIGRAK, M.; EFE, F.T. & YILMAZ, N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of *Turkish Pistachio* (*Pistacia x vera* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3911–3914, 2004.
- APOSTOLO, N.M. & LLORENTE, B. E. Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots in vitro grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 243–249, 2000.
- APOSTOLO, N.M.; BRUTTI, C.B. & LLORENTE, B.E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, p. 307–313, 2005.
- BLANKE, M.B. & BELECHER, A.B. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 19, p. 85–89, 1989.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G. & SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**, p. 451–469, 2000.
- CHEN, U.C.; HSIA, C.N, YEH, M.S.; AGRAWAL, D.C. & TSAY, H.S. In vitro micropropagation and ex vitro acclimation of *Bupleurum kaoi* an endangered medicinal plant native to Taiwan. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 128–133, 2006.
- COMBRINCK, S.; BOSMAN, A.A.; BOTHA, B.M, DUPLOOY, G.W.; MCCRINDLE, R.I. & RETIEF, E. Effects of post-harvest drying on the essential oil and glandular trichomes of *Lippia scaberrima* Sond. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 80–84, 2006.
- COMBRINCK, S.; DUPLOOY, G. W.; MCCRINDLE, R. I. & BOTHA, B. M. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, v. 99, p. 1111–1119, 2007.
- COSTA, F.H.S.; CASTRO, E.M.; PASQUAL, M.; SCHERWINSK, J.E.P. & OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 386–392, 2009.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**, release versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 2001.

DAVID, R. & CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. Les **Comptes Rendus de l' Académie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338–1340, 1964.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; SOARES, R.P, EMRICH, E. B. & MELO, L.A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1694–1700, 2008.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 105–120, 2006.

HEINRICH, G.; PFEIFHOFER, H.W.; STABENTHEINER, E. & SAWIDIS, T. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. **Annals of Botany**, v. 89, p. 459–469, 2002.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**, New York: Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 423 p. 1940.

JOHANSSON, M.; KRONESTEDT-ROBARDS, E.C. & ROBARDS, A.W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v. 66, p. 165–176, 1992.

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.

KOLB, D. & MULLER, M. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. **Annals of Botany**, v. 94, p. 515–526, 2004.

LAI, C.C.; LIN, H.M.; NALAWADE, S.M.; FANG, W. & TSAY, H.S. Hyperhydricity in shoot culture of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal Plant Physiology**, v. 162, p. 355–361, 2005.

LEE, N.; WETZSTEIN, H.Y. & SOMMER, H.E. Quantum flux density effects on anatomy and surface morphology of *in vitro* and *in vivo* developed sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, p. 167–171, 1988.

MACE, M.E. & HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p. 1297–1302, 1974.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M. A. & SANCHEZ-TAMES, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 207–214, 2000.

MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C. & QUOIRIN, M. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 2, p. 323–332, 2008.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. **The study of plant structure - principles and methods**. Melbourne: Termarcarphy PTY Ltd. 1964.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. Longman. Group Limited, v. 2, 4<sup>th</sup> ed., 998p. 1980.

PIZZOLATO, T. D & LILLIE, R. D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, p. 56–64, 1973.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; RESENDE, R.K.S.; CASTRO, E.M.; PEREIRA, F.D. & OLIVEIRA, L.M. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* e aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 640–644, 2008.

SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; THADEO, M.; MEIRA, R.M.S.A & ASCENÇÃO, L. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, v. 30, p. 481–489, 2006.

SANTOS, L.D.T.; THADEO, M.; IAREMA, L.; MEIRA, R.M.S.A & FERREIRA, F.A. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 32, p.769–779, 2008.

SIMÕES, A.O. & KINOSHITA, L.S. The Apocynaceae s. str. of the Carrancas region, Minas Gerais, Brazil. **Darwiniana**, v. 40, p. 127–169, 2002.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, p. 63–76, 2001.

## CAPÍTULO 3

### Efeito do BAP e ANA na organogênese e embriogênese *in vitro* em calos cotiledonares de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.)

#### RESUMO

A árvore *Azadirachta indica* A. Juss pertence à família Meliaceae, sendo originária no Sul da Ásia. É uma árvore utilizada para produção de madeira, inseticida, fertilizante e produção de medicamentos. Visando à sua propagação *in vitro* pela via embriogênica, sementes de nim foram germinadas *in vitro*, e utilizado seus cotilédones como fonte de explante para produção de calos, cultivados em meio WPM. Os mesmos apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias regenerativas, organogênese e embriogênese somática, a partir do quarto subcultivo. Momento em que o meio de cultura foi suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Na via organogênica foi avaliado a taxa de brotação nos subcultivos, enquanto que nos calos embriogênicos foi avaliado a taxa de germinação de embriões somáticos. A maior taxa de brotação (1,43) ocorreu no quinto subcultivo, enquanto que a maior taxa de germinação (2,91) de embriões somáticos ocorreu no quarto subcultivo. A partir do sétimo subcultivo, houve redução brusca quanto à taxa média de brotação (0,83) para os calos organogênicos, assim como para os calos embriogênicos, quanto à taxa de germinação de embriões (0,87) cultivados *in vitro*. Com relação à textura, os calos passaram do aspecto liso para granular ao longo dos subcultivos, enquanto que a coloração passou de marrom escuro para marrom claro e branco. Portanto, os dados apresentam uma relação tripla quanto às três características, taxa de regeneração, textura e coloração de calos cotiledonares de nim. Os calos mais granulares e de coloração marrom escuro formaram embriões somáticos, enquanto que calos menos granulares e de coloração mais clara apresentam regeneração organogênica.

**Palavras chave:** 6-benzilaminopurina, ácido naftalenoacético, brotos, embriões, nim.

## **BAP and NAA effect in *in vitro* organogenesis and embryogenesis in cotyledonary calli of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)**

### **ABSTRACT**

The *Azadirachta indica* A. Juss tree belongs to the Meliaceae family, which originated in South Asia. It is a tree used for timber, pesticide, fertilizer and medicine production. The aim of this work was to analyze *in vitro* propagation via embryogenesis. Neem seeds were *in vitro* germinated and their cotyledons were used as a source of explants to produce callus, cultured on WPM medium. They had a high capacity to propagate by both regenerative routes organogenesis and somatic embryogenesis from the fourth subculture when the culture medium was supplemented with 2 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.25 mg L<sup>-1</sup> NAA. In organogenic route, it was evaluated the shooting rate in subcultures, whereas in embryogenic callus, it was evaluated the germination rate of somatic embryos. The highest shooting rate (1.43) occurred in the fifth subculture, whereas the highest germination rate (2.91) of somatic embryos occurred in the fourth subculture. From the seventh subculture, the average shooting rate (0.83) has sharply decreased for organogenic callus, as well as the germination rate (0.87) of *in vitro* cultured embryos for the embryogenic callus. Regarding the texture, calluses went from a smooth to granulate appearance over the subcultures, while the color changed from dark brown to light brown and white. Therefore, the data show a triple relationship on the three characteristics, regeneration rate, texture and neem cotyledon callus color. More granular and dark brown color calluses has formed somatic embryos, while less granular and lighter colored calluses present organogenic regeneration.

**Keywords:** 6-benzylaminopurine (BA),  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA), shoots, embryos, neem.

## INTRODUÇÃO

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss) pertence à família Meliaceae, sendo originária no Sul da Ásia. É uma árvore utilizada para produção de madeira, inseticida, fertilizante e produção de medicamentos. Na Índia, o nim é popularmente conhecido como "árvore da vida", devido suas diversas aplicações, dentre elas como bioinseticida, devido a produção de azadirachtina (AZA). Visando à sua propagação, vários estudos foram feitos com o objetivo de desenvolver protocolos de cultura de tecidos de nim, utilizando explantes como cotilédones (Muralidharan & Mascarenhas, 1989) e anteras (Goutam et al., 1993).

Alguns trabalhos enfocando a embriogênese somática de nim foram publicados. No entanto, problemas tais como a baixa produtividade de embriões, baixas taxas de enraizamento *in vitro* e de sobrevivência dos embriões germinados, tem sido freqüentemente relatado (Sarker et al., 1997; Salvi et al., 2001). Tais problemas foram observados também em outras espécies arbóreas, *Carya illinoensis* (Rodriguez & Wetzstein, 1994) e *Prunus avium* (Garin et al., 1997). A indução de embriogênese somática direta em segmentos nodais e raiz de nim foi obtida após 8 semanas de cultivo em meio MS com adição de BA ou 2,4-D e caseína hidrolisada (CH) (Akula et al., 2003).

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 (Sharry et al., 2006). A diferenciação de embriões somáticos a partir de cotilédones de nim depende da idade dos explantes. No entanto, ainda não existe explicação nos estudos sobre embriogênese somática a partir de cotilédones imaturos, relacionando sua alta capacidade de morfogênese (Gairi & Rashid, 2005).

O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas organogênica e embriogênica de calos cotiledonares de *A. indica*, sob o efeito da combinação de citocinina (BAP) e auxina (ANA).

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Germinação *in vitro***

Plântulas de nim germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. As sementes foram coletadas no viveiro Nim Brasil de São José do Rio Preto (SP). Cotilédones foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1981), com adição de diferentes concentrações de ácido 2,4–diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP). Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultivo, previamente aferido o pH para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave a 120 °C e pressão 1,5 kgf cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos (Rodrigues et al., 2009).

### **Avaliação dos calos no final de cada subcultivo**

Ao final de cada subcultivo, avaliou-se a coloração e textura dos calos, aplicando notas qualitativas. Correspondente a tonalidade temos: (1 = marrom escuro; 2 = marrom claro e 3 = calos brancos), assim como para textura dos calos (1 = calos lisos; 2 = pouco granulado; 3 = granulado e 4 = muito granular). Após a inoculação, os cotilédones foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, sob temperatura de 27 ± 2 °C.

Os subcultivos foram feitos periodicamente a cada 30 dias de cultivo. No quarto subcultivo, os calos foram submetidos em meio WPM contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de vitamina B5 (Gamborg et al., 1968) e com 2 mg L<sup>-1</sup> de diferentes reguladores de crescimento: T0 (controle); T1 (BAP); T2 (ANA); e T3 (GA<sub>3</sub>), para que fosse selecionado o regulador com maior capacidade morfogênica. Na seqüência, os calos foram cultivados em meio de cultura contendo 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e diferentes concentrações, em mg L<sup>-1</sup>, de ANA: T0 (controle); T1 (0,25) ; T2 (0,50); T3 (0,75); e T4 (1,0). Nessa etapa, os calos foram cultivados em frascos de vidro com 90 mm de altura, 50 mm de diâmetro, contendo 40 mL de meio de cultura, 6 amostras por frasco e tampa rígida de polipropileno autoclavável, a partir do quinto subcultivo.

Foi avaliado em calos organogênicos (C.O) a taxa de brotação (T.B), textura dos calos (C.O.T) e coloração (C.O.C), assim como a taxa de embriogênese (T.E.) em calos embriogênicos (C.E), textura dos mesmos (C.E.T) e coloração (C.E.C), do subcultivo

IV ao VIII. A regeneração contabilizada em calos organogênicos refere-se portanto a taxa de brotação, enquanto que nos calos embriogênicos refere-se a taxa de embriões germinados e viáveis.

### **Desenvolvimento dos brotos e embriões germinados**

Após o desenvolvimento dos brotos e germinação dos embriões, os mesmos foram submetidos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sala de crescimento a  $27 \pm 2$  °C de temperatura, irradiância de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Na próxima etapa, foi selecionado o melhor tratamento, e a massa celular foi subcultivada periodicamente a cada 30 dias.

### **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 em cada subcultivo multiplicado por 15. Os dados apresentavam distribuição com parcelas nulas, sendo necessária a transformação dos dados para distribuição normal utilizando raiz quadrada de  $X + 0,5$ .

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 % para a característica brotação e germinação de embriões, e 10 % para textura dos calos e coloração dos mesmos, por serem análises qualitativas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os calos cotiledonares de nim cultivados em meio WPM semi-sólido apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias morfogênicas, organogênese e embriogênese somática a partir do quarto subcultivo. Nesse período, os cotilédones foram cultivados em meio contendo diferentes reguladores de crescimento ( $GA_3$ , BAP ou ANA) a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . O BAP apresentou o melhor resultado para formação de calos friáveis e com capacidade morfogênica e embriogênica.

Citocininas e auxinas podem induzir a formação de calos no mesmo explante. No entanto, o tipo de calo proveniente pode diferir quanto à competência embriogênica ou organogênica (Rodrigues et al., 2009). Conforme relataram Akula et al. (2003), inicialmente os calos de nim possuíam coloração marrom, após oito semanas de cultivo, os mesmos apresentaram porções verde claro, produzindo embriões globulares ao longo da superfície dos calos, como foi observado também no presente trabalho.

Segundo Chaturvedi et al (2003), em média 87 % dos calos produzidos a partir de sementes imaturas cultivadas em meio MS, contendo  $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de ANA +  $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BA e  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de CH, apresentou coloração marrom, desenvolvimento rápido e capacidade morfogênica. Após 5 semanas, houve formação de locos verdes que se manteve após 8 semanas de cultivo.

No entanto, MS adicionado de  $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de BA foi o melhor meio para induzir a organogênese, produzindo, em média, 14 brotos por calo após 3 semanas de cultivo. Porém, tais brotos não cresceram mais que 1 cm. O meio MS contendo  $1 \text{ } \mu\text{M}$  de 2,4-D,  $1 \text{ } \mu\text{M}$  de ANA e  $5 \text{ } \mu\text{M}$  de BA e 9 % de sacarose induziu maior taxa de calos em anteras de nim, após 8 semanas de cultivo (Chaturvedi et al., 2003).

Entretanto, calos após 13 semanas de cultivo em MS e  $0,5 \text{ } \mu\text{M}$  de 2,4-D formaram brotos (4,5 por calo) em 75 % dos explantes. Porém, após esse período ocorreu redução na produção de brotos, e após 28 semanas de cultivo não houve mais brotação. Essa característica morfogênica em função do tempo, também foi observada no presente trabalho, cultivando calos cotiledonares de nim. Inicialmente os calos possuíam coloração castanho, após 4 semanas de cultivo verde com presença de brotações visíveis (Chaturvedi et al., 2003). Embriões somáticos se formaram em alta frequência pela via direta, a partir de explantes cotiledonares imaturos de *Azadirachta indica*, utilizando  $0,5 \text{ } \mu\text{M}$  de TDZ como regulador de crescimento. No entanto, a maior taxa embriogênica ocorreu na presença de  $1 \text{ } \mu\text{M}$  de TDZ (Gairi & Rashid, 2005).

Em média 77 % dos brotos formados a partir de calos de anteras se desenvolveram atingindo 5 cm de altura, após 8 semanas de cultivo. Posteriormente tais brotos foram enraizados e aclimatizados. Para enraizamento, foi utilizado MS/4 contendo com 0,5  $\mu\text{M}$  de AIB. Após 4 semanas de cultivo, 80 % do explantes formaram em média 5 raízes, sobrevivendo cerca de 83 % dos explantes transplantados (Chaturvedi et al., 2003).

A primeira característica estudada foi a taxa de brotação (T.B.) em calos organogênicos (C.O.) em função dos subcultivos periódicos de 30 dias. O maior número de brotações (1,43) foi no quinto subcultivo, no tratamento T1 com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Em relação à textura dos mesmos (C.O.T.), a maior taxa (1,95) foi apresentada no sexto subcultivo para o tratamento T2 com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,50 mg L<sup>-1</sup> de ANA, correspondendo calos mais granulares (Quadro 1).

**Quadro 1:** Avaliação da taxa média de morfogênese, textura e coloração de calos organogênicos e embriogênicos provenientes de cotilédones de *A. indica* em função dos subcultivos. Taxa média de brotação (T.B.); calos organogênicos textura (C.O.T.); calos organogênicos coloração (C.O.C.); taxa média de embriões germinados (T.E.); calos embriogênicos textura (C.E.T.) e calos embriogênicos coloração (C.E.C.).

Subcultivos	ORGANOGENESE			EMBRIOGENESE		
	T.B.	C.O.T.	C.O.C.	T.E.	C.E.T.	C.E.C.
IV	1,25 a	1,54 c	1,51 c	2,91 a	1,60 c	1,31 c
V	1,43 a	1,78 b	1,60 b	2,66 a	1,92 a	1,53 b
VI	1,18 b	1,95 a	1,77 a	1,54 b	1,74 b	1,67 b
VII	0,92 c	1,83 b	1,79 a	1,08 b	1,79 b	1,80 a
VIII	0,83 c	1,90 a	1,82 a	0,87 c	1,86 a	1,83 a

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si a 5 % pelo teste de Tukey para cada característica ao longo dos subcultivos.

Quanto a coloração (C.O.C.), o maior valor foi encontrado no oitavo subcultivo, no tratamento T4 com 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, correspondendo a calos mais claros. Portanto, para os calos organogênicos a tendência, ao longo dos subcultivos, foi redução na taxa de brotação, a textura dos calos passou de liso para granular e a coloração deixando a tonalidade marrom escuro para branco. Conforme descrito por Zypman et al. (2001), calos embriogênicos foram produzidos a partir de cotilédones, hipocótilo e folhas de nim. Tais calos possuíam diferenças quanto à

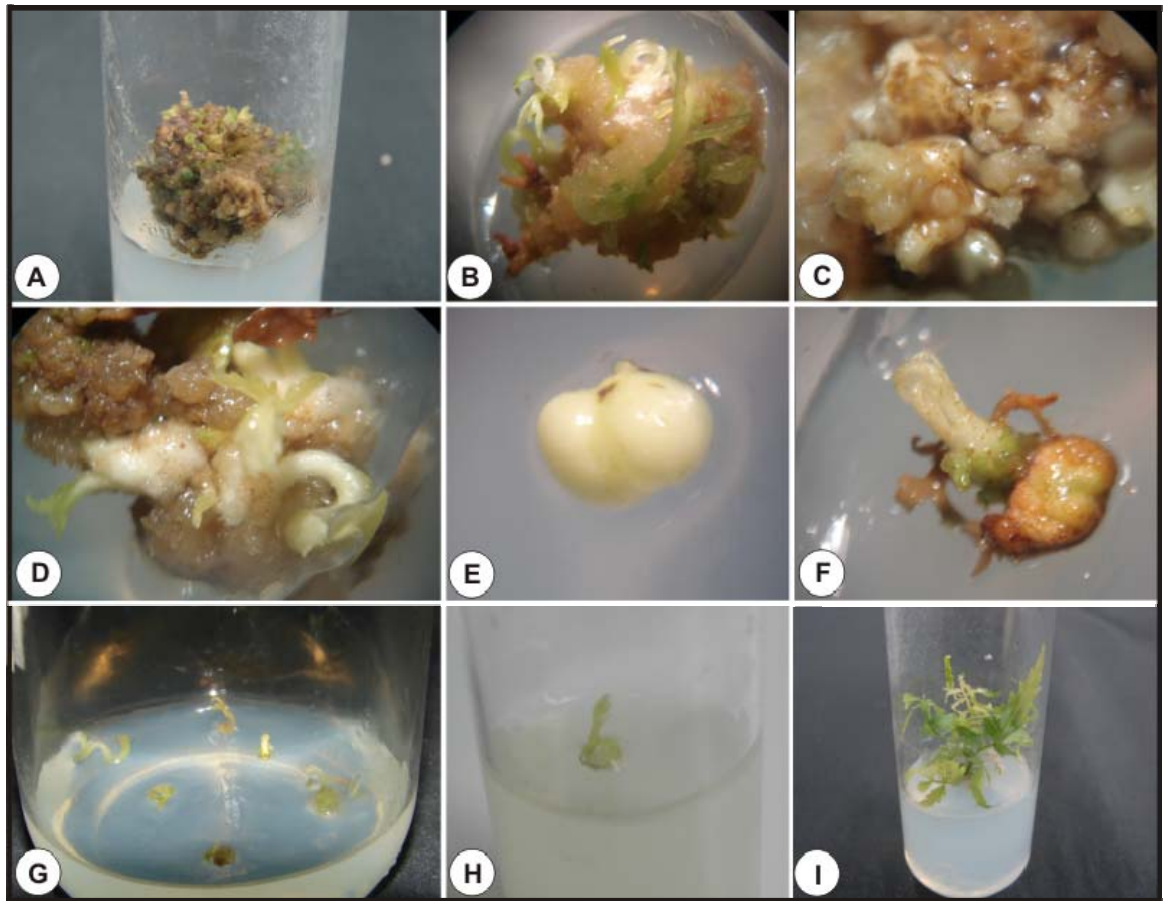
coloração, branco, verde, amarelo ou marrom, com aspecto friável e potencial embriogênico quando incubados à luz.

Os resultados demonstram que calos provenientes de hipocótilos, possuem competência celular para induzir o processo de organogênese e embriogênese somática após 3 meses de cultivo, característica essa muito relevante em calos de nim. Inicialmente, os calos possuíam coloração marrom e castanha, com aspecto de necrose, posteriormente formando calos com capacidade embriogênica (Zypman et al., 2001).

No presente trabalho, a mesma tendência quanto à taxa média de embriogênese, textura e coloração foram observadas em calos embriogênicos, onde a maior taxa de germinação (2,91) de embriões (C.E.R.) foi no quarto subcultivo, no tratamento T1, reduzindo a taxa ao longo dos subcultivos. Quanto à textura, a maior taxa com tendência a formação de calos granulares, apresentou-se no oitavo subcultivo, com valor (1,86) no tratamento T4. Já para característica coloração, a maior taxa (1,83) com tendência a cor branca, apresentou-se no oitavo subcultivo também para o tratamento T4. Tais resultados evidenciam a interação tripla entre taxa de morfogênese, textura dos calos e coloração. Onde calos com textura mais granular e com coloração marrom escuro apresentam maior competência celular, viabilizando a diferenciação celular e conseqüentemente maior taxa de morfogênese pelas duas vias observadas: organogênese indireta e embriogênese somática indireta (Figura 1).

Apesar da capacidade morfogênica, muitos explantes apresentaram problemas em sua formação e desenvolvimento, implicando diretamente na taxa de sobrevivência das mudas na fase de enraizamento e aclimatização. Os problemas mais freqüentes foram senescência precoce e hiperidricidade para os brotos a partir de calos organogênicos e fusão dos cotilédones e oxidação de embriões somáticos a partir de calos de nim.

A embriogênese somática direta foi induzida utilizando meio MS, contendo 5  $\mu$ M de BAP. A maior taxa de produção foi de 52 %, onde foi observado embriões na fase globular e torpedo. Quando cultivados em MS basal, houve continuidade do desenvolvimento dos embriões e enraizamento dos mesmos após 4 semanas de cultivo. Os problemas mais recorrentes foram anormalidades morfológicas durante o desenvolvimento, como pluricotilédones, fusão de cotilédones e ausência destes. Raramente foram encontrados embriões somáticos em perfeito estado morfológico, necessitando de mais estudos para elucidar tais evidências, a fim de aperfeiçoar o protocolo de embriogênese somática de nim (Chaturvedi et al., 2004).



**Figura 1:** Desenvolvimento de calos organogênicos e embriogênicos de nim, a partir de calos cotiledonares. **A)** Calo embriogênico com formação de embriões somáticos na superfície, apresentando textura granular e coloração marrom escuro; **B)** Calo organogênico com formação de brotos, textura pouco granular e coloração marrom claro; **C)** Formação de embriões globulares; **D)** Germinação de embriões somáticos *in vitro*; **E)** Embrião na fase de coração; **F)** Embrião germinado; **G)** Desenvolvimento de embriões em meio MS basal; **H)** Embrião isolado em desenvolvimento; **I)** Embrião aos 40 dias de cultivo.

Segundo Gairi & Rashid (2005), o número médio de embriões somáticos por explantes foi alto, quando utilizado meio MS contendo 10  $\mu\text{M}$  de ANA e 1  $\mu\text{M}$  de KIN. Já em meio SH, contendo 0,5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D e 2  $\mu\text{M}$  de BA, houve redução na produção de embriões. No entanto, em outro protocolo, embriões foram obtidos utilizando a combinação de BA e ANA em meio MS, com alta concentração de sacarose (12 %), promovendo inclusive a germinação dos mesmos (Thiagarajan & Murali, 1994). Em alguns casos, a aplicação de TDZ foi eficaz para induzir a embriogênese conforme descrito por Yasseen (1994), e indução de embriões somáticos de nim (Murthy & Saxena, 1998).

Os embriões somáticos tenderam a separar do explante inicial, caracterizando a individualidade dos mesmos em relação ao explante inicial, por possuir tecido vascular na conectado ao do tecido original, típico de embriões somáticos de nim Akula et al.

(2003), características essas também observadas no presente trabalho. Folhas de nim cultivadas em meio MS ou (NN) Nitsch & Nitsch 1969, contendo com diferentes concentrações de auxinas e citocininas induzem a formação de calos embriogênicos. Os resultados mostraram que o meio MS contendo 1  $\mu\text{M}$  de ANA e 10  $\mu\text{M}$  de KIN, induziu a formação de calos embriogênicos com textura friável (Te-chato & Rungnoi, 2000).

Outra informação importante foi a constante ocorrência de embriogênese direta a partir de embriões, precedida por calos, na presença de 5  $\mu\text{M}$  de BAP. No entanto, tais explantes teve crescimento médio de 2 cm. Quando subcultivados em meio contendo 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP, 85 % dos brotos alongaram atingindo em média 6 cm, após 8 semanas de cultivo. Para o enraizamento foi utilizado meio MS adicionado de 1  $\mu\text{M}$  de BAP e 250  $\text{mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada, obtendo-se 81 % das brotações com desenvolvimento radicular (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  $\mu\text{M}$  de BA e 4,52 a 6,78  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico (ABA) e 2 % de sacarose. O percentual máxima (64,2 %) de germinação foi obtida com 0,94  $\mu\text{M}$  de ABA, após 2 semanas de cultivo *in vitro*.

Os embriões somáticos geralmente desenvolveram um ou dois cotilédones, apesar de alguns embriões apresentarem anormalidades. Segundo Rout (2005), o meio contendo  $\text{GA}_3$  não foi favorável no processo de germinação de embriões somáticos de nim, e os embriões saudáveis foram aclimatizados, resultando em um protocolo eficiente para produção de clones e transformação genética de nim.

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 (10  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP e adenina). Foi demonstrado que a adenina é precursora das purinas, realizando agrupamento com as citocininas e auxiliam na produção de ATP (Chen et al., 1985). Houve praticamente 100 % de conversão dos embriões somáticos em plantas aclimatizadas. As plantas eram normais fenotipicamente, porém, no presente experimento, muitos embriões apresentavam morfologia anormal, causando problemas na fase de enraizamento e aclimatização.

Morfogênese *in vitro* de nim, foi obtida a partir de segmentos foliares e meristema apical caulinar. A associação de citocinina com hemissulfato de adenina causa 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 indolacético (AIA) no meio de cultura, o que apóia a hipótese que a *Azadirachta indica* possui elevada quantidade endógena de auxina, causando inibição de brotação na presença de auxina no meio de cultura (Arora et al., 2009). A baixa produtividade de morfogênese na presença de auxina também foi observada em outras espécies (Singh et al., 2002; Pati et al., 2004).

## CONCLUSÕES

Os calos cotiledonares de nim apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias regenerativas, organogênese e embriogênese somática, a partir do quarto subcultivo, quando submetido em meio WPM contendo  $2 \text{ mg de L}^{-1}$  BAP e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Os calos mais granulares e de coloração marrom escuro formaram embriões somáticos, enquanto que calos menos granulares e de coloração mais clara apresentaram formação de brotos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em especial nesse capítulo a técnica Elisonete Garcia Lani pelo auxílio no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Bioagro, UFV e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- 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 - Pant**, v. 39, p. 304–310, 2003.
- CHATURVEDI, R.; RAZDAN, M.K & BHOJWANI, S.S. An efficient protocol for the production of triploid plants from endosperm callus of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 557–564, 2003.
- 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.
- CHEN, C.H.; ERTL, J.; LEISNER, S. & CHENG, C.H. Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. **Plant Physiology**, v. 78, n. 3, p. 510–513, 1985.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**, release versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 2001.
- GAIRI, A. & RASHID, A. Direct differentiation of somatic embryos on cotyledons of *Azadirachta indica* A. Juss. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 169–173, 2005.
- 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.
- GARIN, E.; GRENIER, E. & GRENIER-DE-MARCH, G. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 83–92, 1997.
- GAUTAM, V.; NANDA, K. & GUPTA, S. Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A. Juss – a medicinal tree. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 13–18, 1993.
- LLOYD, G & MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421–427, 1981.
- MURALIDHARAN, E.M. & MASCARENHAS, A.F. *In vitro* morphogenesis in *Azadirachta indica* A. Juss. and *Eucalyptus citriodora* Hook. f. **Tissue culture and**

**biotechnology of medicinal and aromatic plants**, CIMAP, Lucknow, pp. 49–55, 1989.

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

MURTHY, B.N.S & SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis and plant regeneration of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 469–475, 1998.

NITSCH, J.P. & NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85–87, 1969.

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, n. 1, p. 21–26, 2009.

RODRIGUEZ, A.P.M. & WETZSTEIN, H.Y. The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. **Plant Cell Reports**, v. 13, p. 607–611, 1994.

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.

SALVI, N.D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S & EAPEN, S. Plant regeneration from different explants of neem. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 159–162, 2001.

SARKER, R.H.; ISLAM, M.R. & HOQUE, M.I. *In vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) plants from seedling explants. **Plant Tissue Culture**, v. 7, p. 125–133, 1997.

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.

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.

TE-CHATO, S. & RUNGNOI, O. Induction of somatic embryogenesis from leaves of Sadao Chang (*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs). **Scientia Horticulturae**, v. 86, 311–321, 2000.

THIAGARAJAN, M. & MURALI, P.M. Optimum conditions for embryo culture of *Azadirachta indica* (A. Juss.). **Indian Forester**, v. 120, p. 500–503, 1994.

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.

YASSEEN, Y.M. Shoot proliferation and plant formation from neem with thidiazuron. **Hortscience**, v. 29, p. 515, 1994.

ZYPMAN, S.; APPLEBAUM, S.W. & ZIV, M. Production of Desert Locust Feeding Deterrents from *in vitro* cultured neem (*Azadirachta indica*). **Phytoparasitica**, v. 29, p. 1–8, 2001.

## CAPÍTULO 4

### **Indução da biossíntese de azadirachtina em calos cotiledonares de nim a partir de agentes elicitores**

#### **RESUMO**

O uso de técnicas de cultura de células e tecidos vegetais para produção de princípios ativos de interesse econômico tem sido crescente. Dentre essas substâncias, destaca-se a azadirachtina (AZA) por sua ação bioinseticida, produzida pela espécie *Azadirachta indica*. O presente trabalho tem como objetivos analisar os teores de AZA em calos cotiledonares de nim, cultivados em meio líquido WPM, na presença e ausência glicose (fonte de carbono), caseína hidrolisada (fonte de nitrogênio) e metil jasmonato (agente elicitor). Observou-se interação entre as substâncias utilizadas, em função do tempo de cultivo *in vitro* sob agitação orbital. As maiores concentrações de AZA foram produzidas na primeira e segunda semanas de cultivo, com média de  $0,2470 \mu\text{g g}^{-1}$ , quando a massa celular foi cultivada em meio de cultura com adição de 2 % de glicose,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de CH e  $100 \mu\text{m}$  de MeJ. Esse valor corresponde, em média, a 57 % do teor de AZA armazenado nas sementes das plantas matrizes, utilizadas como fonte de explantes para indução de calogênese *in vitro*, quando avaliado pelo método de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Conclui-se que a nutrição, assim como a concentração de elementos de transdução de sinal em células de nim, pode influenciar no teor de AZA produzido *in vitro*.

**Palavras chave:** AZA, HPLC, glicose, caseína hidrolisada e metil jasmonato.

## **Azadirachtin biosynthesis induction in neem cotyledonary calli by elicitor agents**

### **ABSTRACT**

The use of cell and plant tissues culture techniques to produce economically important active metabolites has been growing. Among these substances, highlights the azadirachtin (AZA) due to its bioinsecticide action. It is produced by *Azadirachta indica* species. The main goal of this work was to analyze the levels of AZA in neem cotyledonary callus, grown in liquid WPM medium supplemented with glucose (carbon source), hydrolyzed casein (nitrogen source) and methyl jasmonate (elicitor agent). It was observed that there was an interaction between these substances, depending on *in vitro* cultivation time with orbital agitation. The highest concentrations of AZA were produced in the first and second weeks of culture, with an average of  $0.2470 \mu\text{g g}^{-1}$ , when the cell mass was grown in culture medium with 2% glucose, 500 mg L<sup>-1</sup> CH and 100 mg of MEJ added. This corresponds, on average, to 57% of AZA content stored in mother plants seeds, used as a source of explants to induce *in vitro* callus formation, as measured by the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. It is concluded that nutrition, as well as the concentration of signal transduction elements in neem cells, may influence the AZA content produced *in vitro*.

**Keywords:** AZA, HPLC, glucose, hydrolysed casein, methyl jasmonate.

## INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Conselho e Investigação dos EUA, o neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) tem se tornado uma das plantas mais promissoras em todo o mundo, devido suas diversas aplicações (Kundu, 1999). Dos vários compostos bioativos produzidos pelo nim, o mais utilizado é a azadirachtina (AZA), armazenado principalmente nas folhas e sementes (Thengane et al., 1995).

Quimicamente a molécula de AZA é complexa, o que impossibilita a produção sintética. Desse modo, a cultura de células e tecidos surge como uma possibilidade, a fim de se produzir *in vitro* metabólitos de interesse econômico, independente de problemas edáficos. Além disso, a biotecnologia podem otimizar a produção de compostos bioativos, utilizando agentes elicitores, dentre outros métodos (Prakash et al., 2002).

Akula et al. (2003) relataram que não houve detecção de AZA em massa fresca de embriões somáticos de nim, utilizando-se HPLC como método para avaliar a presença e a quantidade do composto. Entretanto, o extrato desses embriões somáticos afetou o desenvolvimento de larvas de gafanhoto, sendo uma constatação importante, pois podemos inferir que há síntese de AZA ou de outro metabólito que afete o desenvolvimento de insetos, apesar de não ser detectado em HPLC, devido o baixo teor em embriões somáticos.

Esses aparentes problemas nas análises pelo detector UV em HPLC, pode ocorrer devido à baixa sensibilidade do detector, por causa da falta de absorção UV-forte no cromóforo molecular, podendo causar erros no processo de leitura e quantificação do teor de AZA (Schaaf et al., 2000). Em geral, o rendimento destes metabólitos secundários é geneticamente determinado.

No entanto, a produção de AZA depende também de fatores climáticos, nutricionais, maturidade das sementes, período de armazenagem, manejo e pós-colheita. O cultivo de células e tecidos vegetais podem aperfeiçoar, padronizar e aumentar a produção de compostos de valor econômico (Kota et al., 2006). O objetivo desse trabalho foi analisar a produção de AZA *in vitro*, utilizando-se calos cotiledonares de nim em meio líquido sob influência dos agentes elicitores glicose, caseína hidrolisada e metil jasmonato.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de calos

Plantas de nim germinadas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes para este experimento. As sementes foram coletadas no viveiro Nim Brasil de São José do Rio Preto (SP). Cotilédones foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1981), com adição de 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mgL<sup>-1</sup> de AIB , em tubos de ensaio (25 X 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultivo, previamente aferido o pH para 5,8 e submetido à esterilização em autoclave a 120 °C e pressão 1,5 kgf cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos, metodologia adaptada de Rodrigues et al. (2009).

### Cultivo dos calos

Os calos foram cultivados em frascos de vidro com 90 mm de altura, 50 mm de diâmetro, contendo 40 mL de meio de cultura, 6 amostras por frasco e tampa rígida de polipropileno autoclavável a partir do terceiro subcultivo, com adição de 200 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,5 g L<sup>-1</sup> polivinil-pirrolidona (PVP), 2% (p/v) sacarose, 1 mg L<sup>-1</sup> de vitaminas B5 (Gamborg et al., 1968), e aferido o pH para 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C, pressão 1,5 kgf cm<sup>-2</sup> durante 15 minutos. Os calos foram cultivados na ausência de luz, evitando a oxidação e degradação das moléculas de AZA em Erlenmeyer de 125 mL com 40 mL de meio líquido e 3 amostras de calos cotiledonares de nim. Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação orbital de 90 rpm.

### Cultivo na presença de agentes indutores

Foi avaliado o efeito de características conjugadas, na produção de AZA *in vitro*: **1.** diferentes concentrações de glicose (GL) como fonte de carbono (0; 1; 2; e 4 %); **2.** diferentes concentrações de caseína hidrolisada (CH) como fonte de nitrogênio (0; 250; 500; 1000 mg L<sup>-1</sup>); **3.** diferentes concentrações de metil jasmonato (MeJ) como agente elicitor (0; 50; 100; 200 µM) em função do tempo. Os tratamentos formados foram: T0 (controle); T1 (1 % de GL + 250 mg L<sup>-1</sup> de CH + 50 µM de MeJ); T2 (2 % de GL + 500 mg L<sup>-1</sup> de CH + 100 µM de MeJ); T3 (4 % de GL + 1000 mg L<sup>-1</sup> de CH +

200  $\mu\text{M}$  de MeJ). A condução desse experimento foi realizada com coletas periódicas semanais (0; 1; 2; 3 e 4). Foi coletado no final de cada período, 3 erlenmeyer x 4 tratamentos = 12 Erlenmeyers. A massa seca foi pesada após secagem em estufa a 60 °C por 24 horas, estabelecendo-se um valor padrão de 0,75 g para cada Erlenmeyer coletado. Do mesmo modo, sementes de nim foram moídas e secas em estufa para obtenção da massa seca, maceração em metanol, filtragem e injetado em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), a título de comparar o teor de AZA produzido nos tratamentos com o teor *in natura*.

### **Obtenção do extrato solúvel em metanol**

A massa seca dos calos, assim como a massa seca das sementes foram divididas em 3 porções de 0,25 g e armazenadas em Eppendorf, acrescido de 1 mL de metanol por amostra. Após 24 horas de incubação, as amostras foram centrifugas a 3000 rpm durante 10 minutos, para serem injetadas posteriormente em HPLC para se determinar o teor de AZA presente no extrato solúvel em metanol.

### **Determinação dos teores de AZA**

A análise dos teores de AZA foi realizada no Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se o equipamento HPLC SHIMADZU SPD-10 AVP e metodologia de Schaaf et al. (2000), com algumas modificações. O detector utilizado foi ultravioleta (UV) com comprimento de ondas de 217 nm. Foi utilizado uma coluna de fase reserva Bondesil C18 (5  $\mu\text{m}$  x 4,6 mm x 250 mm), fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  e pressão na coluna de 97 Kgf. O solvente utilizado como fase móvel foi metanol e água (50:50), enquanto que o volume injetado para cada corrida foi de 50  $\mu\text{L}$ . O tempo de cada corrida foi de 30 minutos. Toda fase móvel foi filtrada com membrana Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$  e degaseificada com gás hélio. Os dados foram integrados pelo programa SHIMADZU SPD.

Para a obtenção da curva padrão, foi utilizada AZA com 95 % de pureza (Sigma Aldrich, EUA), em concentrações de 0; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  em metanol. Os valores obtidos nos cromatogramas, correspondentes às concentrações

citadas acima, foram plotados em gráfico, obtendo-se a equação da reta (Figura 1B) para o cálculo do teor de AZA das amostras. A título de comparação do teor de AZA produzido pelos calos, utilizou-se o extrato *in natura* de sementes de nim, também submetidas às mesmas condições descritas de extração.

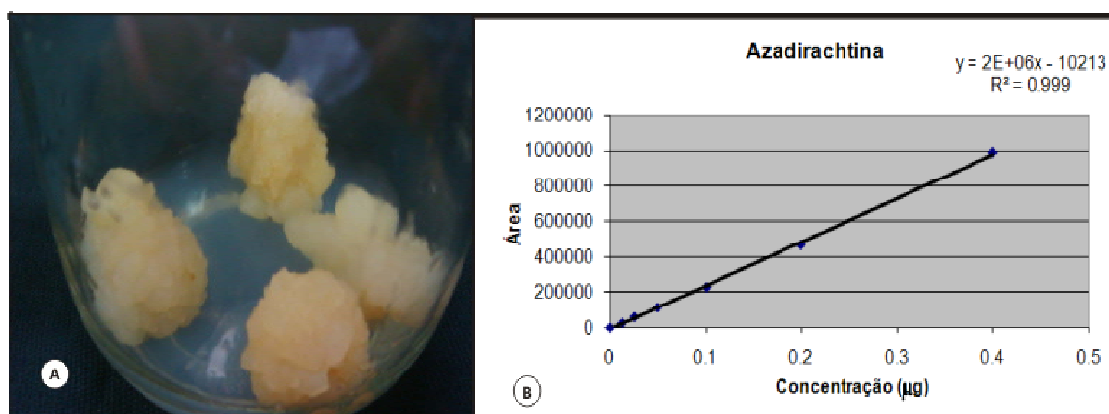
### **Delineamento experimental**

Foi utilizado fatorial simples, concentração dos agentes elicitores x períodos de coleta, com 9 repetições por tratamento. 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 com dois fatores, considerando-se o nível de significância de 5 % para a característica quantidade de AZA em função da concentração dos agentes elicitores e tempo de coleta semanal.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A AZA é um tetranoterpenóide (fórmula molecular  $C_{35}H_{44}O_{16}$ , peso molecular  $720 \text{ g mol}^{-1}$ ), sendo a molécula mais abundante em sementes de nim, em relação aos outros limonóides. O teor detectado de AZA no extrato de sementes foi superior em relação ao extrato de calos cultivados *in vitro*, utilizando UV na frequência de 217 nm como também relata (Schaaf et al., 2000). Existe o efeito da expressão gênica diferencial de diversos metabólitos secundários *in vitro* de nim, decorrente do polimorfismo das moléculas de DNA e sua amplificação, resultantes da variação somaclonal dos explantes foliares e calos ao longo de subcultivos (Kota et al., 2006).

O aspecto dos calos cultivados em meio semi-sólido antes da montagem do experimento em meio líquido, assim como a curva de calibração da AZA, usando-se o padrão (Figura 1).



**Figura 1:** Calos cotiledonares de *A. indica* subcultivados a cada 30 dias em meio WPM. **A)** Calos do nono subcultivo em meio de cultura semi sólido, utilizados posteriormente em meio líquido; **B)** Regressão de calibração do padrão da AZA, onde a concentração do composto das amostras de calos em ( $\mu\text{g}$ ) foram calculadas em função da equação apresentada, com  $R^2 = 0,999$ .

Segundo Raval et al. (2003), a maior concentração de AZA ( $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi observada em células com 9 dias de cultivo em meio de White (1963). No entanto, esses resultados mostram que o aumento de biomassa não está relacionado diretamente com a produção de AZA *in vitro* e sim diretamente relacionada com a queda da taxa de transferência de oxigênio (OTR), caracterizando a fase estacionária do crescimento celular.

O processo de produção de AZA pode ser otimizado, quando aplicadas duas fases. A primeira fase caracteriza-se por altos teores de nitrogênio e fósforo para aumentar a biomassa, e a segunda fase caracterizada por baixas concentrações de

minerais, causando estresse nutricional nos explantes, reduzindo a OTR. Como consequência, ocorre aumento da produção de AZA. Após aplicação do sistema bifásico, a maior concentração de AZA produzida *in vitro* chegou a 67,5 % (2,7 mg L<sup>-1</sup>) em relação o teor médio do composto nas sementes *in natura* (Raval et al., 2003).

No presente trabalho, também foi aplicado o sistema bifásico, porém, com indução do rápido crescimento celular via reguladores de crescimento, e posteriormente submetendo tais células em meio líquido sob ação de agentes elicitores: glicose como fonte de carbono, caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio e metil jasmonato como elemento de transdução de sinal. Prakash et al. (2002) observaram que o tipo de nutrição influenciou diretamente no teor de AZA, com destaque para as fontes de carboidratos. Metil jasmonato e ácido jasmônico têm sido muito utilizados para estimular a produção de compostos de interesse econômico, por serem elementos de transdução de sinais em rotas de metabólitos secundários em plantas (Zid & Orihara, 2005).

Conforme relatam Prakash & Srivastava (2005), glicose foi a melhor fonte de carbono para produção de biomassa em relação à sacarose, estimulando, inclusive, maior taxa de AZA. Do mesmo modo, nitrato foi a melhor fonte de nitrogênio para produção de biomassa e acúmulo de AZA *in vitro* em relação à amônia.

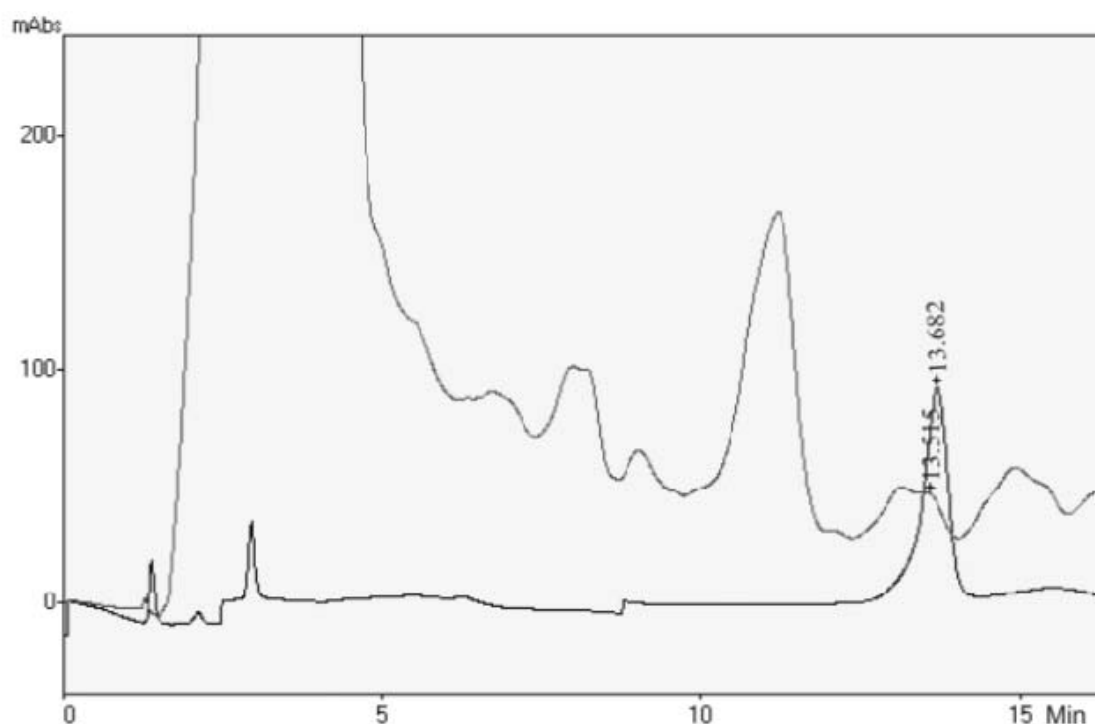
O valor máximo de biomassa foi de 15,02 g L<sup>-1</sup> e 2,98 mg g<sup>-1</sup> de AZA, após 12 dias de cultivo, otimizando a composição nutricional do meio de cultivo e aditivos. A alta concentração de amônio apresentou efeito inibitório sobre o crescimento celular e na produção de AZA (Prakash & Srivastava, 2005).

O meio de cultura Ohyama & Nitsch's (1972), proporcionou maior produção *in vitro* de AZA (0,0166 % massa seca). Com a adição de agentes elicitores como ácido jasmônico (100 mM) e ácido salicílico (100 mM), resultou no aumento da produção em 6 vezes (0,095 %) e 9 vezes (0,14 %), respectivamente, de AZA em explantes radiculares de nim (Satdive et al., 2007). Agentes elicitores bióticos e abióticos têm sido recomendados como estratégia importante para otimizar a produção de metabólitos secundários *in vitro* (Savitha et al., 2006).

O ácido jasmônico (AJ) é considerado como agente sinalizador para produção de compostos bioativos em plantas que sofrem estresse mecânico por insetos (Prakash & Srivastava, 2008). Desse modo, a produção e o teor de AZA são influenciados pelo sistema nutricional aplicado em meios de cultura e a concentração dos agentes utilizados para estimular a biossíntese do composto. Conforme os cromatogramas apresentados na Figura 2, o tempo de retenção da AZA padrão foi de 13,682 minutos,

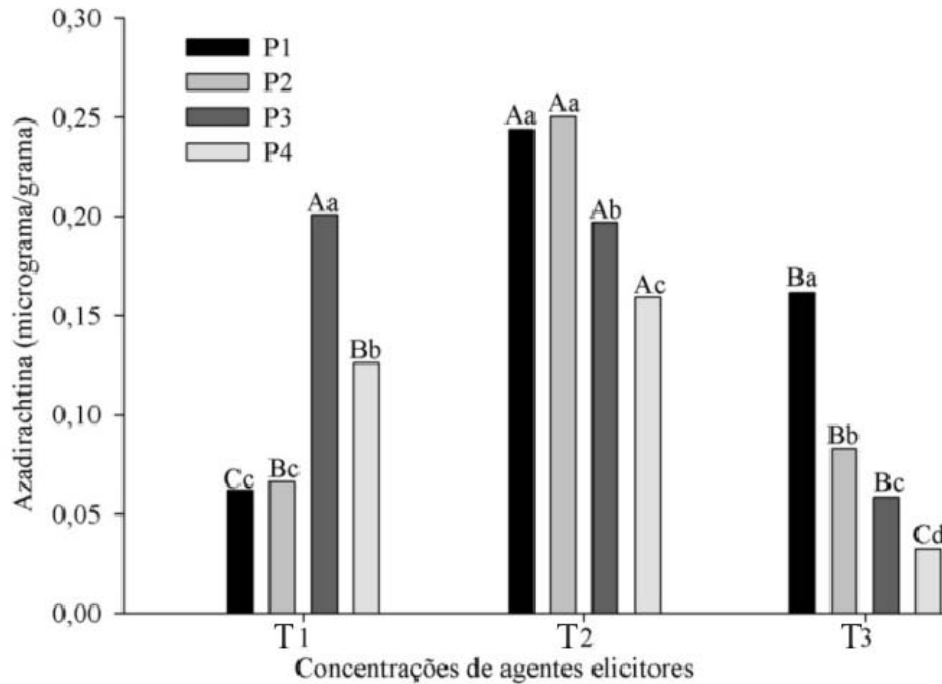
enquanto que do melhor tratamento T2P2 foi de 13,515 minutos, trazendo confiabilidade da análise do composto desejado, na frequência de UV 217 nm.

As concentrações de AZA foram obtidas por meio da integração das áreas dos cromatogramas. Com a sobreposição dos mesmos, é possível observar que de fato o composto analisado foi a AZA, devido a padronização do tempo de retenção do “padrão” e da amostra em evidência.



**Figura 2:** Cromatograma gerado pela técnica de HPLC. O tempo de retenção do padrão da AZA com 95% de pureza (Sigma Aldrich-EUA) foi de 13, 682 minutos, enquanto que do tratamento dois no período dois (T2P2 = 2% de GL + 500 mg L<sup>-1</sup> de CH + 100 μM de MeJ) foi de 13,515 minutos.

De acordo com os resultados apresentados, houve interação significativa entre as concentrações dos agentes elicitores em função do tempo de coleta das amostras. A maior concentração de AZA foi produzida no tratamento T2 com o incremento de 2 % de glicose, 500 mg L<sup>-1</sup> de CH e 100 μM de MeJ (Figura 3). Os períodos de maior produção foram registrados na primeira e segunda semanas de coleta, com concentração média de 0,247 μg de AZA por grama de matéria seca de calo do décimo subcultivo *in vitro*, onde cada subcultivo foi realizado após 30 dias, contabilizando-se 300 dias.



**Figura 3:** Concentração de AZA em  $\mu\text{g}$  por grama de matéria seca de calos cotiledonares cultivados *in vitro*, sob a influência de diferentes concentrações de agentes elicitores: **T1** [1% glicose (GL) + 250  $\text{mg L}^{-1}$  de caseína hidrolisada (CH) + 50  $\mu\text{M}$  de metil jasmonato (MeJ)]; **T2** [2% (GL) + 500  $\text{mg L}^{-1}$  (CH) + 100  $\mu\text{M}$  (MeJ)] e **T3** [4% (GL) + 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (CH) + 200  $\mu\text{M}$  (MeJ)], em função dos períodos (**P1** à **P4**) de coleta semanal.

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem entre si a 5 % pelo teste de Tukey dentro de cada concentração **T1**, **T2** e **T3**, enquanto que médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro dos períodos de coleta **P1**, **P2**, **P3** e **P4**.

O teor de AZA do tratamento (T2P2) corresponde a 57 % do teor de AZA armazenado nas sementes das plantas adultas de nim ( $0,4301 \mu\text{g g}^{-1}$ ), que foram coletadas no viveiro nim Brasil. A maior taxa de produção de AZA nas raízes de nim, segundo Sundaram (1996), foi aos 28 dias de cultivo, equivalente a  $70 \mu\text{g g}^{-1}$  de tecido radicular. Conforme as análises, a concentração de AZA em raízes transformadas de nim foi dez vezes maior em relação ao teor encontrado em calos. Essa concentração de AZA foi aproximadamente 30 vezes maior do que a detectada em raízes *in vivo* de nim.

No entanto, o rendimento *in vitro* ainda é baixo, necessitando de mais estudos, com objetivo de otimizar a produção de AZA, aplicando biotecnologia mais avançada. A relação do crescimento e multiplicação celular, em função da taxa de produção de AZA *in vitro*, ainda não foi elucidada, pois essa relação não se apresenta de modo linear, indicando complexidade no processo de produção. Onde mais de 70 % da atividade biológica da AZA foi perdida após 30 dias de armazenamento (Allan et al., 2002).

Em relação aos controles do presente trabalho, sem incremento dos agentes elicitores em função do tempo, houve formação apenas de “traços” nos cromatogramas, correspondendo baixas concentrações de AZA, não sendo possível integrar as áreas apresentadas. Babu et al. (2006) descreveram não ser possível quantificar pelo método aplicado de HPLC a presença de AZA em calos até o terceiro subcultivo, ou seja, com 120 dias de cultivo. Porém, foi detectado nimbim no mesmo período de coleta de calos, não necessitando de diferenciação dos calos. Por isso, especulou-se que não seja necessária a diferenciação celular para biossíntese de triterpenóides *in vitro*.

A capacidade de produção de AZA foi observada também em rizogênese, a partir de explante foliar e caulinar de nim, após infecção por *Agrobacterium rhizogenes*, com crescimento médio de 0,134 g de massa seca por dia, causando aumento em 100 vezes da biomassa após 4 semanas de cultivo. As raízes continham 70 ppm (0,007 %) de AZA, 120 ppm (0,012 %) de 3-acetil-1-tigloylazadirachtin e 20 ppm (0,002 %) de 3-tigloylazadirachtol (AZA B) (Allan et al., 2002).

Agentes elicitores como quitosana, ácido salicílico, ácido jasmônico, metil-jasmonato e extrato de levedura têm sido utilizados em suspensão celular de nim para promover maior produção de AZA *in vitro*. Além disso, a combinação desses agentes é capaz de promover o aumento da produção de AZA em até 5 vezes (15,9 mg L<sup>-1</sup>), devido o efeito sinérgico das moléculas após 2 dias de cultivo. Utilizando-se ANA e agentes elicitores em biorreator, a concentração chegou em 161,1 mg L<sup>-1</sup>. A adição de ácido salicílico em concentração mais baixa (14 mg L<sup>-1</sup>) resultou em efeito inibitório, porém em concentrações mais elevadas (70 mg L<sup>-1</sup>) resultou em aumento da produção (16,8 g L<sup>-1</sup>) (Prakash & Srivastava, 2008).

Outro agente estimulante da biossíntese de AZA é o extrato de levedura em altas concentrações (100 mg L<sup>-1</sup>), resultando em 6,5 mg g<sup>-1</sup> de produção, enquanto o controle foi de 3,2 mg g<sup>-1</sup>. As combinações mais promissoras foram: (AS+JA) e (Q+AS), nas seguintes concentrações: AS = 137,3 mg L<sup>-1</sup>; AJ = 2,9 mg L<sup>-1</sup> e Q = 16,5 mg L<sup>-1</sup>. O teor de AZA chegou a 18,4 mg g<sup>-1</sup> devido o efeito sinérgico das moléculas, após 10 dias de cultivo, posteriormente houve redução na concentração do composto (Prakash & Srivastava, 2008). Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho.

De acordo com Sujanya et al. (2008), a relação nitrato 94,41 mM: amônia 23,60 mM (4:1) e redução da sacarose (15 mg L<sup>-1</sup>) aumentou a produção de AZA (5,59 mg L<sup>-1</sup>). Porém, apresentou uma redução na biomassa em 7,4 %, quando cultivada suspensão celular a partir de segmentos nodais em meio MS. A baixa concentração de fosfato no

meio de cultivo resultou no aumento da produção de AZA, fato esse já estudado para outras espécies, demonstrando a relação direta do baixo percentual de fosfato e aumento da biossíntese de metabólitos secundários. Após o esgotamento do fosfato, a taxa de AZA chegou a 6,98 mg L<sup>-1</sup>.

## CONCLUSÕES

As maiores concentrações de AZA foram produzidas na primeira e segunda semanas de cultivo, com média de  $0,2470 \mu\text{g g}^{-1}$  no segundo período de coleta, quando a massa celular foi cultivada em meio de cultura WPM líquido, com adição de 2% de glicose +  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de CH +  $100 \mu\text{m}$  de MeJ.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em especial nesse capítulo ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela utilização do Laboratório de Análises Bioquímicas, Bioagro, UFV, ao técnico Eduardo Rezende Pereira pela colaboração e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- ALLAN, E.J.; EESWARA, J.P.; JARVIS, A.P.; MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D. & STUCHBURY, T. Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 374–379, 2002.
- BABU, V.S.; NARASIMHAN, S. & NAIR, G.M. Bioproduction of azadirachtin-A, nimbin and salannin in callus and cell suspension cultures of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Current Science**, v. 91, n. 1, 2006.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**, release versão Windows. Editora UFV, Viçosa, 2001.
- 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.
- KOTA, S.; RAGHUPATI RAO, N.D. & CHARY, P. *In vitro* response of select regions of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) as elucidated by biochemical and molecular variations. **Current Science**, v. 91, p. 770–776, 2006.
- KUNDU, S.K. The mating system and genetic significance of polycarpy in the neem tree (*Azadirachta indica*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, p. 1216–1220, 1999.
- LLOYD, G. & MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421–427, 1981.
- OHYAMA, K. & NITSCH, J.P. Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves. **Plant Cell Physiology**, v. 13, p. 229–236, 1972.
- PRAKASH, G.; BHOJWANI, S. & SRIVASTAVA, A. Production of azadirachtin from plant tissue culture: state of the art and future prospects. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, p. 185–193, 2002.
- PRAKASH, G. & SRIVASTAVA, A.K. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3795–3800, 2005.

PRAKASH, G. & SRIVASTAVA, A.K. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 218–226, 2008.

RAVAL, K.N.; HELLWIG, S.; PRAKASH, G.; RAMOS-PLASENCIA, A.; SRIVASTAVA, A. & BIICHS, J. Necessity of a two-stage process for the production of azadirachtin-related limonoids in suspension cultures of *Azadirachta indica*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 16–22, 2003.

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.

SATDIVE, R.K.; FULZELE, D.P. & EAPEN, S. Enhanced production of azadirachtin by hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss by elicitation and media optimization. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 281–289, 2007.

SAVITHA, B.C.; TIMMARAJU, R.; BHAGYA LAKSAMI, N. & RAVISHANKAR, G.A. Different biotic and abiotic elicitors influence betalin production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake flask and bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 50–60, 2006.

SCHAAF, O. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from neem (*Azadirachta indica*) by high performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 89–97, 2000.

SUJANYA, S; DEVI, P.B. & SAI, I. In vitro production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. Indian Academy of Sciences. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 113–120, 2008.

SUNDARAM M.S. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health. Part B. Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 31, p. 913–948, 1996.

THENGANE, S.; JOSHI, M. & MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in neem (*Azadirachta indica*). In: JAIN, S.M., GUPTA, P., NEWTON, R. (Eds.) **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. vol II, Important Selected Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 357–374, 1995.

WHITE, P. R. **The cultivation of animal and plant cells**, 2<sup>nd</sup> ed. Ronald Press, New York, p. 109–112, 1963.

ZID, S.A. & ORIHARA, Y. Polyacetylenes accumulations in *Ambrosia maritime* hairy roots and cell cultures after elicitation with methyl jasmonate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 65–75, 2005.

## CONCLUSÕES GERAIS

Para propagação *in vitro* de nim a partir de segmentos nodais, recomenda-se a coleta de explantes de plantas jovens, cultivá-los em meio MS, suplementado com (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0,5 mg L<sup>-1</sup>, KIN, 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA) em frascos com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios de 10 mm, cobertos com membrana fluoroporo hidrofóbica de 0,22 µm de poro. Na fase de aclimatização, o uso de fibra de côco e compostagem de casca de eucalipto como substrato na proporção (1:1).

No entanto, tais plantas apresentam alterações significativas na diferenciação dos tecidos e nas estruturas morfológicas foliares, quando comparado com plantas cultivadas em casa de vegetação. Porém, há produção de lipídios gerais, óleo essencial e taninos nos três ambientes avaliados, *in vivo*, aclimatizado e *in vitro*. Não foi evidenciada a secreção de mucilagem nos três ambientes, existindo uma relação indireta dos testes Sudan Black e Nadi, quanto à presença de AZA nas folhas de nim.

As maiores concentrações de azadiractina foram produzidas na primeira e segunda semanas de cultivo, com média de 0,2470 µg g<sup>-1</sup>, quando a massa celular foi cultivada em meio de cultura com adição de 2 % de glicose + 500 mg L<sup>-1</sup> de CH + 100 µm de MeJ.

Calos cotiledonares apresentaram alta capacidade de propagação pelas duas vias regenerativas, organogênese e embriogênese somática, a partir do quarto subcultivo, quando submetido em meio WPM com adição de 2 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,25 mg L<sup>-1</sup> ANA. Existindo uma relação tripla quanto à taxa de morfogênese (brotação e germinação de embriões somáticos), textura e coloração dos calos.