

UTILIZAÇÃO DE NUTRIENTES POR CÉLULAS DE ALGODOEIRO CULTIVADAS EM SUSPENSÃO¹

Paola Alejandra Fiorani Celedón^{2,4}; Adilson Kenji Kobayashi³; Luiz Gonzaga Esteves Vieira^{3*}

²Pós-Graduada do Depto. de Genética - UEL.

³Lab. de Biotecnologia Vegetal - IAPAR - C.P. 481, CEP: 86001-970 - Londrina, PR.

⁴Bolsista CAPES.

*Autor correspondente <lvieira@pr.gov.br>

RESUMO: Com o objetivo de conhecer os requerimentos nutricionais de suspensões celulares de algodoeiro foi feita uma análise da utilização de nutrientes no intervalo de 30 dias, normalmente utilizado entre subculturas. As culturas de células em suspensão de algodoeiro, genótipo 101-102B, foram estabelecidas e subcultivadas mensalmente em meio líquido. Foram analisadas o crescimento das culturas, as variações de pH do meio de cultura e a absorção de nutrientes. A matéria fresca das culturas de células foi superior a 6 vezes o valor inicial após 30 dias de cultivo. Houve aumento do pH no início da cultura, estabilizando-se em 6,2 próximo à fase estacionária. Durante o crescimento das suspensões, as células consumiram pelo menos 80% da concentração inicial da maioria dos nutrientes quantificados. A velocidade de absorção, entretanto, variou entre os elementos. Enquanto PO_4^{3-} foi praticamente esgotado do meio após 10 dias de cultivo, os íons K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} e Mg^{2+} foram encontrados em concentrações próximas a 20% do valor inicial após 30 dias. As suspensões de células de algodoeiro consumiram 89% da concentração inicial de glicose.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, cultura de tecido, macronutriente, micronutriente

NUTRIENT UTILIZATION BY COTTON CELL SUSPENSION CULTURES

ABSTRACT: The nutrient uptake of cotton suspension cultures was studied during a 30 day-culture period. Cotton cell suspension cultures of the 101-102B genotype were established and monthly subcultured in liquid medium. Culture growth rate, nutrient uptake and pH variations in the medium were measured. A 6-fold increase in fresh weight of the cotton cell culture was observed on day 30. The majority of the nutrients were taken up at a high rate, and their consumption was at least 80% of the original concentration. Nevertheless, the uptake rate varied among the elements. While PO_4^{3-} was practically depleted from the medium on day 10, the ions such as K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} and Mg^{2+} had a 20% residual at the end of the period. The pH of the culture medium increased initially and stabilized at pH 6.2 at the beginning of the stationary phase. In addition, the cotton cell suspension culture took up 89% of glucose added to the medium.

Key words: *Gossypium hirsutum*, tissue culture, macronutrient, micronutrient

INTRODUÇÃO

O estabelecimento de culturas de células vegetais em suspensão, sob contínua agitação em meio de cultivo líquido, é um processo difícil, mesmo quando a espécie/genótipo em questão consegue adaptar-se à essa forma de cultivo. Populações de células homogêneas com rápida multiplicação são bastante úteis para estudos de processos fisiológicos em plantas. Culturas de células em suspensão são utilizadas, principalmente, para o isolamento de protoplastos, embriogênese somática, produção de metabólitos secundários e estudos básicos de metabolismo. As culturas líquidas apresentam ainda a vantagem de não sofrerem a influência da composição química de substâncias solidificantes, o que resulta em culturas mais uniformes. Também, a agitação necessária às culturas líquidas elimina a formação de gradientes físicos e químicos, permitindo sua maior disponibilidade para a otimização do crescimento.

O uso da cultura de células vegetais em suspensão oferece, portanto, um sistema homogêneo para o estudo de respostas de células vegetais a estresses físicos ou químicos. O uso destes sistemas é fundamental pois a resposta a diferentes estímulos *in planta* mostra-se complexa e de difícil interpretação devido à diferenciação celular e interação entre tecidos, dificultando a compreensão dos mecanismos que interagem nesses sistemas. Além de reguladores de crescimento, os meios de cultivo devem suprir uma concentração de nutrientes para se obter um crescimento adequado e uma correta expressão do metabolismo primário e secundário nas culturas *in vitro*.

A deficiência nutricional pode ser apontada como uma das causas das anomalias genéticas que resultam em variação somaclonal (McCoy et al., 1982). A variação somaclonal é indesejável quando se necessita de culturas uniformes para estudos de metabolismo.

As práticas atuais de cultivo *in vitro* de células em suspensão de algodoeiro consistem apenas em subcultivar

¹Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentada à UEL - Londrina, PR.

mensalmente, ou em intervalos maiores, quando a proliferação e o crescimento diminuem, possivelmente por esgotamento de nutrientes.

O presente estudo teve como objetivo estudar a absorção de nutrientes em suspensões celulares de algodoeiro, visando ajustes no meio de cultura que proporcionem maior crescimento das suspensões e a sua manutenção em subculturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes de algodoeiro do genótipo 101-102B foram deslindadas em ácido sulfúrico concentrado por 30 s, com agitação manual. As sementes foram então lavadas com água corrente e secas. Para a descontaminação superficial, as sementes deslindadas foram imersas em solução comercial de hipoclorito de sódio 2%, durante 30 min, e em seguida lavadas com água destilada esterilizada.

Indução e cultura de calos

Dez sementes foram distribuídas em placas de Petri (15 x 2 cm) contendo 50 mL de meio de cultura, composto de macro e micronutrientes do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 20 g L⁻¹ e 3 g L⁻¹ de Phytigel™, e mantidas no escuro a 28°C para germinação. Sete dias após a emergência da radícula, segmentos de hipocótilos foram utilizados como explantes para a produção de calos.

Para o desenvolvimento dos calos, foi utilizado o meio de indução de Cousins et al. (1991). O pH foi ajustado a 5,8 e 60 mL de meio foram distribuídos em frascos de vidro de 100 mL, os quais foram fechados com tampa de polipropileno e autoclavados a 120°C durante 15 min. Segmentos de hipocótilos, com cerca de 1 cm, foram inoculados neste meio e os frascos incubados em câmara de cultivo a 28°C ± 2, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 63 µmol m⁻² s⁻¹. Após quatro semanas, os explantes formaram calos de 3-4 cm de diâmetro, bastante friáveis e com coloração esverdeada, que foram usados para o estabelecimento das suspensões celulares.

Estabelecimento inicial das culturas de células em suspensão

Para iniciação e manutenção das culturas de células em suspensão, foram utilizados os macro e micronutrientes do meio MS, acrescidos de 0,5 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,5 mg L⁻¹ de piridoxina, 0,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 60 g L⁻¹ de glicose e 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Após ajuste do pH (5,5), o meio foi esterilizado através de filtro Millipore™ (0,22 µm).

O estabelecimento das culturas de células em suspensão foi feito como descrito por Kobayashi & Vieira (no prelo). Os calos foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL e parcialmente cobertos com meio de cultura (10-15 mL). As culturas foram mantidas em estado estacionário,

a 28°C ± 2 e fotoperíodo de 16 h (63 µmol m⁻² s⁻¹) por 1 semana. Uma alíquota do meio, contendo células isoladas e pequenos agregados celulares, foi transferida para um novo erlenmeyer de 250 mL com 15 mL de meio líquido e mantida em agitador orbital a 100 rpm, sob as mesmas condições de luz e temperatura. À medida que havia um aumento visível da densidade celular, meio líquido era adicionado para completar 100 mL.

Amostragem

Suspensões celulares provenientes de 3 erlenmeyers foram unidas em um frasco de 500 mL e mantidas no agitador (100 rpm) por cinco dias para uniformização da cultura padrão.

Para o experimento, foram cultivadas 1250 mg de células em 25 mL de meio de cultura em erlenmeyers de 125 mL, vedados com folha dupla de papel alumínio coberto com filme de PVC. As culturas foram mantidas em estado estacionário, sob as condições de luz e temperatura descritas. Após quatro dias, foram transferidas para agitador orbital (100 rpm). Amostragens foram realizadas em intervalos de cinco dias, durante um período de 30 dias. O experimento foi repetido quatro vezes.

Análise dos nutrientes

A matéria fresca de células dos frascos de cultura foi determinada através de filtragem em papel de filtro, com ajuda de vácuo.

O pH do meio de cultura foi determinado logo após a filtragem das células. As concentrações dos macronutrientes PO₄³⁻, Ca²⁺, SO₄²⁻, Mg²⁺ e K⁺ e dos micronutrientes Fe²⁺ e Zn²⁺ foram determinadas em espectrofotômetro de emissão de plasma (Thermo Jarrell Ash, ICAP 61E), em alíquotas de 1 mL do meio de cultura filtrado. A análise de consumo de potássio foi feita em fotômetro de chama, com alíquotas de 0,5 mL do meio filtrado. O consumo de NH₄⁺ foi determinado com o método colorimétrico de Darrel (1983). O consumo de NO₃⁻ foi quantificado por espectrofotometria (Miyazawa et al., 1992). Diluições do meio de cultura foram necessárias para as análises dos elementos, e variaram entre os métodos e/ou entre os dias de cultivo, analisados por um mesmo método.

Para determinação do consumo de glicose foi utilizado método enzimático (kit para D-glicose, Boehringer Mannheim). Antes da reação enzimática, as amostras foram desproteinizadas, segundo recomendações do fabricante.

As curvas de crescimento das suspensões celulares foram construídas com os dados de matéria fresca coletados durante os 30 dias de cultivo das suspensões. Os pontos foram ajustados por meio de uma função logística (Zullo & Arruda, 1986). Para a análise de consumo de cada nutriente, foi utilizada a média de quatro repetições para cada ponto de coleta, exceto glicose, para a qual três pontos foram determinados para cada dia de coleta.

RESULTADOS

A manutenção de calos ou culturas de células em suspensão em meio líquido sem agitação nos primeiros dias após as subculturas foi essencial para obter suspensões compostas de células individuais ou de pequenos agregados celulares. Calos e células em suspensão submetidas à agitação, logo após transferência para meio líquido, tornaram-se escuros e morreram. As culturas eram constituídas de células relativamente homogêneas e de rápido crescimento, de aspecto denso e com poucos aglomerados celulares, consistindo principalmente de células livres.

Crescimento celular

Os dados de matéria fresca foram utilizados para a construção de uma curva de crescimento em função do tempo de cultivo (Figura 1). Embora a curva obtida assemelhe-se ao modelo de curva observado em suspensões de células vegetais (Stepan-Sarkissian & Grey, 1990), a fase lag foi praticamente inexistente. Isto deveu-se à metodologia utilizada para a uniformização da cultura padrão, pois as culturas já encontravam-se em crescimento exponencial quando da sua utilização. Em torno do 25º dia, observou-se a desaceleração do crescimento celular e início da fase estacionária. A matéria fresca aumentou cerca de 6 vezes em relação à quantidade de inóculo inicial.

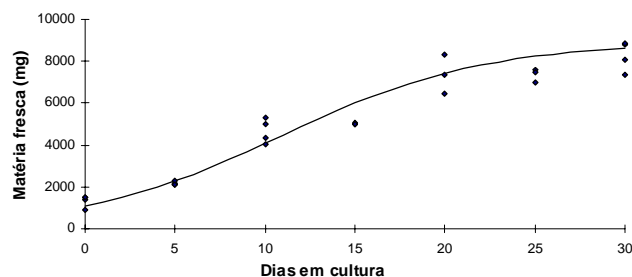


Figura 1 - Curva de crescimento de cultura de células em suspensão de algodoeiro (genótipo 101-102B).

pH

O pH permaneceu constante em 5,4 durante os cinco primeiros dias do cultivo. Aos dez dias, notou-se o primeiro aumento para 5,8 e, aos 20 dias alcançou seu máximo, estabilizando-se em 6,2 até o fim dos experimentos (Figura 2). As maiores alterações de pH deram-se durante a fase exponencial do crescimento da cultura. Este período de cultivo é também relacionado ao período de maior consumo de nutrientes.

Absorção de nutrientes

As culturas celulares da variedade 101-102B mostraram-se exigentes quanto ao nível de nutrientes necessários para o seu crescimento, que se deu de forma

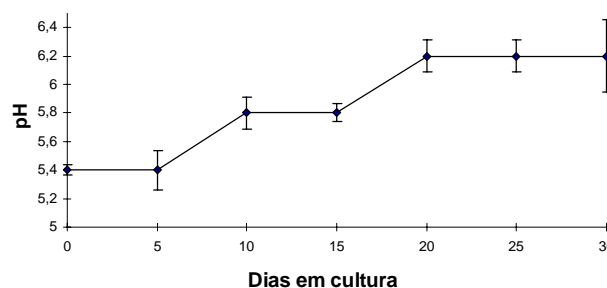


Figura 2 - Variação de pH do meio de cultura em função do tempo. Barras representam o desvio padrão das médias.

diferenciada durante o crescimento (Figuras 3-5). Esta variação é refletida pelas diferentes porcentagens de absorção durante determinadas fases do crescimento e/ou durante o tempo total de cultivo.

As duas formas de nitrogênio, NH_4^+ e NO_3^- , fornecidas simultaneamente às culturas, foram consumidas durante os 30 dias de cultivo (Figura 3). As células de algodoeiro apresentaram uma certa preferência pela forma amoniacal nos períodos do dia 0 a 10 e do dia 25 a 30. Nestes períodos, a diferença na absorção foi aproximadamente 1,5 vezes maior para NH_4^+ . Também o consumo total de NH_4^+ foi um pouco maior do que o de NO_3^- , 97% e 90% respectivamente da Concentração Inicial no Meio de Cultura (CI). Nos últimos cinco dias de análise, foi detectado o menor consumo de NO_3^- pelas culturas (9% da CI), enquanto para NH_4^+ , a absorção continuou a ser alta, mantendo-se em 15% da CI (TABELA 1).

O fósforo apresentou uma curva de absorção diferente dos demais nutrientes e foi consumido com uma velocidade bastante acentuada nas culturas de algodoeiro (Figura 3). Em 10 dias, 92% da CI do elemento já havia sido consumido. O nível residual de PO_4^{3-} encontrado após 30 dias de cultivo foi 3% da sua CI (TABELA 1). Apesar deste íon ter sido praticamente esgotado durante a fase exponencial do crescimento, não se observou nenhum tipo de inibição da multiplicação celular nesse mesmo período.

A absorção de K^+ ocorreu durante todo o período de multiplicação celular, diminuindo um pouco antes da desaceleração do crescimento da cultura (Figura 3). Do dia 5 ao 15, o consumo foi de 43% da CI, e do dia 15 ao 25 este valor foi reduzido para 21%, ou seja, houve uma diferença de mais de 50% no requerimento da cultura entre estes dois períodos (TABELA 1). No último período de cinco dias, a absorção de K^+ foi apenas 3% da CI. Também foi o íon que mostrou o menor consumo total durante o crescimento celular. O valor residual deste nutriente no 30º dia foi o mais alto dentre os elementos analisados, ficando em torno de 21% da sua CI.

O início do cultivo (dia 0 a 5) foi a fase de maior requerimento de cálcio, quando 23% de sua concentração inicial foi consumido pelas células (TABELA 1). Como para a maioria dos nutrientes analisados, houve nítida redução da absorção deste macroelemento em torno do 25º dia

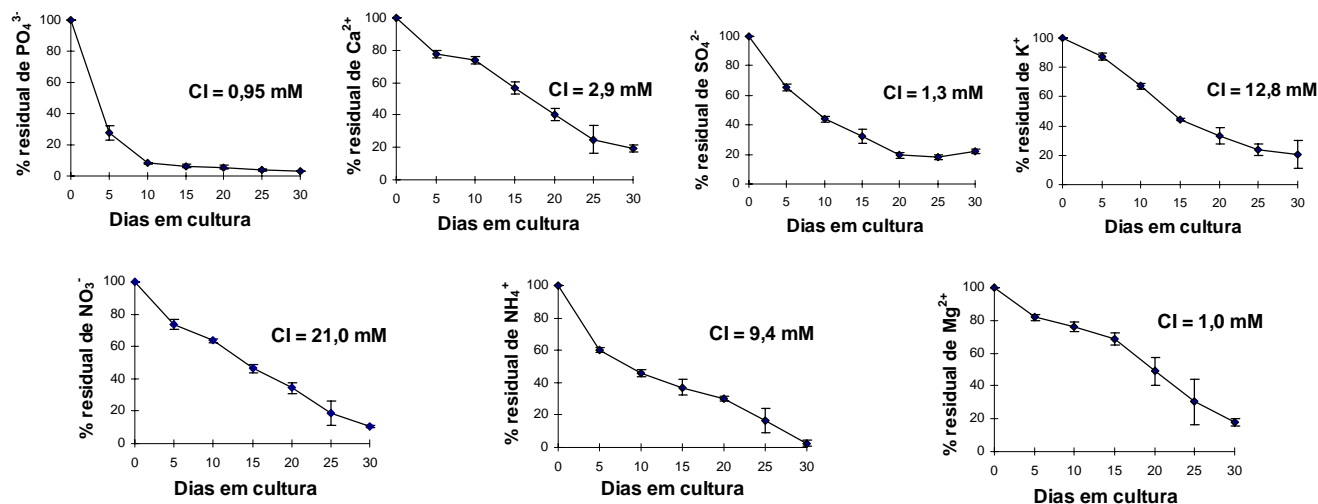


Figura 3 - Utilização de PO₄³⁻, Ca²⁺, SO₄²⁻, K⁺, NO₃⁻, NH₄⁺ e Mg²⁺ em cultura de células de algodoeiro, em relação à concentração inicial do elemento no meio de cultura (CI), durante 30 dias. Barras representam o desvio padrão das médias.

(Figura 3), sendo que o valor residual encontrado no meio de cultura foi 19% do total.

Foi observado um grande consumo de SO₄²⁻ pela cultura de algodoeiro durante os 5 dias iniciais da cultura (35%). Durante o crescimento exponencial, aproximadamente 81% do íon foi utilizado, e já no 20º dia, quando restavam 19% de SO₄²⁻ no meio, não mais se observou a sua absorção pelas células (Figura 3). Somente 1% da concentração total foi consumido após o dia 20 (TABELA 1).

A taxa de consumo de Mg²⁺ variou durante o crescimento celular (Figura 3). Os primeiros cinco dias apresentaram 18% de absorção. Após o dia 25, o requerimento de Mg²⁺ foi reduzido, sendo que aproximadamente 12% da concentração disponível no dia 0 foi absorvido. O valor residual deste íon encontrado no meio de cultura foi de 18% do inicial (TABELA 1).

TABELA 1 - Consumo de nutrientes em culturas de células em suspensão do genótipo 101-102B de algodoeiro, durante 30 dias*.

	Dias em cultura						
	0	5	10	15	20	25	30
NH ₄ ⁺	0	40	54	63	70	83	97
NO ₃ ⁻	0	26	36	54	66	81	90
PO ₄ ³⁻	0	72	92	94	94	96	97
K ⁺	0	13	33	56	67	76	79
Ca ²⁺	0	23	26	43	60	75	81
SO ₄ ²⁻	0	35	56	68	81	82	82
Mg ²⁺	0	18	24	31	51	70	82
Fe ²⁺	0	9	28	50	72	80	91
Zn ²⁺	0	20	41	62	78	95	98
Glicose	0	25	35	38	49	62	89

*Resultados expressos em porcentagens da concentração inicial no meio de cultura.

Para o Fe²⁺, observou-se pequena absorção nos primeiros cinco dias do cultivo (9% de sua CI). Nos 15 dias subsequentes onde o consumo foi bastante constante e ficou entre 19 e 22% do disponível no dia 0 (Figura 4). Durante a desaceleração do crescimento, a queda no requerimento de Fe²⁺ foi nítida e atingiu 8 e 11% da CI nos dois últimos períodos analisados (dias 20 a 25 e dias 25 a 30, respectivamente).

O outro micronutriente analisado, Zn²⁺, foi utilizado de maneira mais uniforme durante o cultivo (Figura 4). Durante a fase estacionária da cultura, o consumo deste elemento foi de aproximadamente 3% do valor inicial. O valor residual de Zn²⁺ foi um dos mais baixos em comparação com os outros íons, aproximadamente 2% do disponível no dia 0 (TABELA 1).

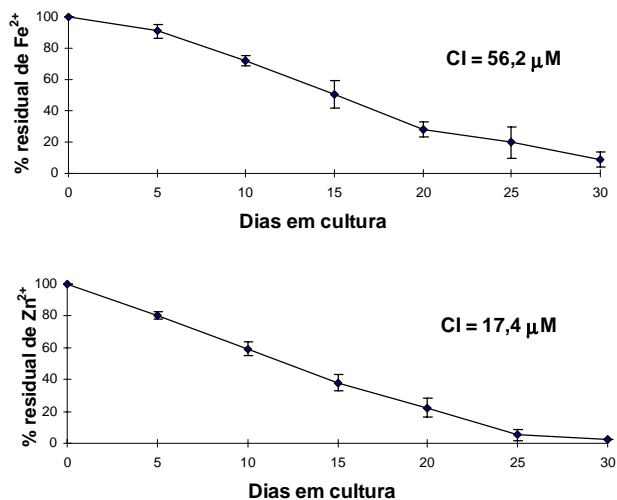


Figura 4 - Utilização de Fe²⁺ e Zn²⁺ em cultura de células em suspensão de algodoeiro, em relação à concentração inicial no meio de cultura (CI), durante 30 dias. Barras representam o desvio padrão das médias.

Durante os primeiros e os últimos cinco dias de crescimento celular, a cultura de células em suspensão de algodoeiro apresentou um consumo elevado de glicose, de 25 e 26% respectivamente da CI (Figura 5). Do dia 5 ao 25, as análises mostraram que a absorção variou pouco, permanecendo entre 10 e 13%. Entretanto, durante o período dos dias 10 a 15, as células de algodoeiro consumiram apenas 3% da CI de glicose. O valor residual de glicose encontrado foi de 11% do disponível à cultura no dia 0.

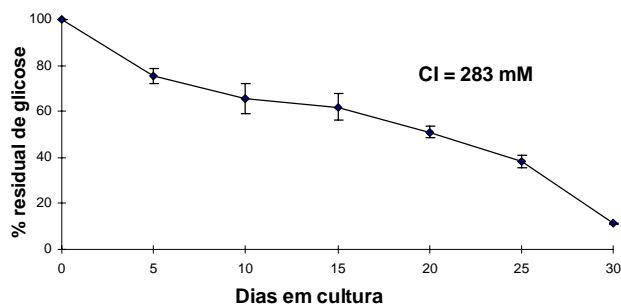


Figura 5 - Utilização de glicose em cultura de células em suspensão de algodoeiro, em relação à concentração inicial no meio de cultura (CI), durante 30 dias. Barras representam o desvio padrão das médias.

DISCUSSÃO

As suspensões celulares de algodoeiro, mostraram-se bastante sensíveis aos procedimentos de subcultura. Durante o cultivo, um período de 3 dias sem agitação logo após a inoculação em meio fresco, mostrou-se necessário para a adaptação das células. As culturas de calos em meio líquido também foram mantidas em estado estacionário até serem retiradas as alíquotas para o estabelecimento das suspensões celulares. Este procedimento diminuiu o estresse das células causado pela manipulação. A agitação das células logo após a sua subcultura em meio fresco resultou em total oxidação e morte das células.

As culturas apresentaram, durante todo o período de crescimento, uma forte coloração esverdeada. A formação de clorofila em suspensões celulares pode ser inibida pelo excesso de carboidratos e de 2,4-D no meio de cultura. Entretanto, as suspensões celulares de algodoeiro, apesar de cultivadas na presença de 2,4-D e de alta concentração de glicose, não apresentaram diminuição do teor de clorofila, mostrando um comportamento semelhante às culturas de *Peganum harmala* e *Marchandia polymorpha* (Wolfgang, 1985).

Os meios utilizados para o cultivo de tecidos vegetais têm uma relativa baixa capacidade de tamponamento. Tentativas de manter os valores de pH artificialmente fixos não resultam em bom desenvolvimento das culturas (Leifert et al., 1995). As culturas de células em suspensão utilizadas neste trabalho apresentaram alterações de pH (Figura 2). As maiores variações

ocorreram durante o período de grande crescimento e isto pode ser um reflexo do forte consumo de nutrientes e das trocas iônicas que ocorreram nesta fase.

Leifert et al. (1992) demonstraram que os valores de pH do meio de cultura *in vitro* de tecidos e células vegetais podem variar de 3,7 até 6,2, de acordo com a espécie cultivada, independentemente do pH inicial. Estes valores estão em acordo com as observações feitas para a variedade 101-102B de algodoeiro.

Ambos os íons nitrogenados presentes no meio de cultura (NH_4^+ e NO_3^-) apresentaram uma absorção elevada, considerando os baixos valores residuais alcançados no 30º dia de cultivo das suspensões celulares (Figura 3). Somente uma pequena preferência por amônia pelas células de algodoeiro foi observada durante o início (dias 0 a 5) e o fim (dias 25 a 30) do cultivo.

Sabe-se que após ser absorvido pelas células, o NO_3^- deve ser reduzido a NH_4^+ antes de ser incorporado a compostos orgânicos. Enquanto no 25º dia as porcentagens residuais de NH_4^+ e NO_3^- foram semelhantes, 17 e 19%, respectivamente, de suas concentrações iniciais, a absorção de NH_4^+ após este período foi maior (Figura 3). É possível que a preferência da cultura pela forma amoniacal durante a fase estacionária seja um mecanismo de adaptação da célula para economizar energia. Também a menor absorção de nitrato poderia ser uma consequência da menor taxa de divisão celular e síntese protéica que ocorre na fase estacionária.

A preferência por uma destas formas de nitrogênio e a importância da relação $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ têm sido relatadas como genótipo-dependente (Leifert et al., 1995). Portanto, outras variedades de algodoeiro podem apresentar um requerimento diferenciado para nitrogênio.

Enquanto o nitrogênio foi absorvido durante os 30 dias, o padrão de absorção de PO_4^{3-} mostrou-se completamente diferente. Este último íon apresentou absorção mais rápida do que os demais íons analisados, e atingiu 8% da sua CI em apenas 10 dias (Figura 3). O rápido esgotamento do PO_4^{3-} do meio, antes dos outros íons, também foi observado em culturas de várias outras espécies (Leifert et al., 1995). Apesar do PO_4^{3-} ter sido quase que esgotado durante o início da fase exponencial de crescimento das suspensões celulares, não se observou nenhum tipo de inibição da multiplicação celular que pudesse ser atribuída ao grande consumo deste nutriente.

Baseado em trabalhos com culturas celulares de *Catharanthus roseus*, Van Gulik et al. (1993) verificaram a existência de um mecanismo de absorção e armazenamento intracelular de fósforo. Os autores postularam que as células desenvolvem mecanismos de rápida absorção e armazenamento para garantir o crescimento celular durante longos períodos. Também, trabalhando com culturas de *C. roseus*, Sakano et al. (1995) observaram que altos níveis de PO_4^{3-} no meio levam a um excessivo acúmulo intracelular deste elemento, causando toxicidade e reprimindo o crescimento das

células em suspensão. Estes efeitos eram pronunciados quando as células eram cultivadas com uma baixa densidade inicial. Isto foi atribuído à falta de um sistema de controle do tipo "feedback" pelas células para impedir o acúmulo de PO_4^{3-} em níveis tóxicos.

Como esperado, o requerimento de K^+ mostrou-se maior durante o crescimento exponencial, quando há alta atividade celular. As culturas de algodoeiro mostraram bom crescimento com 12,8 mM de concentração inicial de K^+ (Figura 3). Akins & Vasil (1985) observaram que suspensões celulares de cenoura crescem bem com apenas 1mM de K^+ . Portanto, o alto valor residual de K^+ (21%) obtido em nossas condições pode indicar que a concentração inicial deste íon no meio está acima do requerido pelas culturas de células de algodoeiro.

O cálcio apresentou uma intensidade de absorção elevada durante toda a fase exponencial, uma vez que sua função na célula liga-se, principalmente, aos processos de divisão celular e de transporte de membrana. O nível residual de Ca^{2+} no fim do cultivo foi dos mais altos (19% da CI), ficando abaixo apenas do K^+ (21% da CI). Mezzetti et al. (1991), utilizando brotos de *Actinidia deliciosa*, observaram que o nível residual de Ca^{2+} foi o mais alto dentre os macronutrientes após 60 dias de cultivo.

Durante a fase de rápido crescimento, as cultura celulares mostraram-se mais exigentes quanto ao requerimento de enxofre, enquanto na fase estacionária não houve praticamente absorção do elemento. Segundo Marschner (1986), as concentrações de enxofre no meio podem aumentar durante a fase estacionária em função da maior relação absorção de água : consumo de SO_4^{2-} durante a fase estacionária em comparação à fase exponencial. Assim, estas observações parecem estar em acordo com os dados obtidos com células de algodoeiro, nas quais um pequeno aumento da concentração de SO_4^{2-} foi observado no meio de cultura no 30º dia em relação ao 25º.

Magnésio foi absorvido do meio durante todo o decorrer do período de cultura. Sabe-se que a absorção de Mg^{2+} pode competir com a de outros cátions, como Ca^{2+} , NH_4^+ ou K^+ , em baixo pH. Não foi observada uma relação de competição entre a absorção de Mg^{2+} e NH_4^+ ou Mg^{2+} e Ca^{2+} nas culturas de algodoeiro, uma vez que os períodos de maior consumo destes íons foram coincidentes. Um aumento na taxa de absorção de Mg^{2+} somente foi observado quando o pH ultrapassou 5,8. O aumento na taxa de absorção de Mg^{2+} com o aumento do pH do meio foi também relatado por Shinga et al. (1987).

Os dois micronutrientes analisados, Fe^{2+} e Zn^{2+} , apresentaram curvas de utilização semelhantes, sendo que a maior diferença entre o consumo destes elementos foi observada cinco dias finais do cultivo (TABELA 1).

A glicose, escolhida como fonte de carboidrato para o cultivo das suspensões celulares de algodoeiro, é preferida por várias espécies de dicotiledôneas cultivadas *in vitro*, mesmo quando outras fontes de carboidrato são

simultaneamente fornecidas (Schmitz & Lörtz, 1990). A intensidade de absorção de glicose foi alta nos cinco primeiros dias do cultivo, apontando a necessidade energética das células para rápido crescimento (Figura 5). Da mesma forma, o consumo foi alto nos cinco últimos dias do cultivo, quando se iniciava a fase estacionária, demonstrando a necessidade de glicose pelas células em suspensão de algodoeiro também durante a manutenção do metabolismo básico. Portanto, a glicose não mostrou relação direta com a diminuição do crescimento das culturas, uma vez que sua absorção não foi interrompida quando da desaceleração do crescimento (TABELA 1).

Os estudos sobre os requerimentos nutricionais de plantas *in vitro* visam otimizar o crescimento das culturas, como também relacionar a taxa de crescimento com a absorção dos elementos do meio (Desamero et al., 1993). Neste trabalho, algumas relações entre crescimento e consumo de nutrientes em suspensões celulares de algodoeiro foram estudadas.

Para os íons cujo nível residual ao final do período de cultura de 30 dias foi muito baixo (PO_4^{3-} , Zn^{2+} e NH_4^+) é necessário verificar se o aumento das suas concentrações, em várias etapas do cultivo, poderia prolongar a fase exponencial de crescimento das suspensões, ou se tornariam tóxicos. Já para os nutrientes com menor consumo (Ca^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} e Mg^{2+}) seria razoável supor que meios de cultura com concentrações menores sejam suficientes para sustentar o crescimento celular.

Culturas de algodoeiro têm se mostrado recalcitrantes à regeneração. Quando obtida, os regenerantes mostram alta taxa de aberrações fenotípicas e citogenéticas (Stelly et al., 1989). A composição dos nutrientes do meio de cultura já foi apontado como uma das causas de instabilidade citogenética (McCoy et al., 1982). Assim, futuros trabalhos sobre requerimentos nutricionais em culturas de células de algodoeiro associados a análises citogenéticas, poderão contribuir com os protocolos de regeneração, essenciais aos trabalhos de transformação genética e melhoramento da espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mário Miyazawa e ao Sr. Décio C. Zocoler pelo auxílio na realização das análises laboratoriais. Ao Dr. Celso Jamil Marur, pelo auxílio com o programa de ajuste de equações. Ao CNPq e a CAPES, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINS, P.O.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. London: Academic Press, 1985. v.2, p.129-148.
- COUSINS, Y.L.; LYON, B.R.; LLEWELLYN, D.J. Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.481-494, 1991.

- DARREL, W.N. Determination of ammonium in KCl extracts of soils by the salicylate method. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.14, p.1051-1062, 1983.
- DESAMERO, N.V.; ADELBERG, J.W.; HALE, A.; YOUNG, R.E.; RHODES, B.B. Nutrient utilization in liquid/membrane system for watermelon micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, p.265-271, 1993.
- KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E. Establishment of an *in vitro* system for studies on the induced resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1999. /No prelo/
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; WAITES, W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.30, p.171-179, 1992.
- LEIFERT, C.; MURPHY, K.; LUMSDEN, P. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.83-109, 1995.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 340p.
- McCOY, T.J.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; high frequency of partial chromosome loss. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.24, p.37-50, 1982.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*: I. Growth and mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, p.91-98, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M. **Análise química de tecido vegetal**. Londrina: IAPAR, 1992. 12p. (Circular, 74)
- SAKANO, K.; MATSUMOTO, M.; YAZAKI, Y.; SEIICHIRO, K.; OKIHARA, K. Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture. **Plant Science**, v.107, p.117-124, 1995.
- SCHMITZ, U.; LÖRZ, H. Nutrient uptake in suspension cultures of gramineae: I. Development of an assay system. **Plant Science**, v.66, p.87-94, 1990.
- SHINGA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.11, p.209-220, 1987.
- STELLY, D.M.; ALTMAN, D.M.; KOHEL, R.J.; RANGAN, T.S.; COMMISKEY, E. Cytogenetic abnormalities of cotton somaclones from callus cultures. **Genome**, v.32, p.762-770, 1989.
- STEPAN-SARKISSIAN, G.; GREY, D. Growth determination and medium analysis. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. (Ed.) **Methods in Molecular biology: plant cell and tissue culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. v.6, p.13-28.
- VAN GULIK, W.M.; HOOPEN, H.J.G.; HEIJNEN, J.J.A. Structured model describing carbon and phosphate limited growth of *Catharanthus roseus* plant cell suspension in batch and chemostat culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.771-780, 1993.
- WOLFGANG, H. Photoautotrophic growth of cells in culture. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. London: Academic Press, 1985. v.2, p.213-252.
- ZULLO, J.R.; ARRUDA, F.B. **Programa computacional para ajuste de equações em dados experimentais**. Campinas: IAC, 1986. 23p. (Boletim Técnico, 113)

Recebido em 20.09.99