

Estimulação e seleção em calos de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. para produção de antocianinas

***Byrsonima gardneriana* A callus stimulation and selection. Juss. for production of anthocyanins**

DOI:10.34117/bjdv6n12-226

Recebimento dos originais: 10/11/2020

Aceitação para publicação: 10/12/2020

Katiane Oliveira Porto

Mestre em Recursos Genéticos Vegetais

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Presidente Dutra, Santa Mônica, Feira de Santana – BA. CEP: 44076-160

E-mail: ksoliveira07@gmail.com

Lenaldo Muniz de Oliveira

Doutor em Agronomia (Fisiologia vegetal)

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Transnordestina – Novo Horizonte. CEP: 44036-900. Feira de Santana – BA

E-mail: lenaldo.uefs@gmail.com

Thais Akemi Ogasawara da Silva

Graduanda em Agronomia

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Transnordestina – Novo Horizonte. CEP: 44036-900. Feira de Santana – BA

E-mail: akemithais@hotmail.com

Maurício Santana Lordêlo

Doutor em Estatística e experimentação

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Transnordestina – Novo Horizonte. CEP: 44036-900. Feira de Santana – BA

E-mail: mslordelo@gmail.com

Marilza Neves do Nascimento

Doutora em Agronomia (Fisiologia vegetal)

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Transnordestina – Novo Horizonte. CEP: 44036-900. Feira de Santana – BA

E-mail: marilzaagro@hotmail.com

Angélica Maria Lucchese

Doutora em Química orgânica

Instituição: Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

Endereço: Av. Transnordestina – Novo Horizonte. CEP: 44036-900. Feira de Santana – BA

E-mail: angelica.lucchese@gmail.com

RESUMO

A espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss. pertence à família Malpighiaceae e possui antocianinas em seus frutos, apresentando relevante potencial fitoquímico. O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens celulares e estabelecer um protocolo para estimular a produção de antocianinas em calos desta espécie. Para indução dos calos foram inoculados explantes foliares obtidos de plantas estabelecidas *in vitro*, utilizando-se meio de cultura MS/2, solidificado com 7% de ágar e suplementado com 30% de sacarose, 16µM de BAP + 2µM de ANA. Determinou-se a curva de crescimento e o teor de antocianinas nos calos em intervalos de 7 dias durante 13 períodos. Avaliou-se linhagens mais produtivas em cinco subcultivos. Para estimulação da produção de antocianinas, foi adicionado ao meio de cultura diferentes concentrações de manitol, assim como BAP associado a 2,4-D. A curva de crescimento apresentou padrão sigmoidal, com crescimento linear entre o 21º e o 56º dia de cultivo. Apenas a adição de 5g L⁻¹ de manitol ao meio de cultura induziu o aumento na concentração do pigmento. Novos estudos devem ser conduzidos buscando-se um melhor entendimento do efeito dos reguladores vegetais BAP e 2,4-D além de outros estressores osmóticos para estimular a produção de antocianinas em calos de *B. gardneriana*.

Palavras-chave: Murici, Metabólito secundário, Flavonoides, Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The species *Byrsonima gardneriana* A. Juss. belongs to the Malpighiaceae family and has anthocyanins in its fruits, alters the phytochemical potential. The objective of this work was to select cell lines and establish a protocol to stimulate the production of anthocyanins in calluses of this species. For callus induction, leaf explants from common plants *in vitro* were inoculated, using MS/2 culture medium, solidified with 7% agar and supplemented with 30% sucrose, 16µM BAP + 2µM ANA. The growth curve and anthocyanin content of the calluses were determined at 7-day intervals for 13 periods. More productive strains were evaluated in five subcultures. For stimulation of anthocyanins production, different mannitol concentration was added to the culture medium, as well as BAP associated with 2,4-D. The results showed a growth curve with a sigmoidal pattern, with linear growth between 21st and 56th day of cultivation. In the present study, only the addition of 5g L⁻¹ of mannitol to the culture medium induced an increase in pigment concentration. Further studies should be conducted seeking a better understanding of the effect of plant regulators BAP and 2,4-D in addition to other osmotic stressors to further stimulate the production of anthocyanins in *B. gardneriana* callus.

Keywords: Murici, Secondary metabolite, Flavonoids, Culture *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

O semiárido brasileiro é caracterizado pela ocorrência do bioma Caatinga, apresentando inúmeras espécies endêmicas (Ferraz et al., 2013). As condições ambientais prevalentes na caatinga como intensa radiação solar, altas temperaturas e baixa umidade, possibilitam a ocorrência de espécies vegetais adaptadas a essas condições (PASSOS et al., 2016) e ricas em metabólitos secundários. Apesar dos metabólitos secundários não participarem diretamente dos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, representam uma interface química entre as plantas produtoras e o ambiente circundante, sendo sua biossíntese frequentemente afetada por condições ambientais (SIMIONE et al., 2013).

Entre os metabólitos secundários de plantas grande importância ecológica e econômica tem sido dada às antocianinas (HAMERSKI et al., 2013). Pertencente à classe dos flavonoides, as antocianinas desempenham diversas funções nas plantas, como atividade antioxidante e proteção à radiação UV; além de participarem de mecanismos reprodutivos, tais como polinização e dispersão de sementes (GÓMEZ-ZELEDÓN & JIMÉNEZ, 2011). Para a indústria alimentícia, as antocianinas representam uma alternativa aos corantes artificiais devido à demanda por produtos naturais e por sua ação antioxidante e anti-inflamatória (HAMERSKI et al., 2013).

A produção comercial de antocianinas tem crescido consideravelmente e a demanda por corantes naturais tem aumentado em média entre 5-15% a cada ano. Como a exploração comercial a partir de plantas em campo depende do ciclo de produção e de espaço para o cultivo, o cultivo *in vitro* de calos e células de plantas tem sido considerado como uma alternativa promissora para a produção em escala comercial de metabólitos secundários (NEPOMUCENO, 2012). Segundo Gómez-Zeledón & Jiménez (2011) diversas pesquisas têm demonstrado o efeito de mudanças nas condições do meio de cultura como a adição de reguladores de crescimento, indutores e estressores para a produção de antocianinas em tecidos vegetais indiferenciados. No entanto, para esses autores, existem muitas limitações na identificação dos estímulos necessários, bem como sua intensidade, para ativar as vias metabólicas.

Representantes do gênero *Byrsonima* apresentam grande potencial para a produção de antocianinas visto que seus frutos contêm naturalmente esse pigmento. O gênero *Byrsonima* é o maior da família Malpighiaceae e agrupa espécies de grande importância medicinal, ornamental e produtoras de frutos comestíveis, além de ser o gênero mais extensivamente estudado (GUILHON-SIMPLICIO & PEREIRA, 2011). Nesse contexto, destaca-se a espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss., nativa e endêmica do Brasil e encontrada na Caatinga (MAMEDE, 2015).

Diante do exposto, este trabalho objetivou estabelecer um protocolo de produção de antocianinas em calos da espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estabelecimento *in vitro* foi realizado a partir de sementes, adotando-se a metodologia descrita por Sá (2015). Após sessenta dias da semeadura as plantas estabelecidas *in vitro* serviram como fonte de explantes foliares, obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta, com aproximadamente 0,5 cm², preservando-se a nervura central e com a região adaxial em contato com o meio de cultura. Esses explantes foram inoculados em tubos de ensaio

contendo 15mL de meio de cultura MS/2 (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 7g L⁻¹ de ágar, acrescidos de 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2µM de ácido naftalenoacético (ANA) para induzir a formação dos calos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento em ausência de luz à 25 ± 3° C.

Para construção da curva de crescimento foi quantificada a matéria fresca dos calos formados a partir do dia “zero” (explantos antes da inoculação) até 91 dias de cultivo, em intervalos de 7 dias, totalizando 13 períodos. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação: $Pf - Pi / Pf \times 100$, onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997). Foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição constituída por três unidades experimentais (três calos).

Para seleção das linhagens celulares com maior produção de antocianinas foram realizados cinco subcultivos, em intervalos de 30 dias, seccionando-se segmentos categorizados em três tipos (coloração rosa, amarela e marrom). Estes foram transferidos para um novo meio de cultura (idêntico ao inicial) e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹. Em cada subcultivo amostras de calos foram coletadas para a obtenção da massa fresca e quantificação do teor de antocianinas.

Para avaliar o efeito do estresse osmótico foram utilizados calos com 30 dias de cultivo transferidos para um novo meio de cultura (MS/2) contendo 87,64mM de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar, 16µM de BAP e 2µM de ANA e suplementado com diferentes concentrações de manitol: 0g L⁻¹(controle), 2,5g L⁻¹, 5,0g L⁻¹, 7,5g L⁻¹, 10,0g L⁻¹. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem à 127°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 3°C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de 40µmol m⁻² s⁻¹. Transcorridos 30 dias nestas condições, amostras de calos foram coletadas para a obtenção da massa fresca e quantificação do teor de antocianinas.

Para avaliar o efeito da interação entre os reguladores vegetais BAP e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), calos com 30 dias de cultivo foram transferidos para um novo meio de cultura (MS/2) contendo 87,64mM de sacarose e 7g L⁻¹ de ágar. O meio de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32µM) e 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0, 10,0 e 20,0µM) em esquema fatorial, totalizando 25 tratamentos. O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem à 127°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento. Transcorrido esse período nestas condições, os calos tiveram a massa fresca e o teor de antocianinas quantificados.

A extração e quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva (1996) e analisadas em espectrofotômetro UV/VIS (FemScan 800XI[®]), efetuando-se leituras em comprimento de onda de 535nm. O conteúdo total de antocianinas foi expresso em mg de antocianinas/100g da amostra de calo analisada.

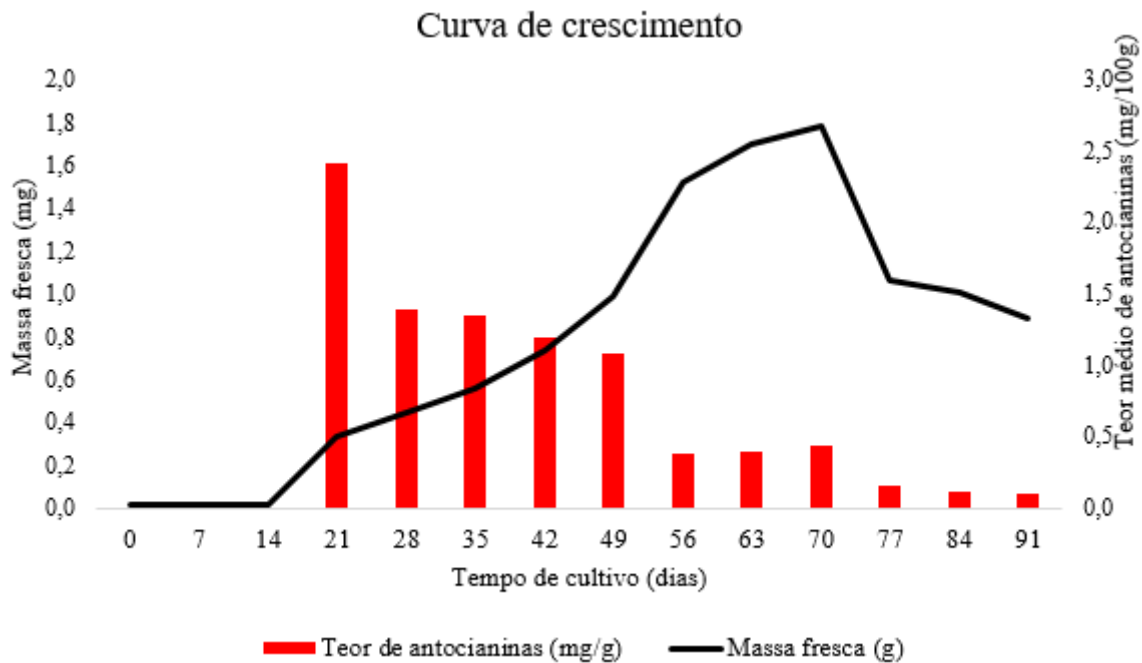
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, avaliando-se três repetições, sendo cada repetição constituída de três unidades experimentais (3 calos), totalizando nove calos por tratamento. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Os dados obtidos através da relação entre massa fresca e teor de antocianinas foram avaliados utilizando-se recursos da estatística descritiva com o auxílio do programa R-3.3.1. Para a avaliação da curva de crescimento os dados foram ajustados ao modelo de transformação quadrática e submetidos à análise de variância. Os demais dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Apenas para o experimento com reguladores vegetais os pressupostos de homogeneidade e de normalidade dos dados não foram atendidos, adotando-se, para tanto, testes não paramétricos. O nível de significância de 5% foi adotado para todas as comparações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A curva de crescimento dos calos apresentou padrão sigmoidal, evidenciando cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e declínio (Figura 1). A fase lag, também conhecida como fase produtora de energia, é caracterizada pelo período de adaptação do explante ao meio de cultura no qual praticamente não há aumento do número de células, ocorre o início da mobilização de metabólitos e a síntese de proteínas sem qualquer divisão celular (GUERRA & NODARI, 2006). Para *B. gardneriana* essa fase ocorreu ao longo dos primeiros 14 dias de incubação, enquanto que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre o 14^o e o 21^o dia. A fase de crescimento exponencial é caracterizada por intensa divisão celular e rápido aumento no número de células, seguida da fase de crescimento linear, observada entre o 21^o e o 56^o dia de cultivo, sendo esta a fase mais longa, onde o ciclo celular é ativo, porém ocorre a redução no ganho de massa celular (GUERRA & NODARI, 2006). Após a fase linear os calos entraram na fase de desaceleração, com posterior declínio. Ao entrar na fase de declínio, os calos apresentaram coloração marrom, com regiões oxidadas, além da redução da massa fresca e dos níveis de antocianinas.

Figura 1: Curva de crescimento e produção de antocianinas em calos formados a partir de explantes foliares de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA). Feira de Santana, 2018.



Embora a cobertura total dos explantes por calo tenha sido atingida apenas aos 35 dias de cultivo, aos 21 dias já foi possível a quantificação de antocianinas, mesmo com a formação parcial dos calos. Nesta fase, apesar de os calos apresentarem tecidos ainda jovens, obteve-se os melhores níveis do pigmento (Figura 1). Os calos mais jovens, observados desde o início do cultivo até a fase linear, apresentaram coloração amarela com regiões rosa e textura compacta. Durante este período foram obtidos os maiores níveis de antocianinas (variando de 2,4163 mg/100g aos 21 dias a 1,0737mg/100g aos 49 dias), sendo o período mais adequado para seleção de células visando à obtenção de linhagens uniformemente coradas. A partir do final da fase linear os calos apresentaram coloração marrom e textura friável. Os calos friáveis possuem alta taxa de divisão celular, são mais instáveis geneticamente e são tipicamente compostos por células de variados tamanhos, tipos e formas.

Para calos de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC., descrito por Chiavegatto (2014), a fase lag ocorreu até o 30º dia de inoculação, seguida da fase exponencial que se estendeu até o 70º dia. Houve uma redução no crescimento entre 50º e 60º dia de cultivo, seguido de intensa divisão celular entre 60º e 70º dias. A fase linear foi observada entre o 71º e o 100º dia de cultivo. Não foram observadas as fases estacionárias e de desaceleração, logo os calos entraram em declínio a partir do 101º dia de cultivo. Quanto a coloração, os calos mostraram-se verde na fase lag até o 20º dia de cultivo e coloração amarela aos 30 dias. Na fase exponencial, de crescimento linear e de declínio os calos apresentaram

coloração amarela e consistência friável, porém a partir do 60º dia, ainda na fase exponencial, apresentaram sinais de oxidação, o que se intensificou na fase de declínio.

Nogueira et al. (2008) estudando a produção de taninos em calos obtidos de explantes foliares de *Byrsonima intermedia* A. Juss. verificaram diferenças consideráveis no teor desse composto entre as fases linear e estacionária, quando o teor reduziu de 0,142% para 0,133%, demonstrando que os níveis de metabólitos podem variar de acordo com a fase de desenvolvimento do calo.

A importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos está na determinação do momento ideal de repicagem para um novo meio de cultura e na possibilidade da sua utilização em suspensões celulares. A repicagem dos calos para novo meio de cultura deve ser realizada antes do final da fase linear de crescimento, quando as células ainda estão em divisão, e tem por finalidade manter as culturas, podendo ser realizados sucessivos subcultivos.

A seleção de tecidos nos calos possibilitou a separação de três linhagens celulares, distinguíveis inicialmente pela coloração: rosa, amarela e marrom. Os calos obtidos durante os cinco ciclos de seleção foram friáveis, com crescimento celular e produção de antocianinas variando em função da linhagem celular e do ciclo de seleção. Foram verificadas diferenças significativas para o teor de antocianinas entre a linhagem rosa e as demais linhagens, nos três primeiros ciclos de cultivo, enquanto que entre as linhagens amarela e marrom foram detectadas diferenças apenas no segundo e terceiro ciclo (Tabela 1). Na comparação, dentro de cada linhagem e nos diferentes ciclos de cultivo, verificou-se que a linhagem rosa apresentou o maior teor de antocianina no segundo ciclo (4,6028 mg/100g), demonstrando ser a linhagem mais produtiva para esse pigmento.

A partir do terceiro ciclo de seleção a linhagem de calos marrom não apresentou viabilidade para seguir com os ensaios, razão pela qual não foram avaliados os teores de antocianina e massa fresca no quarto e quinto ciclo de seleção para esta linhagem. No quinto ciclo as linhagens de calos de coloração rosa e amarelo se apresentaram bastante oxidados, com inibição do crescimento celular, evidenciado pela redução da massa fresca, o que indica que nos sucessivos subcultivos ocorreu a perda da viabilidade do material vegetal. Para Nogueira et al. (2008) o cultivo de calos por período superior a cinco repicagens induz à formação de variações morfológicas e fisiológicas, o que, em geral, reduz a viabilidade dos mesmos.

Comportamento semelhante aos resultados obtidos com *B. gardneriana* foi observado por Lima et al. (2014) em calos de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae), verificando uma redução no teor de antocianinas ao longo de sete subcultivos, assim como mudanças na coloração dos calos, passando de avermelhado (predominância de antocianinas) para esverdeado (predominância de clorofila). Os

autores descreveram ainda a mudança na textura dos calos, passando de friáveis nos primeiros subcultivos à compactos no final do experimento.

Os resultados obtidos demonstram que a produção de antocianinas não é uma característica estável dentro de cada linhagem de células, o que levou ao declínio no teor do pigmento ao longo dos ciclos de seleção. Esta instabilidade já foi retratada em diversos estudos (CHOI & PARK, 1997; FUMAGALI, 2008; ANANGA et al., 2013; LIMA et al., 2014) e reflete o processo de diferenciação celular no tecido ou a perda da capacidade produtiva em função de variações genéticas e epigenéticas. Realmente, as culturas de células de plantas em geral são heterogêneas, nas quais as características morfológicas e fisiológicas das células apresentam diferenças. Entretanto, as diferentes células de um calo estão em processo de diferenciação e especialização, o que implica que nem sempre a simples seleção garante a estabilidade de uma determinada linhagem. Contudo, a identificação de linhagens celulares com alta produtividade de metabólitos, através da seleção de pequenos agregados celulares pode ser amplamente empregada na obtenção de culturas mais produtivas em metabólitos de interesse.

Tabela 1: Coloração, massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmentos de folhas de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2 μ M de ácido naftalenoacético (ANA), ao final de 5 ciclos de cultivo em intervalos de 30 dias. Feira de Santana, 2018.

Ciclo	Linhagem	Cor	Massa fresca (mg)*	Teor médio de antocianinas (mg/100g)
1º ciclo	A	Rosa	0,2580	4,4576 ^{A b}
	B	Amarelo	0,3188	4,0732 ^{B a}
	C	Marrom	0,4644	4,1300 ^{B a}
2º ciclo	A	Rosa	1,9916	4,6028 ^{A a}
	B	Amarelo	2,2174	2,6295 ^{B b}
	C	Marrom	1,0944	2,0089 ^{C b}
3º ciclo	A	Rosa	1,9588	3,8130 ^{A c}
	B	Amarelo	1,7279	0,6959 ^{C c}
	C	Marrom	0,4549	1,0395 ^{B c}
4º ciclo	A	Rosa	1,1448	3,2324
	B	Amarelo	1,4667	0,5900
5º ciclo	A	Rosa	0,6573	2,4081
	B	Amarelo	1,1802	0,4262

Médias obtidas pelo teste de Tukey à 5% de significância. As letras maiúsculas correspondem às diferenças significativas dentro de cada ciclo, enquanto que as letras minúsculas fazem a comparação das médias de cada linhagem em cada um dos ciclos. *Para massa fresca, não houve diferenças significativas.

Os calos submetidos ao estresse osmótico pela adição de manitol ao meio de cultura apresentaram coloração variando entre amarelo e marrom com regiões rosa e textura friável. A adição de manitol ao meio de cultura em concentrações de 2,5g L⁻¹ e 5,0g L⁻¹ promoveram o aumento na produção de antocianinas, evidenciando que a biossíntese desse pigmento foi estimulada pela redução

da disponibilidade de água no meio (Tabela 2). Em concentrações maiores do agente osmótico (7,5 e 10g L⁻¹), no entanto, foi observada a redução do pigmento. Já para a massa fresca dos calos não se detectou diferenças significativas, demonstrando que o aumento do potencial osmótico do meio de cultura afetou o metabolismo do pigmento, mas não afetou o ciclo e o crescimento celular. O uso de agentes osmóticos no meio de cultura promove redução do metabolismo, pois reduzem o potencial hídrico do meio de cultura, inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante e, conseqüentemente, agem sobre o crescimento e o metabolismo celular (LÉDO et al., 2007).

As antocianinas são comumente relatadas como sendo induzidas pelo estresse abiótico. No entanto, o nível de estresse necessário para estimular a produção de antocianinas para diferentes fatores é desconhecido (KOVINICH et al., 2014) e podem variar entre as espécies. Suan See et al. (2011) cultivaram calos de *Melastoma malabathricum* L. (Melastomataceae) em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose, o que resultou no aumento da produção de biomassa celular e na concentração de antocianinas. As células de *M. malabathricum* cultivadas em meio de cultura suplementado com 45g L⁻¹ de sacarose produziram o maior teor do pigmento. Já Kielkowska (2017) estudando o cultivo *in vitro* de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. (Liliaceae), verificaram redução no teor de antocianinas quando submetidas a diferentes concentrações de sorbitol (18,2; 36,4 e 65,5g L⁻¹), corroborando os resultados encontrados em *B. gardneriana*.

Tabela 2: Massa fresca e teor de antocianinas em calos obtidos a partir de segmento foliar *Byrsonima gardneriana* A. Juss. cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com 16µM de 6-benzilaminopurina (BAP) + 2µM de ácido naftalenoacético (ANA), acrescidos de diferentes concentrações de manitol. Feira de Santana, 2018.

Manitol (g L ⁻¹)	Massa fresca (g)*	Teor de antocianinas (mg/100g)
Controle (0,0)	2,0466	1,2022 ^C
2,5	2,1397	1,4410 ^B
5,0	1,4485	2,1687 ^A
7,5	2,0377	0,8335 ^D
10,0	1,5908	1,1231 ^C

Médias de teor de antocianinas obtidas pelo teste de Tukey à 5% de significância. As letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tratamentos. *Não houve diferenças significativas.

Os calos submetidos ao meio de cultura com diferentes concentrações de BAP e 2,4-D apresentaram textura compacta, enquanto a coloração variou com os tratamentos. Em ausência de 2,4-D ou em concentrações mais baixas desse regulador vegetal (2,5µM) os calos apresentaram coloração rosa intenso uniformemente distribuído em toda massa do calo. Com o aumento das concentrações de 2,4-D os calos apresentaram coloração amarela com algumas regiões rosadas. Não houve diferenças significativas para a massa fresca dos calos entre os diferentes tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Coloração, massa fresca e teor de antocianinas em calos de calos *Byrsonima gardneriana* A. Juss. obtidos a partir de segmento foliar cultivados em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético). Feira de Santana, 2018.

Tratamento	BAP (μM)	2,4-D (μM)	Coloração	MF*	Teor de médio de antocianinas (mg/100g)**
T1	0,0	0,0	Rosa	0,5939	16,1364
T2	4,0	0,0	Rosa	1,4464	11,2504
T3	8,0	0,0	Rosa	1,3362	12,0545
T4	16,0	0,0	Rosa	0,8742	10,6853
T5	32,0	0,0	Rosa	0,3785	10,0260
T6	0,0	2,5	Amarelo + rosa	2,7841	5,8056
T7	4,0	2,5	Rosa	0,6677	23,5440
T8	8,0	2,5	Rosa	0,5152	40,3591
T9	16,0	2,5	Rosa	0,2869	28,9567
T10	32,0	2,5	Rosa	0,3508	27,7190
T11	0,0	5,0	Amarelo + rosa	1,6336	6,5090
T12	4,0	5,0	Amarelo + rosa	0,4247	13,2067
T13	8,0	5,0	Amarelo + rosa	0,3933	14,5887
T14	16,0	5,0	Amarelo + rosa	0,4478	8,2475
T15	32,0	5,0	Amarelo + rosa	0,6713	7,2425
T16	0,0	10,0	Amarelo + rosa	0,9219	7,5124
T17	4,0	10,0	Amarelo + rosa	0,5178	13,6979
T18	8,0	10,0	Amarelo + rosa	0,3787	13,6683
T19	16,0	10,0	Amarelo + rosa	0,2869	16,4236
T20	32,0	10,0	Amarelo + rosa	0,3131	10,5222
T21	0,0	20,0	Amarelo + rosa	0,4004	12,6575
T22	4,0	20,0	Amarelo + rosa	0,4176	19,6217
T23	8,0	20,0	Amarelo + rosa	0,3180	58,5118
T24	16,0	20,0	Amarelo + rosa	0,3236	21,6288
T25	32,0	20,0	Marrom	0,3302	28,2043

*A massa fresca não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. **Os dados não atenderam aos pressupostos de homogeneidade e normalidade, até mesmo após transformações dos dados e aplicação de testes não paramétricos, não sendo aplicado o teste de médias.

Mesmo não sendo detectados efeitos significativos pelo teste de média adotado, pode-se observar que a presença do BAP foi um importante estimulador para o biossintese das antocianinas, já que na ausência desse regulador os níveis foram sempre baixos. Já na ausência de 2,4-D os melhores resultados foram obtidos com as maiores concentrações de BAP (32 μM), porém, a interação entre os reguladores apresentou efeito positivo e a presença da auxina 2,4-D mostrou-se eficiente quando utilizada nas concentrações de 2,5 μM e 20 μM . Os calos do tratamento controle apresentaram uma produção média de antocianinas de 16,1364mg/100g, enquanto que os calos submetidos à 8,0 μM de BAP e 20 μM de 2,4-D produziram 58,5118 mg/100g, o que representa um aumento de 362% na produção do pigmento.

Corroborando esses resultados, um notável aumento na concentração de antocianinas foi observado em calos de *Crataegus sinaica* Boiss (Rosaceae) obtidos a partir de caule (0,1580mg/100g, 11,79 vezes maior que o controle) e de folha (0,1480 μg /100g) quando o meio de cultura continha 2mg L⁻¹ de BAP e 1mg L⁻¹ de ANA (MAHARIK et al., 2009). Para esta espécie, a adição de ANA na cultura

não afetou a produção de antocianinas, até mesmo quando combinado com cinetina, mas está relacionada ao aumento da massa do calo.

Dios-López et al. (2011) avaliou diferentes reguladores vegetais na indução da produção de antocianinas em calos e suspensão celular obtidos a partir de segmento foliar de três variedades de *Hibiscus sabdariffa* L. (China, Reyna e branca), assim como a massa fresca e seca. A presença de cinetina promoveu o crescimento celular, mas não influenciou o acúmulo de antocianinas, sendo uma relação inversamente proporcional (taxa de crescimento celular X produção de antocianinas). A auxina ANA não mostrou qualquer efeito sobre a síntese de antocianinas ou de fenólicos totais nas três variedades estudadas, enquanto que 2,4-D aumentou entre 60 e 70% o conteúdo de compostos fenólicos nas linhas celulares das variedades China e Reyna.

Pandey et al. (2015) cultivaram calos obtidos a partir de raiz principal e folhas de plântulas de *Daucus carota* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS. O crescimento máximo de calos foi observado no tratamento em que foi utilizado 3mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,2mg L⁻¹ cinetina, enquanto combinações de AIA (ácido 3-indolacético) e cinetina promoveram menor crescimento de calos. Quanto à produção de antocianinas, o estudo constatou que a cinetina isoladamente não influenciou a produção de antocianinas, enquanto que a combinação de auxina AIA e cinetina (3,0mg L⁻¹ e 0,2mg L⁻¹, respectivamente) levou à produção máxima do pigmento.

Deste modo, percebe-se que a interação entre auxinas e citocininas é essencial para assegurar o crescimento e determinar os níveis de metabólitos secundários produzidos pelas células cultivadas *in vitro*. Contudo, o efeito dos reguladores vegetais deve ser avaliado experimentalmente para cada espécie (ANANGA et al., 2013). Por essa razão, não há um protocolo específico para produção de antocianinas *in vitro*, devido à grande variabilidade de respostas entre diferentes espécies de plantas, porém há uma tendência geral da combinação de citocinina e auxina (MAHARIK et al., 2009).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É admissível a produção de antocianinas a partir de calos da espécie *Byrsonima gardneriana* A. Juss.; a produção desse pigmento é afetada pelo estágio de desenvolvimento do calo; a seleção de linhagens celulares nos calos, a partir da coloração, não é uma metodologia eficiente para a obtenção de linhagens celulares mais produtivas em antocianinas para esta espécie; concentrações de manitol até 5g L⁻¹ são eficientes na estimulação da produção de antocianinas em calos da espécie; apesar da tendência de maior produção desse pigmento em calos cultivados na presença de BAP associado a 2,4-D, novos estudos devem ser conduzidos buscando-se um melhor entendimento do efeito dos

reguladores vegetais, assim como de agentes que promovam o estresse osmótico na estimulação da produção desse pigmento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e à FAPESB pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B. & TSOLOVA, V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *The Mediterranean Genetic Code-Grapevine and Olive*, p. 247-287, 2013.

CHIAVEGATTO, R. B. Viabilidade celular, índice mitótico e ultraestrutura de calos de *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada - Sistemática Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2014.

CHOI, M. S. & PARK, Y. G. Selection of a high anthocyanin-producing cell line from callus cultures of hybrid poplar (*Populus alba* L. x *P. glandulosa* Uyeki). *International Journal of Forest Genetics*, v. 4, n. 4, p. 253-257, 1997.

DIOS-LÓPEZ, A. D.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E.; ANDRADE-GONZÁLEZ, I. & GÓMEZ-LEYVA, J. F. Inducción de antocianinas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Chapingo. Serie Horticultura*, v. 17, n. 2, p. 77-87, 2011.

FERRAZ, R. C.; DE MELLO, A. A.; FERREIRA, R. A. & PRATA, A. P. D. N. Levantamento fitossociológico em área de Caatinga no monumento natural Grota do Angico, Sergipe, Brasil. *Revista Caatinga*, v. 26, n. 3, p. 89-98, 2013.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. D. F. P. S.; VIDOTI, G. J. & OLIVEIRA, A. J. B. D. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GUILHON-SIMPLICIO, F. & PEREIRA, M. D. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

GÓMEZ-ZELEDÓN, J. & JIMÉNEZ, V. M. Producción in vitro de antocianinas-revisión. *Acta Biológica Colombiana*, v. 16, n. 1, p. 3, 2011.

GUERRA, M. P. & NODARI, R. O. Material didático de apoio à disciplina de Biotecnologia. Santa Catarina. 2006.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; DA SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

KIELKOWSKA, A. *Allium cepa* root meristem cells under osmotic (sorbitol) and salt (NaCl) stress in vitro. *Acta Botânica Croatica*, v. 76, n. 2, p. 146-153, 2017.

KOVINICH, N.; KAYANJA, G.; CHANOCA, A.; RIEDL, K.; OTEGUI, M. S.; GROTEWOLD, E. Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in *Arabidopsis*. *Planta*, v. 240, n. 5, p. 931-940, 2014.

LAMEIRA, O. A. Propagação in vitro e in vivo, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonoides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.). 1997. 88p. Tese doutorado. UFLA – Lavras. 1997.

LÉDO, A. da S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e do manitol na conservação in vitro por crescimento lento de coqueiro anão. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 04, p. 346-351, 2007.

LIMA, M. R.; SANTOS, P. D. A.; SILVEIRA, C. E. S.; PALHARES, D.; PEREIRA, L. A. R. In vitro cultivation of *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 2, p. 462-466, 2014.

MAHARIK, N.; ELGENGAIHI, S.; TAHA, H. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Boiss. *Int J Acad Res*, v. 1, n. 1, p. 30-34, 2009.

MAMEDE, M. C. H. Gênero *Byrsonima*. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8827>>. Acesso em: 03 mai. 2017.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 493-497, 1962.

NEPOMUCENO, C. F. Propagação e conservação in vitro de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE. 2012. 179f. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 2012.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; CASTRO, A. H. F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Lavras, Minas Gerais, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

PANDEY, A.; RATHORE, D. K. S.; PATHAKAR, A. Production of secondary metabolite (anthocyanin) from callus culture of *Daucus Carota*. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, Issue 5, volume 2, 2015.

PASSOS, D. C.; MESQUITA, P. C. M. D.; BORGES-NOJOSA, D. M. Diversity and seasonal dynamic of a lizard assemblage in a Neotropical semiarid habitat. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, Taylor & Francis, v. 51, n. 1, p. 19 – 28, 2016.

SÁ, F. S. Potencial micropropagativo e conservação in vitro de *Byrsonima gardneriana* A. Juss. 2015. 81f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal - Universidade do Estado da Bahia. Paulo Afonso-Ba. 2015.

SILVA, R. S. Extração e estabilidade de pigmentos antociânicos de frutos de Maria-Pretinha (*Solanum americanum* Mili.). Tese de Mestrado. 1996. 76 f. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1996.

SIMIONI, R. E. Contribuição ao conhecimento químico dos Metabólitos Secundários de três espécies *Baccharis* da seção *Cylindricae*: *Baccharis pentodonta*, *Baccharis tridentata* e *Baccharis rufescens*.

2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

SUAN SEE, K.; BHATT, A.; LAI KENG, C. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae). *Revista de Biología Tropical*, v. 59, n. 2, p. 597-606, 2011.