

PADRÃO DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS DE FOLHAS, ENTRENÓ E NÓ DE *CAPSICUM ANNUUM* VAR. *ANNUUM* CV. IBERABA JALAPEÑO

Carolina Augusto de Souza, UNIR.

Glaura Mugrabe de Oliveira Magalhães, UNIR.

Pricianny Souza, UNIR.

Eloísa Santana Paz, UNIR.

Mauricio Reginaldo Alves dos Santos, EMBRAPA-RO.

Resumo

O gênero *Capsicum* pertence à família botânica Solanaceae e é notável para a produção de metabólitos secundários de importância medicinal e econômica. Os métodos *in vitro* têm sido utilizados com sucesso para a produção em grande escala de metabólitos secundários de plantas. O objetivo deste trabalho foi determinar o padrão de crescimento dos calos, tendo em vista a identificação da fase de desaceleração, quando as células calos devem ser subcultivadas para o estabelecimento de suspensões de células e a produção de metabólitos secundários, a partir de folhas, segmentos nodais e internodais, da cultivar *C. annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. Os explantes foram inoculados num meio suplementado com BAP e 2,4-D sendo 0,5 mg L⁻¹ BAP + 4,0 mg L⁻¹ 2,4-D para a explantes foliares e internodais e 0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D para explantes nodais. Os calos eram de uma coloração esbranquiçada, ou às vezes translúcida e friáveis. Foi determinada a curva de crescimento dos calos, com padrão de crescimento sigmóide, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. A fase de desaceleração iniciada no dia 31 de cultivo de explantes foliares, no dia 26 de explantes internodais, e no dia 29 de explantes nodais.

Palavras-chave: Curva de crescimento. Suspensão Celular. Metabólitos Secundários.

INTRODUÇÃO

Culturas de células vegetais e de órgãos surgiram como fontes potenciais de metabólitos secundários, os quais são usados como produtos farmacêuticos, agroquímicos, aromatizantes, agentes de coloração, biopesticidas e aditivos alimentares (MURTHY et al., 2014). A concentração de metabólitos secundários numa planta varia de acordo com as interações de processos bioquímicos, fisiológicos e ecológicos (GERSHENZON; ENGELBERTH, 2013). As principais vantagens de um sistema de cultura de células durante o cultivo convencional de plantas inteiras são; (1) compostos úteis podem ser produzidos em condições controladas independente de alterações climáticas ou as condições do solo; (2) células de cultura estariam livres de micróbios e insetos; (3) as células de qualquer planta poderia facilmente ser multiplicadas para produzir seus metabólitos específicos; (4) controle automatizado do crescimento celular e regulação racional de processos metabólitos iriam reduzir os custos do trabalho e aumentar a produtividade; (5) As substâncias orgânicas são extraíveis a partir de culturas de calos (VANISREE et al., 2004).

A abundância de compostos de interesse agrícola, tais como flavonóides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais têm promovido o estudo de espécies de *Capsicum* como alternativas no controle de parasitas (LUZ, 2007). O estudo do padrão de desenvolvimento de calos em *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño é necessário para o estabelecimento de suspensões de células e também para subsidiar os estudos sobre a bioatividades dos seus metabólitos secundários.

O foco deste estudo é a determinação da curva de crescimento do calo, tendo em vista a identificação da fase de desaceleração, quando as células de calos devem ser subcultivadas para o estabelecimento de suspensões de células e a produção de princípios ativos de interesse agrícola.

METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, Rondônia.

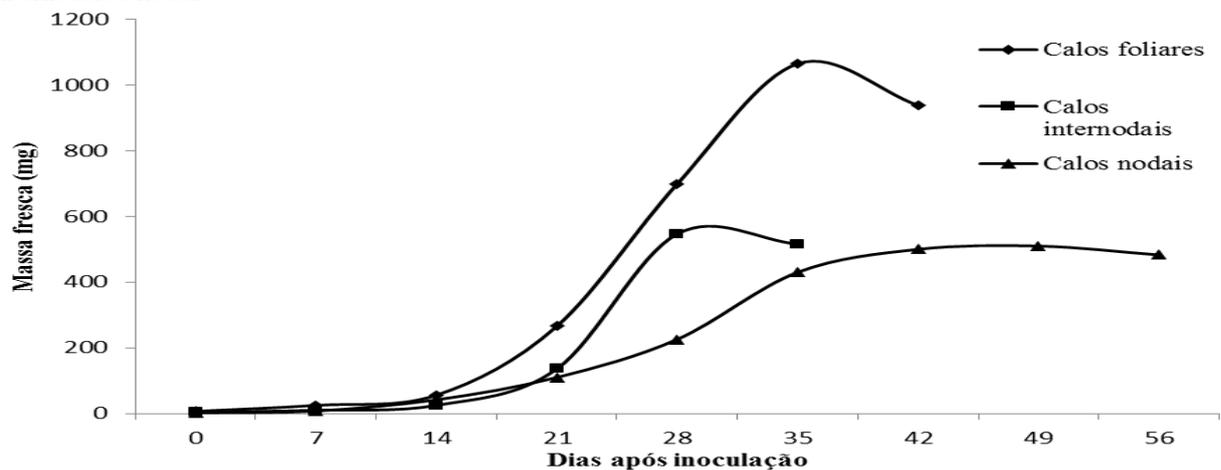
A determinação da curva de crescimento de calos foliares, nodais e internodais, foi realizada com a indução de calos, onde os explantes foram inoculados individualmente, com a superfície adaxial em contato com o meio de cultivo, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% (p/v) de sacarose e 0,6% (p/v) de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, seguido por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. O meio foi suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D com 0,5 mg L⁻¹ de

BAP para explantes foliares e internodais; e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D com 0,5 de BAP para explantes nodais, conforme experimentos desenvolvidos anteriormente os quais determinaram o melhor tratamento para indução de calogênese em *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. Todos os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 26±1°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos foram realizadas nos 49 dias subsequentes, em intervalos de sete dias. Em cada avaliação, três calos foram cuidadosamente limpos com papel toalha para retirar o excesso de meio de cultura e pesados individualmente em balança de precisão obtendo-se o peso fresco médio dos três explantes. Estes explantes foram colocados em estufa a 50°C até atingir peso constante e foram novamente pesados para obtenção do peso seco. Com os resultados foi estabelecida a curva de crescimento com as fases lag, exponencial, linear, desaceleração, e estacionária, a curva de crescimento foi plotada a partir da média das três repetições em cada tempo de determinação de massa fresca.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As curvas de crescimento dos calos dos três tipos de explantes seguiram um padrão sigmoide, apresentando seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio (Figura 1).

Figura 1 - Curva de crescimento de calos de *C. annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño, de explantes foliares, internodais e nodais.



O crescimento dos calos foliares apresentou fase lag do dia da inoculação até o 12º dia de cultivo, exponencial do 12º ao 25º dia, linear do 25º ao 31º, desaceleração do 31º ao 34º, estacionária do 34º ao 36º e declínio do 36º ao 42º dia de cultivo.

O crescimento dos calos internodais apresentou fase lag do dia da inoculação até o 11º dia de cultivo, exponencial do 11º ao 22º dia, linear do 22º ao 26º, desaceleração do 26º ao 29º, estacionária do 29º ao 31º e declínio do 31º ao 35º dia de cultivo.

O crescimento dos calos nodais apresentou fase lag do dia da inoculação até o 7º dia de cultivo, exponencial do 7º ao 29º dia, linear do 29º ao 32º, desaceleração do 32º ao 40º, estacionária do 40º ao 50º e declínio do 50º ao 56º dia de cultivo.

Na literatura não foram encontrados trabalhos referentes à determinação de curvas de crescimento de calos do gênero *Capsicum*, sendo esse um dos trabalhos pioneiros na área. O comportamento da curva de calos ocorre em função da espécie em estudo e do explante utilizado (FEITOSA et al., 2013), sendo o padrão sigmoide característico do tipo de tecido desdiferenciado (PEIXOTO et al., 2011).

As curvas de desenvolvimento de calo, em geral, são estabelecidas para identificar as fases dos processos de crescimento fundamentais, a fim de determinar o momento exato para subcultivo dos calos para um meio novo (SANTOS et al., 2010). Estes estágios são; 1) atraso de fase: mobilização de metabólitos começa e síntese de proteínas e metabólitos específico ocorre, sem a multiplicação celular; 2) fase exponencial: a divisão celular atinge o máximo; 3) fase linear: reduz a divisão celular; 4) fase de desaceleração: diminui a divisão celular e a expansão das células ocorre, isto é, quando as células têm de ser transferidas para um novo meio de cultura, devido à redução de nutrientes, e acumulação de ágar secura de substâncias tóxicas; 5) fase estacionária: sem divisão celular ou aumento de peso ocorrer, mas o acúmulo de metabólitos secundários atinge o máximo; e 6) fase de declínio: perda de peso devido à morte celular (CASTRO et al, 2008; NOGUEIRA et al, 2008; SANTOS et al, 2010).

A fase de desaceleração ocorreu a partir do dia 31º até o dia 34º de explantes foliares, entre os dias 26º a 29º de explantes internodais, e desde o 32º até o dia 40º de explantes nodais. Em geral, o foco da curva de

crescimento do calo é o início da fase de desaceleração, sendo o momento exato para subcultura dos calos para um novo meio líquido, a fim de estabelecer as suspensões de células (SANTOS et al., 2010). Neste caso, o momento adequado para subcultura células calo de plantas Jalapeño em um meio líquido é no dia 31º, 26º e 32º dias, respectivamente, para folha, internodal e explantes nodais. Da mesma forma, Balbuena et al. (2009) utilizou células de calo de *P. solmsianum* no dia 24º de cultura para iniciar culturas de células em suspensão. Santiago (2003) estudou o desenvolvimento de calo em *P. hispidinervium* e identificado a fase de desaceleração a partir do dia 42º, a partir do qual houve uma diminuição na massa seca dos calos.

CONCLUSÕES

As curvas de crescimento seguem um padrão sigmoide, com ocorrência das fases lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. O momento ideal para o subcultivo das células de calos em meio líquido para o estabelecimento de suspensões celulares são no 31º, 26º e 32º dias de cultivo, para explantes foliares, internodais e nodais, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- BALBUENA, T. S. *et al.* *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 274-281, 2009.
- CASTRO, A. H. F. *et al.* Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.
- FEITOSA, L. S. *et al.* Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.
- GERSHENZON J.; ENGELBERTH J. E. Metabólitos secundários e Defesa Vegetal. *In*: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 13, p. 369-399.
- LUZ, F.J.F. **Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E.-J.; PAEK, K.-Y. Production of secondary metabolites from cell and organ culture: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.
- NOGUEIRA, R. C. *et al.* Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.
- PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n. 13, p. 51-76, 2011.
- SANTIAGO, E. J. A. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. 2003. 162 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 133-136, 2010.
- VANISREE, M. *et al.* Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, n. 1, p. 1-22, 2004.