

## Caracterização de culturas celulares de *Solanum sessiliflorum* Dunal sob efeito de reguladores de crescimento e extratos vegetais de *Jasminum mesnyi*

Jean Carlos Fernando Besson<sup>1</sup> e Suzana Stefanello<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá, Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Avenida Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Rua Pioneiro, 2153, 85950-000, Jardim Dallas, Palotina, PR.

jeanbesson2012@gmail.com, sstefanelo@ufpr.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de reguladores de crescimento e extratos vegetais de *Jasminummesnyi* nas respostas morfogênicas *in vitro* de culturas celulares de *Solanumsessiliflorum*. Calos foram inoculados em frascos contendo meio de cultura MS e os seguintes tratamentos: ausência de reguladores, suplementação com Ácido Naftalenoacético-ANA (10 mg L<sup>-1</sup>) e Zeatina-ZEA (1 mg L<sup>-1</sup>), suplementação com 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de extrato aquoso autoclavado e filtroesterelizadode *J. mesnyi*. Após 35 e 70 dias de cultivo avaliou-se o incremento massa fresca dos calos e procedeu-se a avaliação citoquímica das culturas celulares. Aos 35 dias após a inoculação, observou-se que os calos apresentaram aumento na massa fresca sem, entretanto, apresentar diferença significativa entre os tratamentos, diferença esta observada aos 70 dias onde houve o maior ganho de massa no tratamento com ANA e ZEA. A avaliação citoquímica das culturas celulares do tratamento controle revelou células predominantemente alongadas, com citoplasma pouco denso, sem reação com o carmim acético, não evidenciando a presença de estruturas globulares pró-embriogênicas que levariam a formação de embriões. O mesmo foi observado com as células cultivadas na presença de ANA e ZEA e extrato aquoso de *J. mesnyi*, apesar do ganho de biomassa.

**Palavras-chave:** Solanaceae, sementes, ácido jasmônico.

### Characterization of cell cultures of *Solanumsessiliflorum* Dunal grown with growth regulators and *Jasminummesnyi* extract

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the influence of growth regulators and *Jasminummesnyi* extract on the morphogenetic responses *in vitro* of *Solanumsessiliflorum* cell cultures. Calli were inoculated into flasks containing MS medium and the following treatments: absence of growth regulators; supplemented with Naftalene Acetic Acid- NAA (10 mg L<sup>-1</sup>) and Zeatin - ZEA (1 mg L<sup>-1</sup>), supplemented with 300 and 600 mg L<sup>-1</sup> of autoclaved and filter-sterilized aqueous extract of *J. mesnyi*. After 35 and 70 days, increase in fresh mass of calli was evaluated as well as the cytochemical analyses of cell cultures. At 35 days the calli showed increase in fresh mass, however, without significant difference between the treatments, but at 70 days significant difference was detected, at which there was the highest mass gain in the treatment with NAA and ZEA. The cytochemical analysis of cell from control cultures showed predominantly elongated cells with less dense cytoplasm typical of non embryogenic cells. There was no reaction with acetic carmine, without any evidence of pro-embryogenic globular structures that would lead to embryo formation. The same was found for cells grown with NAA and ZEA and all *J. mesnyi* extracts, despite the higher biomass.

**Key-words:** Solanaceae, seeds, jasmonic acid.

### Introdução

O cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) também chamado de maná, topiro e tomate de índio é uma Solanaceae originária da Amazônia Ocidental. A espécie pode ser encontrada em toda a Amazônia brasileira, peruana e colombiana. A planta é um arbusto ereto e ramificado, que cresce de 1 a 2 m de altura (Silva Filho *et al.*, 1996).

Do ponto de vista agrônômico a espécie apresenta potencialidades para a agroindústria, dada a sua rusticidade e alta produção de frutos o que tem despertando interesse de pesquisadores e produtores em outras regiões do Brasil, como da Zona da Mata pernambucana (Silva Filho *et al.*, 1996), mineira (Pires *et al.*, 2006) e também de Santa Catarina, onde a planta apresentou bons resultados e viabilidade para o plantio em áreas livres de geada (Brancher e Tagliari, 2004). Pires *et al.* (2006) verificaram que a composição química de frutos cultivados na Zona da Mata mineira foi semelhante a de frutos da região amazônica e que houve boa aceitação pelos consumidores.

Os frutos maduros são ricos em ferro e vitamina B5 (niacina) (Vega *et al.*, 2012), podendo ser consumidos *in natura* ou utilizados na fabricação de sucos, doces, geléias, sorvetes e molhos (Silva Filho *et al.*, 1996), e utilizados ainda, na fabricação de medicamentos, cosméticos e nutracêuticos (Jaramillo, 2011), além de serem empregados também na medicina popular como agente hipoglicemiante e hipocolesterolêmico (Silva Filho *et al.*, 2003; Pardo, 2004).

Apesar do cubiu ser uma espécie com inúmeras potencialidades são poucos os cultivos para a produção em larga escala, e em outros locais do país, limitando-se, na maioria das vezes, ao cultivo de fundo de quintal no interior da Amazônia. Em parte, esta situação se deve a pouca divulgação das potencialidades da espécie. Por outro lado, é também evidente o escasso conhecimento disponível sobre práticas agrícolas adequadas, o que restringe o desenvolvimento do cubiu como cultivo (Silva, 2007).

Apesar de ser de fácil cultivo no seu ambiente de origem, a germinação é desuniforme e as sementes perdem sua viabilidade com extrema rapidez (Silva Filho *et al.*, 2005). Considerando-se estas dificuldades, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias alternativas, que tenham como propósito a propagação clonal em larga escala de genótipos superiores quanto às qualidades agrônômicas, além de servir para

proteger o germoplasma existente. Neste sentido, diversas estratégias biotecnológicas têm se constituído em novas ferramentas incluindo a cultura de células e tecidos vegetais (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004).

Protocolos de regeneração *in vitro* via organogênese para esta espécie já foram testados (Hendrix *et al.*, 1987; Cordeiro e Mattos, 1991; Boufleuheret *al.*, 2008), porém com baixo número de plantas regeneradas. Uma alternativa para a produção em larga escala de plantas e estudos básicos de fisiologia é a regeneração via embriogênese somática. Entretanto, não poucos há relatos da obtenção de plantas por essa via para o cubiu, apesar das tentativas realizadas por Stefanello (2008), que obteve embriões somáticos em estágios iniciais de desenvolvimento, contudo os mesmos não regeneraram plantas. Assim, estudos que visem elucidar a via de obtenção de embriões através do conhecimento das culturas celulares que lhes dão origem são de fundamental importância.

De acordo com Guerra *et al.* (1999), culturas induzidas com uma substância com forte atividade auxínica podem provocar a formação de complexos ou massas celulares pró-embriogênicas, as quais por processos de embriogênese repetitiva, representados por fenômenos de clivagem ou gemação, resultam em ciclos repetitivos de divisões celulares que geram, nas angiospermas, embriões somáticos globulares

As células embriogênicas apresentam características que as distinguem das demais células vegetais não embriogênicas. Morfologicamente, as células embriogênicas caracterizam-se pelo pequeno tamanho (20-30  $\mu\text{m}$ ), formato isodiamétrico, citoplasma denso (Emons, 1994; Fehéret *al.*, 2003), parede celular delgada, núcleo grande e nucléolos visíveis (Guerra *et al.*, 1999; Ribas, 1999).

A presença de proteínas de reserva, grãos de amido e lipídios são outras características das células com competência embriogênica (Merkle *et al.*, 1995; Ribas, 1999; Cangahuala-Inocente, 2002). Além das características morfológicas, as células embriogênicas reagem fortemente ao corante carmim acético, indicando a presença de glicoproteínas associadas à rota embriogênica (Gupta e Durzan, 1987; Flores, 2006).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de reguladores de crescimento e extratos vegetais de *Jasminummesnyi* nas respostas morfogênicas *in vitro* de culturas celulares de *Solanum sessiliflorum*.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Paranaense *Campus* Toledo, PR. Foram utilizados como explantes calos formados sobre segmentos de hipocótilo obtidos de plântulas de *S. sessiliflorum* resultantes da germinação *in vitro* e cultivados durante cinco semanas na ausência de luz em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com ANA (10 mg L<sup>-1</sup>) e ZEA (1 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e agar (6,5 g L<sup>-1</sup>).

Os calos foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultura MS onde foram testados seis tratamentos: ausência de reguladores (controle), suplementação com ANA (10 mg L<sup>-1</sup>) e ZEA (1 mg L<sup>-1</sup>), suplementação com 300 e 600 mg L<sup>-1</sup> de extrato aquoso autoclavado e filtroesterelizado de *J. mesnyi*. Para o preparo do extrato aquoso foram utilizadas folhas de *J. mesnyi* e utilizou-se a metodologia proposta por Alves et al. (2007), utilizando contudo extrato aquoso ao invés de metanólico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, tendo como unidade experimental uma placa de Petri contendo 5 calos com 200 mg, com 4 repetições.

Os calos foram mantidos na ausência de luz a 25 ± 2°C. Após 35 e 70 dias de cultivo avaliou-se o incremento massa fresca dos calos (mg) e procedeu-se a avaliação citoquímica das culturas celulares, utilizando a dupla coloração com azul de Evans e carmim acético de acordo com Durzan (1988). Em microscópio óptico Olympus BX50, as células coradas foram observadas, identificando-se os aspectos relevantes e realizando-se o registro fotográfico em câmera digital Olympus X760.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2003).

## Resultados e Discussão

Na avaliação realizada aos 35 dias após a inoculação, observou-se que os calos cultivados apresentaram aumento na massa fresca, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1). Após 70 dias de cultivo, por outro lado, foi observada diferença estatística entre os tratamentos e maior ganho de massa fresca dos calos (2.503 mg) cultivados no tratamento com 10 mg L<sup>-1</sup> ANA + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA.

Tabela 1. Valores médios para a massa fresca (miligramas) de calos de *S. sessiliflorum* Dunal inoculados em meio de cultura MS contendo extratos aquosos e fitorreguladores, após 35 e 70 dias de cultivo *in vitro*. A = autoclavado; F = filtroesterelizado

Extrato/Fitorregulador	35 dias (mg)	70 dias (mg)
Controle	434 Ab	544 Aa
10 mg L <sup>-1</sup> ANA + 1 mg L <sup>-1</sup> ZEA	509Ab	2.503 Ba
Extrato de <i>J. mesnyi</i> A (300 mg L <sup>-1</sup> )	486 Aa	288 Ab
Extrato de <i>J. mesnyi</i> A (600 mg L <sup>-1</sup> )	535 Ab	722 Aa
Extrato de <i>J. mesnyi</i> F (300 mg L <sup>-1</sup> )	396 Ab	528 Aa
Extrato de <i>J. mesnyi</i> (600 mg L <sup>-1</sup> )	384 Ab	853 Aa
CV (%)	34,68	24,13

Médias seguidas da mesma letra maiúscula, na coluna e minúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV = Coeficiente de variação.

A proliferação e a diferenciação celular, direta ou indireta via calos, são influenciadas por reguladores de crescimento como auxinas e citocininas (Wang et al., 2008). Na maior parte das espécies estudadas em que a adição de reguladores é necessária para induzir a multiplicação celular *in vitro* com posterior regeneração via embriogênese somática, auxinas e citocininas têm sido essenciais na indução de respostas embriogênicas provavelmente porque elas participam na regulação do ciclo e da divisão celular (Fehéret al., 2003; Jiménez, 2005). As auxinas promovem a desdiferenciação celular, com reativação de divisões celulares via coordenação da expressão de genes e modificações pós-transcricionais de proteínas regulatórias envolvidas no controle do ciclo celular (Jiménez, 2005).

A adição de 600 mg L<sup>-1</sup> de extrato aquoso de *J. mesnyi* autoclavado e/ou filtroesterelizado também promoveu o incremento de biomassa dos calos superando o tratamento controle, indicando que as substâncias contidas nos extratos favoreceram a multiplicação *in vitro*.

Alves et al. (2007) também verificaram o efeito positivo de extratos vegetais obtidos de diferentes plantas sobre o crescimento *in vitro* de *Rosa x hybrida*. Os referidos autores estudaram a influência da adição ao meio de cultura MS de 150 e 300 mg L<sup>-1</sup> de extrato metanólico de *Saintpaulia ionantha* (folhas), *Hibiscus rosa-sinensis* (folhas) e *Bougainvillea spectabilis* (folhas e flores), além da suplementação com BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) sobre o crescimento *in vitro* de segmentos nodais provenientes de plântulas de *Rosa x hybrida*. Os resultados indicaram superioridade do tratamento com BAP sobre

o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, contudo a suplementação dos meios de cultura com extratos vegetais das plantas testadas favoreceu o crescimento levando os autores a concluir que estas substâncias podem influenciar o crescimento *in vitro* das espécies estudadas.

Krzyzanowska *et al.* (2012), por outro lado, observaram que suspensões celulares de *Mentha × piperita* tratadas com ácido jasmônico apresentaram diminuição no acúmulo de biomassa quando comparadas com o controle.

A avaliação citoquímica das culturas celulares do tratamento controle revelou células predominantemente alongadas, com citoplasma pouco denso e não houve reação com o carmim acético, não evidenciando a presença de estruturas globulares pró-embriogênicas que levariam a formação de embriões (Figura 2a). O mesmo foi observado com as células cultivadas na presença de ANA e ZEA e extrato aquoso de *J. mesnyi* (Figura 2b, 2c), apesar do maior crescimento ou ganho de biomassa dos calos.

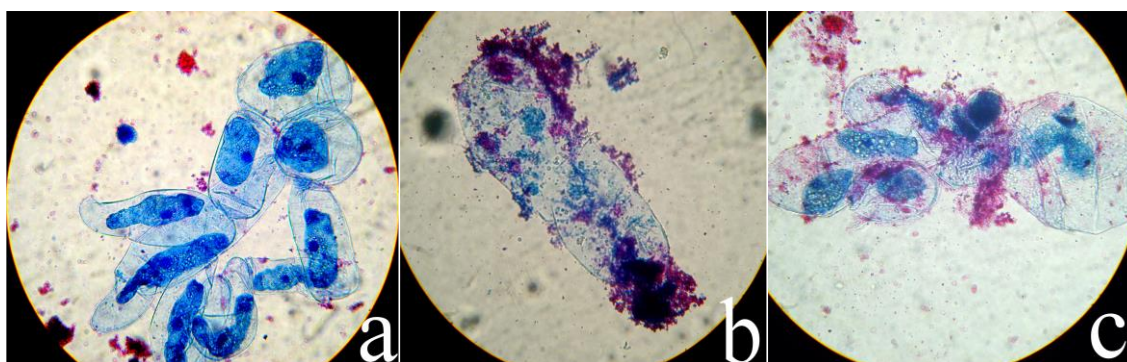


Figura 1. Avaliações citoquímicas das culturas celulares. a) células provenientes do tratamento controle; b) células provenientes do tratamento com ANA (10 mg L<sup>-1</sup>) e ZEA (1 mg L<sup>-1</sup>); c) células provenientes do tratamento com extrato aquoso de *Jasminum mesnyi* autoclavado (300 mg L<sup>-1</sup>). Aumento 400X.

Segundo Cid (1992) estas culturas com células predominantemente alongadas e filamentosas podem ser constituídas por elementos diferenciados como fibras e esclereídeos, indicando que estas porções dos calos não se desdiferenciaram e por isso, não são embriogênicas. Estruturas similares foram observadas em culturas de inflorescências jovens de *Cynodondactylon* que produziram calos não embriogênicos, com aspecto não organizado, não compactado e possuindo células longas e tubulares na sua superfície (Chaudhury, Qu, 2000).

### Conclusões

A suplementação do meio de cultura com ANA (10 mg L<sup>-1</sup>) e ZEA (10 mg L<sup>-1</sup>) permitiu maior ganho de massa fresca dos calos de *S. sessiliflorum* cultivados *in vitro*, porém suas células não reagiram ao carmim acético o que indica a não indução da rota embriogenética no período avaliado.

### Referências

ALVES, D. S.; OLIVEIRA, D. F.; PASQUAL, M. CARVALHO, D. A.; RODRIGUÊS, V. A.; CARVALHO, D. D. C. Influência de extratos vegetais no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Rosa x hybrida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1888-1892, 2007.

BOUFLEUHER, L.M.; SCHUELTER, A.R.; DA LUZ, C.L.; LUZ, C.L. da; ANTES, V.A.; STEFANELLO, S.; COMERLATO, A.P.; OTONI, W. C. *In vitro* propagation of *Solanum sessiliflorum* Dunal as affected by auxin and cytokinin combinations and concentrations. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 7, p.639-646, 2008.

BRANCHER, A.; TAGLIARI, P. S. Cubiu: uma fruta amazônica no litoral catarinense. **Agropecuária Catarinense**, v. 17, p. 43-45, 2004.

CANGAHUALA-INOCENTE, G.C. **Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana*: sistema referência e aspectos fisiológicos e morfo-histológicos**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 38p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais).

CHAUDHURY, A.; QU, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p.113-120, 2000.

CID, L.P.B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n.18, p.2-7, 1992.

CORDEIRO, A.R.; MATTOS, N. O. *In vitro* regeneration of several accessions of *Solanum tapiro* Bonpl. and *Solanum sessiliflorum* Dun. (Cúbio). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p.1931-1936, 1991.

DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology e Genetic Engineering Reviews**, v.6, p.341-378, 1988.

EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 43, p.1-4, 1994.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERREIRA, D. F. **Programa Estatístico Sisvar** (software). Lavras: UFLA, 2003.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffiaglomeratae* *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae).** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2006. 168p. Tese (Doutorado em Agronomia).

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa/CNPH, 1999. p. 533-568.

GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in lobolly pine. **Biotechnology**, v. 5, p.147-151, 1987.

HENDRIX, R.C.; LITZ, R.E.; KIRCHOFF, B.K. *In vitro* organogenesis and plant regeneration from leaves of *Solanum candidum* Lindl., *S. quitoense* Lam. (naranjilla) and *S. sessiliflorum* Dunal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 11, p.67-73, 1987.

JARAMILLO, J. E. C. C. **Estudio de metaolitos fijos y volátiles em três morfotipos de cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) procedentes del departamento Del Guaviare.** 2011. 209p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Concentração Química)-Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2011.

JIMÉNEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p.91-110, 2005.

KRZYŻANOWSKA, J.; CZUBACKA, A.; PECIO, L.; PRZYBYS, M.; DOROSZEWSKA, T.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n.1, p.73-81, 2012.

MERKLE, A. S; PARROT, W.A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A (Ed.). ***In vitro* embryogenesis in plants.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 155-203.

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

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, p.433-440, 2004.

PARDO, M. A., Efecto de *Solanum sessiliflorum* Dunal Sobre el Metabolismo Lipídico y de la Glucosa. **Ciencia e Investigación**, v. 7, p.43-48, 2004.

PIRES, A. M. B.; SILVA, P. S.; NARDELLI, P. M.; GOMES, J. C.; RAMOS, A. M. Caracterização e processamento de cubiu (*Solanum sessiliflorum*). **Ceres**, v. 53, p. 309-316, 2006.

RIBAS, L.L.F. **Morfogênese *in vitro* e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa).** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1999. 175p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais).



SILVA FILHO, D. F.; ANUNCIACÃO, C.J.; NODA, H.; REIS, O.V. Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. **Horticultura Brasileira**, v.14, p.9-14, 1996.

SILVA FILHO, D. F.; NODA, H.; YUYAMA, K.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J. P.L.; MACHADO, F.M. Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): uma planta medicinal nativa da Amazônia em processo de seleção para o cultivo em Manaus, Amazonas, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, p.65-70, 2003.

SILVA FILHO, D.F.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; OLIVEIRA, M.C.; MARTINS, L.H.P. Caracterização e avaliação do potencial agronômico e nutricional de etnovarietades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 35, p.399-406, 2005.

SILVA, D. P. **Armazenamento de sementes de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal): influência da embalagem, do grau de umidade e da temperatura.** Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais).

VEGA, R. G.; CORREA, S. I.; TELLO, E. P. Evaluación de densidades de siembra en *Solanum sessiliflorum* Dunal “cocona” y su efecto en el rendimiento de fruto. **Ciência Amazônica**, v.2, n.2, p.142-145, 2012.

STEFANELLO, S. **Fisiologia pós-colheita e propagação *in vitro* de cultivares de *Solanum sessiliflorum* Dunal.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008, 130 p. Tese (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento).

WANG, W.; ZHAO, X.; ZHUANG, G. WANG, S.; CHEN, F. Simple hormonal regulation of somatic embryogenesis and/or shoot organogenesis in caryopsis cultures of *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Plant Cell**, v.95, p.57-67, 2008.