

EIXO TEMÁTICO: Valoração e economia ambiental

ISOLAMENTO DE PROTOPLASTO DE *Handroanthus impetiginosus* (MART.ex.DC. MATUS) A PARTIR DE CALOS OBTIDOS *IN VITRO*

Tamires Luana Silva¹

Breno Régis Santos²

Resumo

Hibridização somática é uma técnica utilizada para modificação genética através da inserção de organelas ou cromossomos em células através da fusão de protoplastos.

Devido ao elevado potencial medicinal e industrial, dos metabólitos e madeira da *Handroanthus impetiginosus*, o presente trabalho teve por objetivo testar um protocolo de estabelecimento de cultura de protoplastos isolados à partir de calos, afim de ter conhecimento para futura hibridização. Através do procedimento testado foi possível obter protoplastos isolados de *Handroanthus impetiginosus* e multiplicá-los *in vitro*.

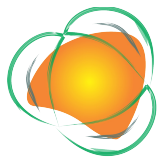
Palavras Chave: Hibridização; protoplasto; calos; cultivo; *Handroanthus*.

INTRODUÇÃO

Devido a fatores que impedem aumento da produtividade da cultura de vegetais, como a susceptibilidade de algumas plantas a diversas doenças, pragas e anormalidades fisiológicas (FUNDECITROS, 1999), novas formas de melhoramento genético tornaram-se necessárias para o desenvolvimento da agricultura e menor dependência de agentes químicos nas lavouras, diminuindo os impactos ambientais causados por esses agentes, além de diminuição de malefícios à saúde humana, como aumento do risco de desenvolvimento de câncer (SCHLINDWEIN,2005).

Uma técnica de melhoramento genético que vem começando a ser utilizada atualmente é a hibridização somática. Segundo Matsumoto (2001), hibridação somática é uma técnica que tem como fundamento a fusão celular, que possibilita obtenção híbridos sem necessidade de reprodução sexual. Por esse método, é possível inserir cromossomos ou organelas que possuem material genético de uma espécie para outra, a ser melhorada, o que torna possível a transferência de caracteres poligênicos sem ter

¹Graduanda do curso de Biotecnologia na Universidade Federal de Alfenas – tamesilva@hotmail.com
Prof. UNIFAL-MG – Campus Sede (Alfenas) - brenors@yahoo.com.br



conhecimentos detalhados de genes, no entanto, as células vegetais, na forma natural, não se fundem, devido a parede celular. Esta parede celular formada por celuloses e pectinas (principalmente), ligninas e outras substâncias de menor quantidade, tem a função de proteção mecânica e rigidez. Sendo assim, a primeira etapa para a hibridação somática é obtenção de células sem parede celular. A célula desprovida de parede celular é capaz de manter atividades vitais completas e denomina-se protoplasto. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi testar um protocolo de isolamento de protoplastos a partir de tecido de células não diferenciadas de *Handroanthus impetiginosus* e analisar o desenvolvimento *in vitro* pós- isolamento.

METODOLOGIA

Sementes de ipê roxo foram desinfestadas e inoculadas em meio de cultivo WPM com ágar 7g/l, sem sacarose. Após brotamento e desenvolvimento do vegetal, explantes caulinares foram inoculados em meio de cultivo WPM com adição de regulador de crescimento 2-4,D 400 $\mu\text{mol/L}$ para formação de calos que foram repicados e quando atingiram massa em torno de 500 mg, foram inseridos em solução enzimática de celulase e pectinase em manitol; partidos cuidadosamente para maior superfície de contato entre a solução e o tecido, envolvidos com papel alumínio e colocadas em sistema de agitação contínuo. Transcorridas 24h, a solução foi filtrada e submetida à centrifugação. Os *pellets* foram ressuspensos em manitol 0,7M e inoculados em meio de cultivo WPM líquido, novamente envolvidos por papel alumínio para impossibilitar a passagem de luz. Realizou-se coloração vital com corante azul de Evans e o desenvolvimento das células foi analisado através de contagem do número de células em câmara de Neubauer durante sete dias. Todos os procedimentos foram executados em temperatura ambiente (MATSUMOTO, 2006 – adaptado).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da metodologia testada foi possível isolar protoplastos viáveis de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) a partir de células não diferenciadas (calo vegetal). A viabilidade foi evidenciada pela não coloração das células na presença corante, demonstrando a não ruptura da membrana plasmática; observada em microscópio óptico comum. Também foi possível realizar o cultivo *in vitro* dos protoplastos isolados, e após contagem em câmara de Neubauer de alíquotas diluídas, foi possível constatar um crescimento exponencial durante o terceiro e o quarto dia, juntamente com um decréscimo de crescimento celular após o quarto dia de cultivo entende-se que é necessário realizar subcultivos entre o terceiro e o quarto dia posteriores a inoculação de células em suspensão celular, também foi observado formação de agregados celulares, que segundo VILELA et al. (2002), se formam devido a multiplicação das células por meio de mitoses e a migração facilitada pela agitação constante do frasco com suspensão das células em suspensão. Estes agregados aumentam de volume com o aumento de número de células presentes no meio de cultivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, é possível constatar que o protocolo testado é eficaz para isolamento de protoplasto de ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*), além disso, não altera a viabilidade celular; logo as células obtidas poderão ser estudadas em outros experimentos após este procedimento.

REFERÊNCIAS

Fundecitrus. <http://www.fundecitrus.com.br>. (15 abril 1999)

MATSUMOTO, Kasumitsu. **Cultura de células em suspensão:** focalizando bananeira, Brasília; EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 24p. (Boletim de Pesquisa, 126)
Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2022519/bpd126.pdf/7145f4f2-2fc6-46b6-af1e-7a68e671b2d8>> acesso em : 2 ago. 2017

MATSUMOTO, Kazumitsu. Híbridos Somáticos: Fusão celular para a obtenção de híbridos interespecies de banana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento: Cultura de tecidos**, v. 20, n. 2, p.26-28, maio/ 2001. Disponível em:
<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio20/20_5.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2017.

SCHLINDWEIN, Marcelo Nivert. Problemas ambientais relacionados aos estrogênios miméticos: perda de fertilidade, câncer e outros riscos a saúde humana como resultado dos produtos da sociedade de consumo. **Revista UNIARA**, Araraquara-SP, v. 9, n. 16, p.171-180, 2005. Disponível em:
<<http://www.revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/294/247>>. Acesso em: 02 ago. 2017

VILELA, Marcelo José et al. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro da Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, p. 67-72. 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v39n1/v39n1a12.pdf>> Acesso em: 02 ago 2017