

CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE MARACUJAZEIRO NATIVO

Milene Alves de Figueiredo Carvalho¹; Renato Paiva¹; Daiane Peixoto Vargas¹; Luciano Coutinho Silva¹; Raírys Cravo Nogueira²

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 3037, CEP 37200.000, Lavras/MG,

E-mail: migueiredo@yahoo.com.br.

²Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Universitário de Altamira, Rua Coronel José Porfírio, 2515, São Sebastião, CEP 68372-040 Altamira, PA, Brasil.

RESUMO

O estabelecimento da curva de crescimento de calos possibilita obter o momento exato de repicagem dos calos para um meio fresco. O objetivo deste trabalho foi determinar a curva de crescimento de calos originados de explantes foliares de maracujazeiro *Passiflora gibertii* N. E. Brown. Folhas assépticas foram excisadas em diâmetros de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuados pequenos cortes na face abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de BAP (8,88 μM), sacarose (3%), água de coco (5%) e solidificado com ágar (0,5%). Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. A determinação da curva de crescimento foi realizada em intervalos de 10 dias, avaliando-se a matéria fresca e seca dos calos. A curva de crescimento apresentou um elevado acúmulo de massa fresca de calos, com crescimento tipo sigmóide, com quatro fases distintas: lag (entre 0 e 10 dias de inoculação), exponencial (10^o ao 60^o dia), linear (60^o ao 70^o dia) e desaceleração (70^o ao 80^o dia). A repicagem de calos provenientes de folhas de maracujazeiro *P. gibertii* deve ser efetuada no início da fase de desaceleração, ou seja, aos setenta dias de cultivo.

Palavras-chave: calogênese, maracujá selvagem, cultura de tecidos, *Passiflora gibertii*

GROWTH CURVE OF NATIVE PASSION FRUIT PLANT CALLI

ABSTRACT

The calli growth curve makes possible the determination of the exact moment to transplant the calli to a fresh medium. The aim of this work was to determine the growth curve of calli obtained from leaf explants of *Passiflora gibertii* N. E. Brown. Aseptic leaves were excised in diameters of $\approx 1 \text{ cm}^2$ and small cuts in its abaxial surface were made, which were in contact with the MS culture medium, containing half of its salt concentration, supplemented with BAP (8.88 μM), sucrose (3%), coconut water (5%) and solidified with agar (0.5%). After inoculation, the explants were maintained in growth room, under a photon irradiance of $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperature of $25 \pm 2^\circ \text{C}$ and photoperiod of 16 hours. The determination of the growth curve was carried out in intervals of ten days, by evaluating the calli fresh and dry matter. The growth curve presented a high accumulation of calli fresh matter, with a sigmoid shape and four distinct phases: lag (between 0 and 10 days of inoculation), exponential (10th to the 60th day), linear (60th to the 70th day) and deceleration (70th to the 80th day). The transplanting of the calli obtained from leaves of the *P. gibertii* passion fruit plant should be carried out in the beginning of the deceleration phase, in other words, around the seventieth day of cultivation.

Key words: callogenesis, wild passion fruit, tissue culture, *Passiflora gibertii*.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence a, aproximadamente, 630 diferentes espécies de *Passiflora* L., gênero da família Passifloraceae, que compreende 18 gêneros com distribuição, principalmente, nos trópicos da América, Ásia e África (Meletti 2000. Ruggiero *et al.* 1996). A ampla diversidade genética verificada entre as diferentes espécies do gênero *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, evidencia o promissor uso em programas de melhoramento genético e também como porta-enxerto para variedades comerciais (Paula *et al.* 2005. Roncatto *et al.* 2004).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica vantajosa, quando aplicada a variedades melhoradas que possuem pouco material e necessitam ser propagadas em curto período de tempo e em grande escala, destacando-se, como alternativa importante, principalmente, para as culturas de ciclo longo (Andrade 1998. Lima *et al.* 2008). Uma das maneiras de multiplicação *in vitro* é por meio da organogênese indireta, passando pela fase de calo. Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (Pierik 1990).

De acordo com Vietez & San-José (1996), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calo.

Calos são classificados como grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação (Torres *et al.* 2000. Nogueira 2004. Castro *et al.* 2009). O estabelecimento da curva de crescimento de calos de determinada espécie é importante

para identificar as fases em que ocorrem processos fundamentais ao seu crescimento. Obtendo-se essas informações, é possível estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um meio fresco (Soares 2003. Serra *et al.* 2000) para se tornar possível a indução de embriogênese ou organogênese (Santos *et al.* 2008) e/ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (Nogueira *et al.* 2008). A taxa de crescimento de calos pode apresentar cinco estágios: a fase lag, na qual as células se preparam para dividir; a fase exponencial de crescimento, na qual a divisão das células é máxima; a fase linear de crescimento, na qual as divisões diminuem e as células crescem; a fase de desaceleração do crescimento e a fase estacionária, onde o número de células é constante (Smith 1992).

O objetivo deste trabalho é determinar a curva de crescimento de calos originados de explantes foliares do maracujazeiro *Passiflora gibertii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Plantas matrizes jovens de maracujazeiro *Passiflora gibertii* - acesso CPAC MJ-22-01 da coleção de germoplasma da Embrapa Cerrados (CPAC), Planaltina, DF - foram germinadas e mantidas em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura, irradiância de fótons 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Curva de crescimento

Para a desinfestação, as folhas foram levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 0,5% de cloro ativo, acrescido de Tween 20 (uma gota por 100 mL de hipoclorito) por 10 minutos e, posteriormente lavadas 3 vezes em água

destilada e autoclavada.

Após desinfestação, as folhas foram excisadas em diâmetros de $\approx 1 \text{ cm}^2$ e efetuados pequenos cortes na face abaxial, a qual ficou em contato com o meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) contendo metade da concentração de seus sais, acrescido de BAP ($8,88 \mu\text{M}$), sacarose (3%), água de coco (5%) e solidificado com ágar (0,5%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem a 120°C , durante 20 minutos.

Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Para a determinação da curva de crescimento, em intervalos de 10 dias, os calos de maracujazeiro foram pesados em balança de precisão para determinação da

matéria fresca e, logo após, acondicionados em estufa de circulação forçada a 70°C , por 72 horas, para determinação da matéria seca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de quatro repetições por ponto da curva, sendo cada repetição composta por cinco explantes. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software estatístico SISVAR[®].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento dos calos foi observado pelos parâmetros: massa fresca e massa seca dos calos. Observou-se crescimento sigmoidal, com tendência de ganho de matéria fresca, em função do aumento do tempo de cultivo (Figura 1).

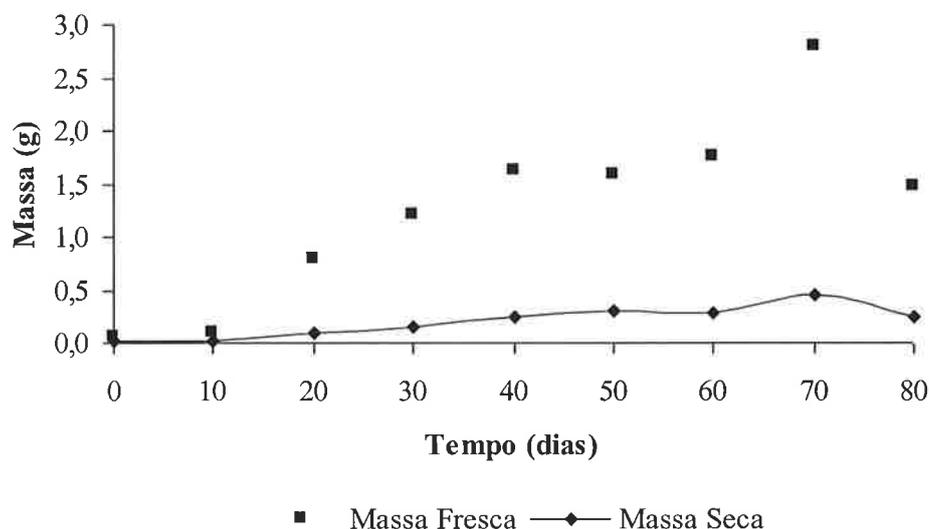


Figura 1. Curva de crescimento de calos de maracujazeiro *P. gibertii*.

Até o 10º dia, o pequeno acúmulo de massa seca no calo caracterizou a fase lag, na qual as células do explante preparam-se para divisão celular, acumulando biomassa. Nesta fase, tem-se número estacionário de células, início da mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e produção de energia. Santos *et al.* (2008) observaram

que esta fase ocorreu até o 28º dia de inoculação (equivalente a 39 % de crescimento) no segmento foliar e até o 49º dia (equivalente a 67 % de crescimento) no segmento nodal de calos de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã originados desses explantes. Mezzetti *et al.* (1991), avaliando o crescimento de calos obtidos com base em

segmentos foliares de *Actinidia deliciosa* C.F. Liang, 'Hayward', observaram um acúmulo de matéria fresca e seca até o 30^o dia após a inoculação. Em calos de *Bertholletia excelsa* H.B.K., Serra *et al.* (2000) também observaram que a fase lag ocorreu até o 30^o dia de inoculação. Já Stein (2006) observou esta fase até o 40^o dia após a inoculação de segmentos foliares de ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD. Penn.]. Para calos obtidos a partir de segmentos foliares de *Coffea arabica* cv Rubi, Santos *et al.* (2003) verificaram essa fase até o 42^o dia de inoculação. O longo período observado, por esses autores, nessa fase pode estar relacionado com a utilização de explantes primários retirados de plantas com diferentes genótipos e estágios fisiológicos (Serra *et al.* 2000).

A fase de crescimento exponencial (log), período no qual ocorre a máxima divisão celular, ocorreu entre o 10^o e o 60^o dia após a inoculação, com um maior acúmulo de matéria seca (Figura 1). Santos *et al.* (2003) observaram a fase exponencial entre o 42^o e 77^o dia de cultivo de calos de *Coffea arabica* L., cv Rubi. Em explantes foliares de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã essa fase foi observada entre o 28^o e o 63^o dia após inoculação e em explantes nodais da mesma espécie entre o 49^o e o 63^o dia de cultivo (Santos *et al.* 2008). Em calos de *Bertholletia excelsa* H.B.K. esta fase ocorre entre o 30^o e 53^o dia de cultivo (Serra *et al.* 2000) e em calos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD. Penn. entre 40^o e 50^o dia após a inoculação (Stein 2006).

A fase de crescimento linear, em que os calos estabilizam a divisão celular e aumentam a área celular, foi observado entre o 60^o e 70^o dia de cultivo. Essa fase é caracterizada pelo crescimento e desenvolvimento celular. Serra *et al.* (2000) observaram a fase linear em calos de *Bertholletia excelsa* H.B.K. entre o 53^o e 60^o dia de inoculação. Santos *et al.* (2003) verificaram que esta fase ocorre entre o 77^o e

84^o dia de cultivo em calos de *Coffea arabica* L., cv Rubi e em calos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD. Penn. entre 50^o e 70^o dia após a inoculação (Stein 2006). O período de crescimento linear foi observado entre o 63^o e o 70^o dia de inoculação em explantes foliar e nodal de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã, com 9 e 5 % de crescimento, respectivamente (Santos *et al.* 2008). Serra *et al.* (2000) afirmam que a fase linear pode ser atingida mais rapidamente, variando de acordo com a espécie, principalmente quando se utiliza explantes secundários, em que o tecido se apresenta mais homogêneo.

A fase de desaceleração do crescimento ocorreu entre o 70^o e 80^o dia de cultivo. Stein (2006) também observou essa fase no mesmo período, para calos de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) TD. Penn. Resultados semelhantes foram observados por Santos *et al.* (2008) em que o intervalo de desaceleração do crescimento dos calos provenientes de explantes foliar e nodal de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã ocorreu entre o 70^o e o 77^o dia de inoculação, com 7 e 4 % de crescimento, respectivamente. Já Serra *et al.* (2000) observaram o intervalo de desaceleração do crescimento entre o 60^o e 67^o dia de inoculação em calos de *Bertholletia excelsa* H.B.K. Segundo Smith (1992), é nessa fase que os calos devem ser repicados em razão principalmente da redução de nutrientes, secagem do ágar ou mesmo acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura. Dessa forma, a repicagem de calos provenientes de folhas de maracujazeiro *P. gibertii* deve ser efetuada no início da fase de desaceleração, ou seja, aos setenta dias de cultivo. A fase estacionária do crescimento não foi observada durante o período avaliado.

Além das espécies citadas anteriormente, foi possível observar que a curva de crescimento para calos de *Passiflora gibertii* apresentou similaridade de padrão a outras espécies como

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville (Castro *et al.* 2008) e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Nogueira *et al.* 2008).

A curva de crescimento de calos de explantes foliares de *P. gibertii* N. E. Brown apresenta um elevado acúmulo de massa fresca de calos, com crescimento tipo sigmóide, com quatro fases distintas: lag (entre 0 e 10 dias de inoculação), exponencial (10^o ao 60^o dia), linear (60^o ao 70^o dia) e desaceleração (70^o ao 80^o dia).

A repicagem de calos provenientes de folhas de maracujazeiro *P. gibertii* N. E. Brown deve ser efetuada no início da fase de desaceleração, ou seja, aos setenta dias de cultivo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). A bolsa de estudos de Milene Alves de Figueiredo Carvalho foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, L. M. da C. 1998. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 86 p.
- CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; VITOR, S. M. M. 2009. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 385-390.
- CASTRO, A.H.F.; LIMA, M.M.; PAIVA, R. ALVARENGA, A.A.; SÓTER, M.O. 2008. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.4, p. 99-104.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS. L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, p. 183-260.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. 2008. Calli induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 17-22.
- MEZZETTI, B.; CONTE, L.S.; ROSATI, P. 1991. *Actinidia deliciosa* in vitro II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, p.153-160.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v.15, p.473-497.
- NOGUEIRA, R.C. 2004. Glossário de cultura de tecidos. **ABCTP - Associação brasileira de cultura de tecidos de plantas - Notícias**. Disponível em: <http://www.abctp.ufla.br/ABCTP%20Not%C3%ADcias/ABCTP48.pdf>. Acesso em: 06/02/2007.
- NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. 2008. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista**

- Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, p.44-48.
- PAULA, M. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P. BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. 2005. Diversidade genética de espécies de *Passiflora*, potenciais fontes de resistência a doenças, com base em marcadores RAPD. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PINTO, A. C. Q.; SOUSA, E. S. (Ed.). **Reunião técnica de pesquisas em maracujazeiro: trabalhos apresentados**, 4, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 100-104.
- RONCATTO, G.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C.; FILHO, G. C. N.; CENTURION, M. A. P. C.; FERREIRA, F. R. 2004. Comportamento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.) quanto à morte prematura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 552-554.
- SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. 2008. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, p. 22-29.
- SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. 2003. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, p.571-577.
- SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. 2000. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.833-840.
- SMITH, R.H. 1992. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: Academic Press, 171p.
- SOARES, G. de A. 2003. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro [Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.]**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 90 p.
- STEIN, V.C. 2006. **Micropropagação, índice mitótico e análise ultra-estrutural de calos de Inga vera Willd. subsp. affinis (DC.) T.D. Penn.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, 100p.
- TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, G. F. DE; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A.S.; BRIGIDO, M.M.; ROMANO, E. 2000. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 128p.
- VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. 1996. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants in vitro. **In vitro Cellular & Developmental Biology, Columbia**, v. 32, p. 140-147.