

CULTURA DE TECIDOS DE *SMILAX JAPECANGA* GRISEBACH: INDUÇÃO E CRESCIMENTO DE CALOS

Tissue culture of Smilax japecanga Grisebach: callus induction and growth

MAURÍCIO R. A. SANTOS*
RENATO PAIVA**
ABDELLATIF K. BENBADIS***

RESUMO

Smilax japecanga Grisebach é uma espécie herbácea, nativa do Brasil, cujos rizomas são utilizados na medicina popular como depurativo. Suspensões celulares, estabelecidas a partir de calos em fase de desaceleração do crescimento, constituem alternativa viável de material vegetal para a obtenção de princípios ativos medicinais. Objetivando um melhor aproveitamento das plantas de *S. japecanga*, procedeu-se à indução de calos a partir de segmentos de explantes de rizomas e ao estudo de seu crescimento. Os segmentos de rizomas foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG²¹), suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0, 0,5 e 2,0 mg/l), Thidiazuron (TDZ) (0, 0,5 e 2,0 mg/l) e 6-benzilaminopurina (BAP) (0 e 0,5 mg/l), em arranjo fatorial, totalizando 18 tratamentos. Em todos os tratamentos, foi determinada a produção de matérias fresca e seca a cada três dias. Evidenciou-se a necessidade da utilização de reguladores de crescimento na formação de calos, sendo que as maiores porcentagens de calogênese observadas foram: 83,3% (0,5 mg/l de 2,4-D + 2,0 mg/l de TDZ + 0,5 mg/l de BAP), 75,0% (2,0 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de TDZ) e 75,0% (0,5 mg/l de cada um dos reguladores). Nos demais tratamentos, menos que 60% dos explantes formaram calo. Os calos formados tiveram curvas de crescimento de padrão sigmóide, com a fase de desaceleração entre o 27º e o 35º dias de cultivo, período em que devem ser repicados para meio fresco.

PALAVRAS-CHAVE: *Smilax japecanga*, planta medicinal, crescimento de calos.

SUMMARY

Smilax japecanga Grisebach is a native brazilian species whose rhizomes are used as depurative in popular medicine. Cell suspensions, developed from callus in deceleration phase of growth, can be an important source of plant material for the production of medicinal compounds. To make better use of *S. japecanga* plants, callus tissue was developed from rhizome explants and its growth was followed. Rhizome sections were placed on a MS (MURASHIGE & SKOOG²¹) medium supplemented by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0, 0.5, and 2.0 mg/l), Thidiazuron (TDZ) (0, 0.5, and 2.0 mg/l) and 6-benzylaminopurine (BAP) (0 and 0.5 mg/l). The treatments consisted of all possible combinations of growth regulator concentrations (3 x 3 x 2 factorial experiment). Fresh and dry callus weight were obtained at three-day intervals. Callus production required the addition of growth regulators. Highest proportions of callus production were: 83.3% (0.5 mg/l of 2,4-D + 2.0 mg/l of TDZ + 0.5 mg/l of BAP), 75.0% (2.0 mg/l of 2,4-D + 0.5 mg/l of TDZ), and 75.0% (0.5 mg/l of each regulator). Less than 60.0% of the explants formed callus in response to the other treatments. Growth of calluses followed a sigmoidal pattern with the deceleration phase occurring between the 27th to 30th day of culture. This is the appropriate period for transferring the callus to a fresh medium.

KEY-WORDS: *Smilax japecanga*, medicinal plant, callus growth.

* Doutorando em Agronomia/Fitotecnia na Universidade Federal do Ceará

** Professor Adjunto do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras

*** Professor Visitante do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará

INTRODUÇÃO

Smilax japecanga Grisebach. (Liliaceae) é uma planta nativa do Brasil, encontrada em todos os Estados, muito conhecida graças ao seu grande valor terapêutico, circunstância esta que, desde séculos, lhe tem reservado lugar de merecido destaque na medicina popular (MATOS¹⁶). Outras espécies do gênero *Smilax* são usadas na medicina popular, em países como a China, Coréia e Japão, como por exemplo: *S. riparia* e *S. china* são conhecidas por apresentarem propriedades anti-inflamatórias e diuréticas (SASHIDA *et al.*²⁶); *S. menispermoidea* e *S. lebrunii* são desintoxicantes e anti-cancerígenas (JU *et al.*¹⁴; JU & JIA¹³); *S. sieboldii* é usada em artrites e tumores (WOO *et al.*³²); e *S. macrophylla* é recomendada no tratamento de doenças venéreas (DAULATABAD *et al.*⁹). Na Guatemala, *S. lundellii* é conhecida como anti-diarréica (CÁCERES *et al.*⁶). No Brasil, são conhecidas: *S. officinalis*, ou salsaparrilha, usada no tratamento de gota (BERNARDO *et al.*⁵) e *S. japecanga*, que é muito usada como medicamento caseiro, nos casos de sífilis, gota, reumatismos, dermatoses (LORENZI¹⁵) e, também, como febrífugo e diurético (BALBACH³), sendo o rizoma a parte utilizada na forma de chá (FONT QUER¹¹; BALBACH³).

O interesse crescente por compostos naturais, principalmente de aplicação farmacêutica, e as dificuldades já conhecidas para assegurar o fornecimento constante de plantas, têm estimulado a investigação do potencial de culturas celulares *in vitro* como alternativa para a produção de metabólitos secundários (GRATTAPAGLIA & MACHADO¹²). Estas cul-

turas são estabelecidas a partir de calos os quais devem estar na fase de desaceleração do crescimento (ALFERMANN & PETERSEN¹). Não se tem registro do desenvolvimento de técnicas de produção de suspensões celulares em *S. japecanga*.

O presente trabalho teve como objetivo a indução de calos, obtidos de rizomas de *S. japecanga*, e determinação de seu padrão de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Rizomas de *S. japecanga* foram obtidos de plantas localizadas no reservatório hidrelétrico de Camargos, em Itutinga – MG. Os rizomas foram coletados e levados ao Laboratório de Propagação de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – MG. As porções internas dos rizomas foram seccionadas em partes de aproximadamente 1 cm³ e submetidas, em câmara de fluxo laminar, à desinfestação através da lavagem por fricção com detergente por 10 minutos, seguida de imersão em álcool 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 50% por 20 minutos. Estes segmentos foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG²¹), pH 5,8, suplementado ou não com reguladores de crescimento (Tabela 1). Após a inoculação, os tubos foram mantidos em sala de crescimento, no escuro, à temperatura de 26 ± 2°C, por um período de 30 dias, durante o qual observou-se a indução de calogênese nos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com um explante/tubo e 24 tubos por tratamento.

TABELA 1: Concentrações de 2,4-D, TDZ e BAP

Tratamento	2,4-D (mg/L)	TDZ (mg/L)	BAP (mg/L)
1	0,0	0,0	0,0
2	0,5	0,0	0,0
3	2,0	0,0	0,0
4	0,0	0,5	0,0
5	0,5	0,5	0,0
6	2,0	0,5	0,0
7	0,0	2,0	0,0
8	0,5	2,0	0,0
9	2,0	2,0	0,0
10	0,0	0,0	0,5
11	0,5	0,0	0,5
12	2,0	0,0	0,5
13	0,0	0,5	0,5
14	0,5	0,5	0,5
15	2,0	0,5	0,5
16	0,0	2,0	0,5
17	0,5	2,0	0,5
18	2,0	2,0	0,5

Para determinação das curvas de crescimento, os calos foram pesados, a intervalos de 3 dias, durante um período de 39 dias. Após a avaliação do peso fresco, os calos foram colocados em estufa, a 45°C, durante 48 horas, quando foi feita a determinação do peso seco. Cada média foi determinada a partir de calos retirados de oito tubos ao acaso e as médias dos pesos fresco e seco comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES²⁴).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, pode-se observar o aspecto visual de um calo formado a partir de explante de rizoma

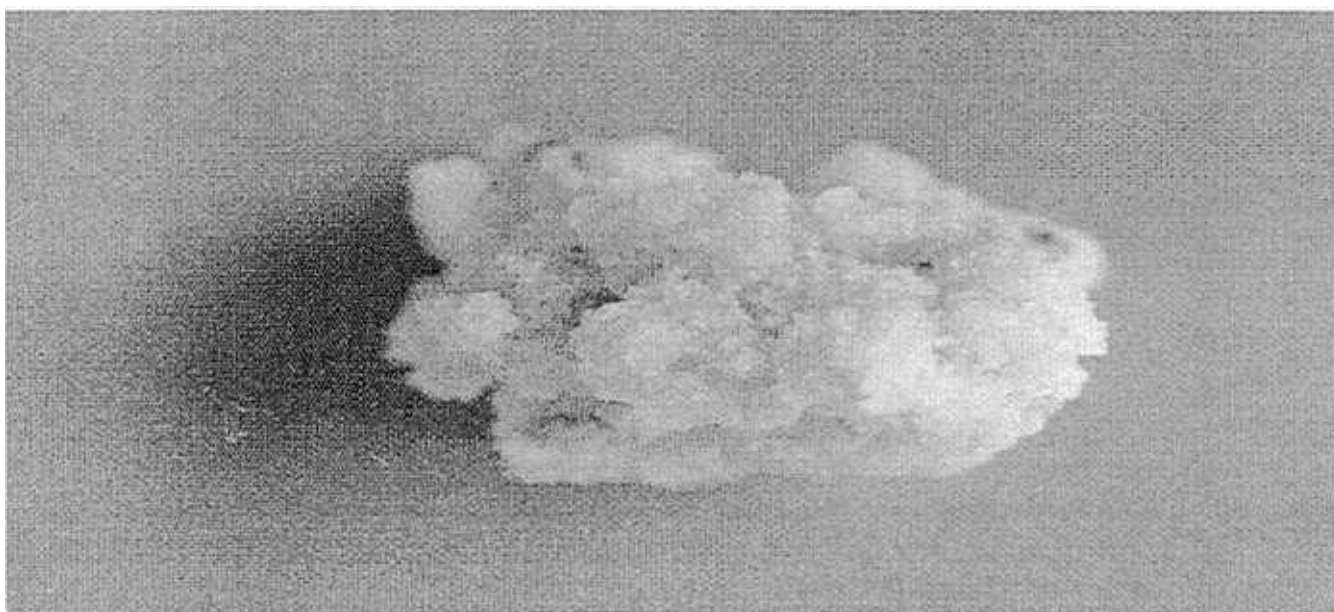


Figura 1: Fotografia mostrando calo formado a partir de explante de rizoma de *Smilax japecanga* Grisebach em meio MS, 30 dias após a inoculação.

Na Figura 2, observa-se que não houve formação de calos na ausência de reguladores de crescimento, evidenciando a necessidade de sua utilização para a indução de calogênese em explantes de rizomas de *S. japecanga*. Em todos os tratamentos em que se obteve porcentagens de calogênese superiores a 50,0%, utilizou-se reguladores de crescimento em combinações. A maior porcentagem de calogênese observada (83,3%) foi obtida com a utilização dos três reguladores de crescimento na combinação de concentrações de: 0,5 mg/l de 2,4-D + 2,0 mg/l de TDZ + 0,5 mg/l de BAP. Além disso, obteve-se 75,0% de calogênese quando se utilizou 0,5 mg/l de cada um dos três reguladores. A mesma porcentagem foi obtida com 2,0 mg/l de 2,4-D e 0,5

de *S. japecanga*. Este calo teve coloração branco-amarelada e consistência friável, sendo esta última característica essencial para a produção de suspensões celulares (DIXON¹⁰; TISSERAT³¹). Os calos produzidos em meios com diferentes reguladores de crescimento, em concentrações variáveis, não diferiram entre si quanto ao aspecto e à friabilidade. Vários autores obtiveram calos friáveis através do uso de 0,5 mg/l de 2,4-D no meio de cultura, sendo que maiores concentrações levaram à formação de raízes, como observado em *Hypericum brasiliense* (CARDOSO & OLIVEIRA⁸), *Artemisia absinthum* L. (NIN *et al.*²²), *A. annua* (PANIEGO & GIULIETTI²³), e *A. pallens* (BENJAMIN *et al.*⁴).

mg/l de TDZ. Estes resultados confirmam a Teoria do Balanço Hormonal (CALDAS *et al.*⁷), segundo a qual a formação de calos é favorecida pela combinação de pelo menos uma auxina e uma citocinina. Porém, duas combinações dos três reguladores resultaram em porcentagens mais baixas. A utilização de 2,0 mg/l de 2,4-D + 2,0 mg/l de TDZ + 0,5 mg/l de BAP resultou em 20,8% de calogênese e a de 2,0 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de TDZ + 0,5 mg/l de BAP, em 16,7%. Outras combinações entre uma auxina e uma citocinina também resultaram em porcentagens relativamente altas de calogênese. Obteve-se 54,2, 50,0 e 45,8% com, respectivamente, 2,0 mg/l de 2,4D + 2,0 mg/l de TDZ, 0,5 mg/l de

2,4-D + 0,5 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l de TDZ. As duas combinações entre as citocininas apresentaram resultados bem distintos.

Observou-se 50,0% de calogênese com 2,0 mg/l de TDZ + 0,5 mg/l de BAP e ausência de indução de calogênese com 0,5 mg/l de cada uma das citocininas.

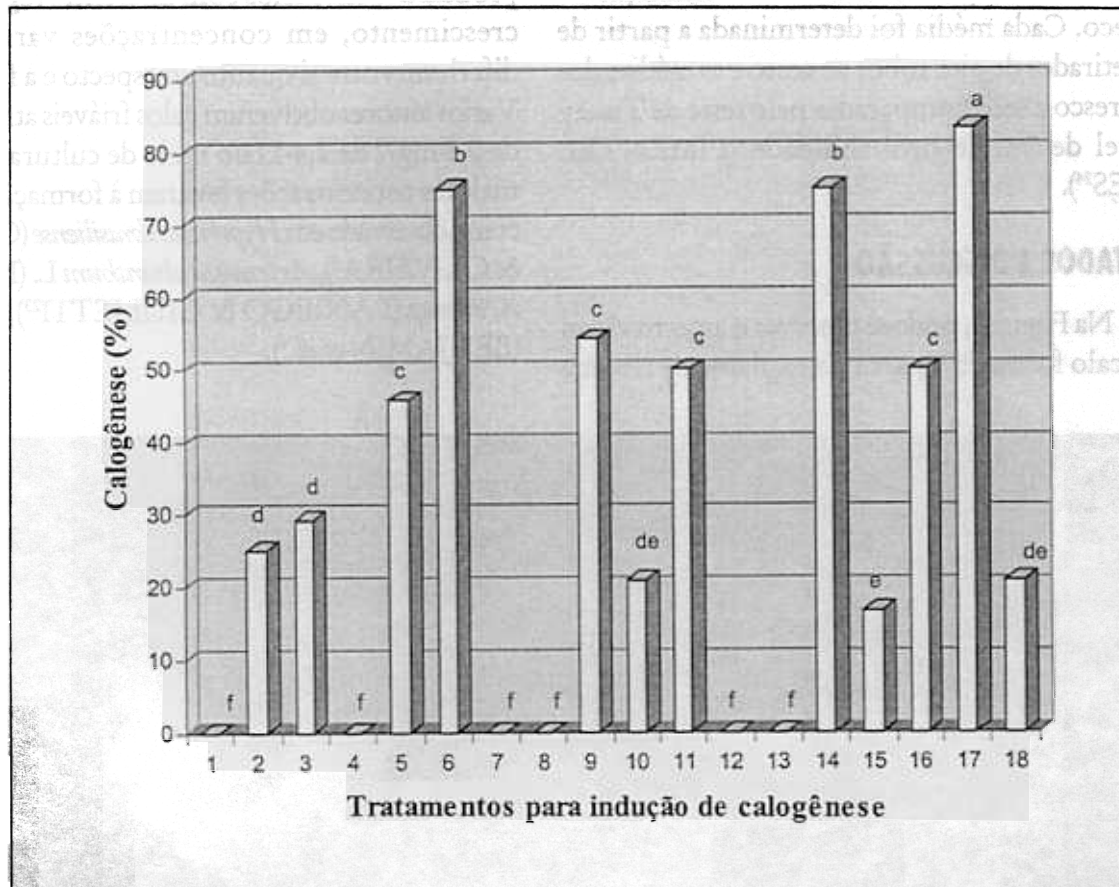


Figura 2: Porcentagens de calogênese obtidas nos tratamentos utilizados para indução de calos em segmentos de rizomas de *Smilax japecanga* Grisebach em relação às concentrações de 2,4-D, TDZ e BAP utilizadas (de acordo com a Tabela 1). Colunas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey.

Observa-se ainda, na Figura 2, que a utilização de TDZ, isoladamente, não induziu a formação de calos. Provavelmente as concentrações utilizadas não foram adequadas, pois este regulador de crescimento tem sido considerado efetivo na indução de calogênese (SANAGO *et al.*²⁵). Além disso, MOK *et al.*¹⁸ afirmaram que o TDZ induz a biossíntese de citocinina endógena, fenômeno explicado na Teoria da Autonomia dos Tecidos Vegetais. Isto já havia sido observado por THOMAS & KATTERMAN³⁰, estudando calos de segmentos de raízes de soja sob dois níveis de TDZ e de ácido naftalenacético (ANA).

Aplicados isoladamente, 2,4-D e BAP determinaram porcentagens baixas de calogênese (Figura 2). As concentrações de 0,5 e 2,0 mg/l de 2,4-D induziram calogênese em, respectivamente, 25,0

e 29,2% dos explantes e a de 0,5 mg/l de BAP, em apenas 20,8%. Resultados obtidos por outros autores indicam a grande variabilidade das respostas de diversas espécies em relação a diferentes concentrações de reguladores de crescimento empregados, isoladamente ou em combinações. MORENO *et al.*¹⁹ obtiveram a indução de calos em segmentos de caules das espécies *Phyllanthus tenellus*, *P. niruri* e *P. corcovadensis* (quebra-pedra) com a concentração de 2,0 mg/l de 2,4-D. ALVES *et al.*², por sua vez, obtiveram a formação de calos em meristema de *Cecropia glaziovii* com a utilização de 10 mg/l de 2,4-D. MORENO *et al.*²⁰ produziram brotações múltiplas em segmentos nodais e apicais de *Phyllanthus carolinensis* inoculados em meio MS acrescido de 0,25 mg/l de BAP. SILVA *et al.*²⁸ testaram

2,4-D e AIB, isoladamente, e combinações de BAP com 2,4-D e AIB em segmentos de caules de *P. urinaria*. Entre as auxinas testadas, o AIB, sem o suplemento de BAP, promoveu o maior crescimento dos calos em todas as concentrações testadas.

As Figuras 3 e 4 mostram as curvas de crescimento de calos de *S. japecanga* (explantes de segmentos de rizomas) obtidas a partir das matérias fresca e seca, respectivamente. Pode-se observar que elas tiveram um padrão sigmóide com cinco fases distintas. Este é o padrão típico de crescimento de calos, variando quanto à duração relativa de cada uma das fases (MISAWA¹⁷). A fase "lag", na qual as células preparam-se para a divisão celular, ocorreu até o 9º dia. SCRAGG & ALLAN²⁷ definem esta fase como produtora de energia. A fase exponencial, na qual ocorre máxima divisão celular, desenvolveu-se do 10º ao 17º dia. Esta fase é também definida por SCRAGG & ALLAN²⁷ como sendo a fase biossintética. A fase

linear, referida por SMITH²⁹ como o período em que o crescimento e o desenvolvimento celular são mais evidentes (reduzindo a divisão celular), ocorreu entre o 18º e o 26º dia. A fase de desaceleração do crescimento dos calos ocorreu entre o 27º e o 35º dia. De acordo com SMITH²⁹, nesta fase as culturas devem ser transferidas para um meio fresco, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e à diminuição de oxigênio no interior das células dos calos. A fase estacionária ocorreu do 36º ao 39º dia. Esta fase é referida por MISAWA¹⁷ como o período no qual o número de células é constante. Durante os 39 dias subsequentes à inoculação, houve um ganho de peso fresco de 43,6% (Figura 3), e de peso seco, de apenas 34,0% (Figura 4), fato indicativo de que grande parte do crescimento observado deveu-se à maior hidratação das células dos calos.

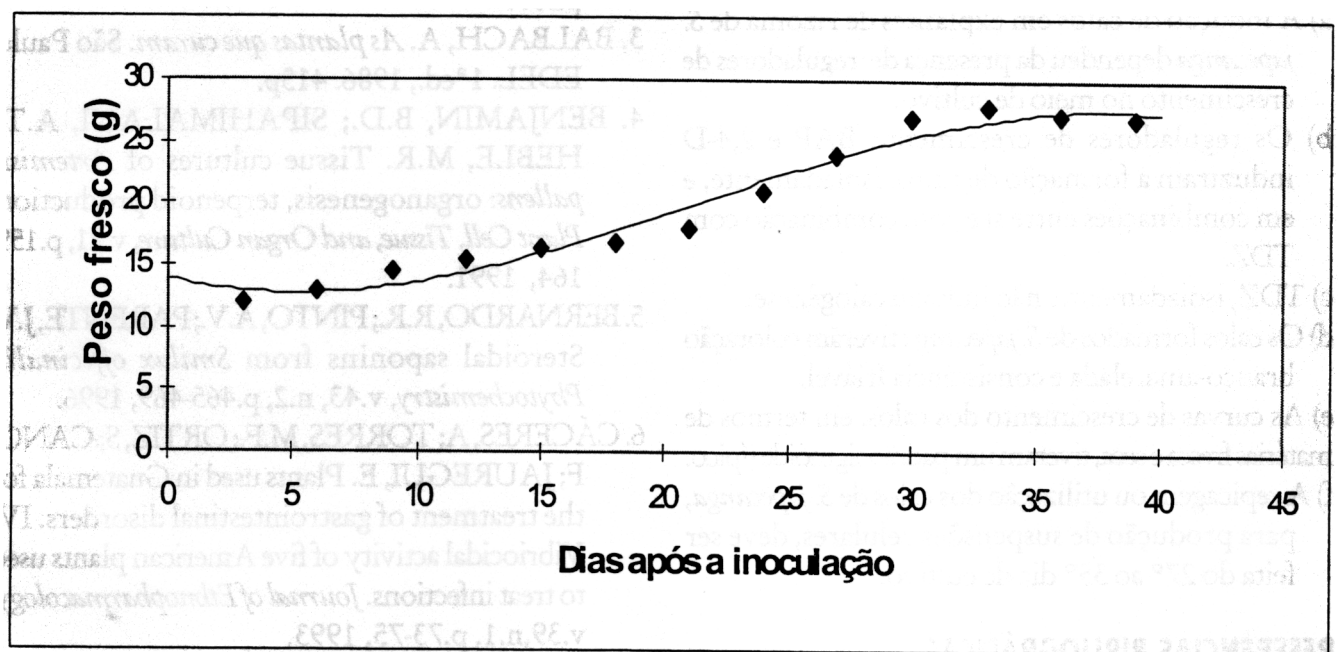


Figura 3: Curva de crescimento de calos de *Smilax japecanga* Grisebach em função do peso fresco e tempo de inoculação.

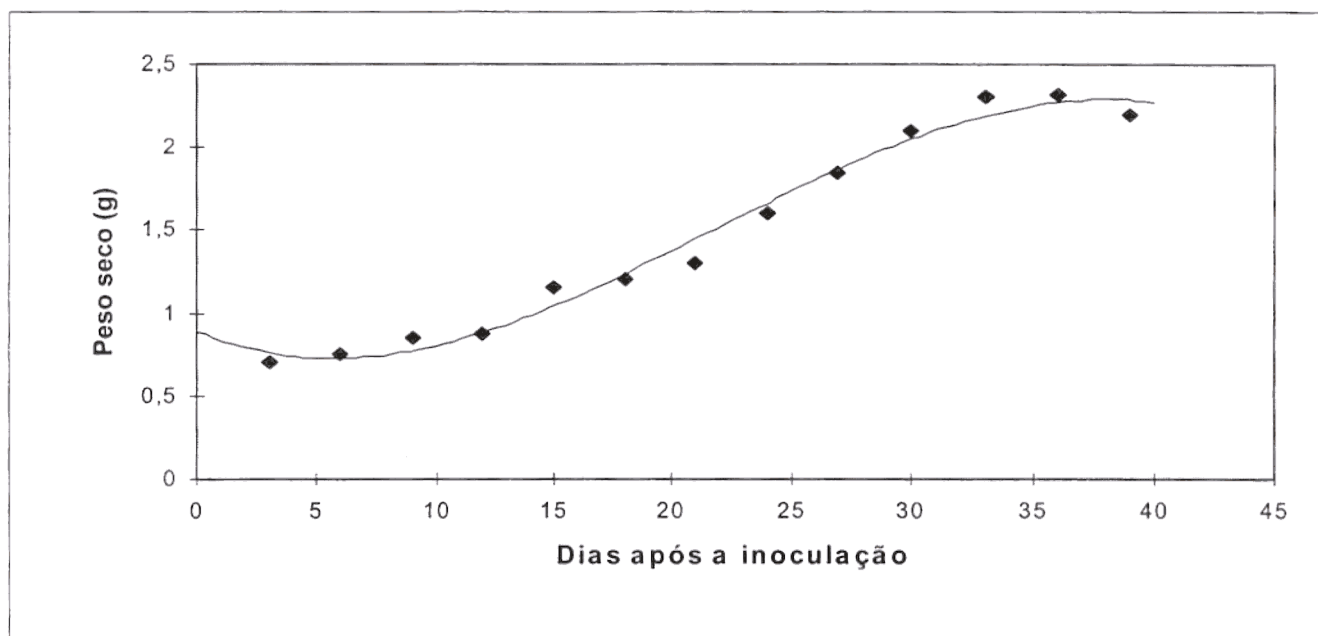


Figura 4: Curva de crescimento de calos de *Smilax japecanga* Grisebach em função do peso seco e tempo de inoculação.

CONCLUSÕES

- A indução de calos em explantes de rizoma de *S. japecanga* dependeu da presença de reguladores de crescimento no meio de cultivo.
- Os reguladores de crescimento BAP e 2,4-D induziram a formação de calos, isoladamente, e em combinações entre si e com combinação com TDZ.
- TDZ, isoladamente, não induziu calogênese.
- Os calos formados de *S. japecanga* tiveram coloração branco-amarelada e consistência friável.
- As curvas de crescimento dos calos, em termos de matérias fresca e seca, tiveram um padrão sigmóide típico.
- A repicagem ou utilização dos calos de *S. japecanga*, para produção de suspensões celulares, deve ser feita do 27° ao 35° dia de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFERMANN, A.W.; PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.43, p.199-205, 1995.
- ALVES, I.N.; PINTO, J.E.B.P.; LADEIRA, A.M.; LAMEIRA, O. Diferentes tipos de explante e reguladores de crescimento na indução de calos em *Cissus sicyoides* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6, 1997. Belém. Anais... Belém: CPATU, 1997. p.559.
- BALBACH, A. *As plantas que curam*. São Paulo: EDEL. 1ªed., 1986. 415p.
- BENJAMIN, B.D.; SIPAHIMALANI, A.T.; HEBLE, M.R. Tissue cultures of *Artemisia pallens*: organogenesis, terpenoid production. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.21, p.159-164, 1991.
- BERNARDO, R.R.; PINTO, A.V.; PARENTE, J.V. Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. *Phytochemistry*, v.43, n.2, p.465-469, 1996.
- CÁCERES, A.; TORRES, M.F.; ORTIZ, S.; CANO, F.; JAUREGUI, E. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. IV. Vibriocidal activity of five American plants used to treat infections. *Journal of Ethnopharmacology*, v.39, n.1, p.73-75, 1993.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.L.; CALDAS, L.S. (eds.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCPT/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.37-69.
- CARDOSO, M.A.; OLIVEIRA, D.E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.44, n.2, p.91-94, 1996.

9. DAULATABAD, C.D.; BHAT, G.G.; JAMKHANDI, A.M. A keto fatty acid from *Smilax macrophylla* seed oil. *Phytochemistry*, v.42, n.3, p.889-890, 1996.
10. DIXON, R.A. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: DIXON, R.A. (ed.), *Plant cell culture – a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.1-20.
11. FONT QUER, P. *Plantas medicinales*. Barcelona: Editorial Labor, 1962. 1033p.
12. GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.99-170.
13. JU, Y.; JIA, Z. Minor steroidal glycosides from the roots of *Smilax lebrunii*. *Phytochemistry*, v.33, n.5, p.1193-1195, 1993.
14. JU, Y.; JIA, Z.; SUN, X. Steroidal saponins from *Smilax menispermoidea* and *S. lebrunii*. *Phytochemistry*, v.37, n.5, p.1433-1436, 1994.
15. LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum. 2ª ed., 1991. 409p.
16. MATOS, F.J.A. *O formulário fitoterápico do Professor Dias da Rocha*. Mossoró: ESAM. v.18, 1987. 222p.
17. MISAWA, M. Introduction. In: MISAWA, M. (ed.) *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites*. Toronto: FAO, 1994. p.1-3.
18. MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin – active phenylurea derivatives in tissue culture systems. *HortScience*, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.
19. MORENO, F.N.; AMARAL, L.V.; VIANA, A.M. Indução de calos “in vitro” em diferentes espécies de *Phyllanthus*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992. Curitiba. Anais... Curitiba: UFPR, 1992. p.220.
20. MORENO, F.N.; MATOS, J.Z.; VIANA, A.M. Cultura “in vitro” de *Phyllanthus carolinensis*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1996. Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC, 1996. p.228.
21. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
22. NIN, S.; MOROSI, E.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. Callus culture of *Artemisia absinthum* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.45, n.1, p.67-72, 1996.
23. PANIEGO, N.B.; GIULIETTI, A.M. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.36, p.163-168, 1994.
24. PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. São Paulo: Nobel, 1986. 430p.
25. SANAGO, M.H.M.; SHATTUCK, V.I.; STROMMER, J. Rapid plant regeneration of pea using thidiazuron. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, v.45, p.165-168, 1996.
26. SASHIDA, Y.; KUBO, S.; MIMAKI, Y.; NIKAIDO, T.; OHMOTO, T. Steroidal saponins from *Smilax riparia* and *S. china*. *Phytochemistry*, v.31, n.7, p.2439-2443, 1992.
27. SCRAGG, A.H.; ALLAN, E.J. *Picrasma quassioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV*. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v.21, p.249-268.
28. SILVA, M.L.B.; MORENO, F.N.; VIANA, A.M. Micropropagação de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1996. Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC, 1996. p.228.
29. SMITH, R.M. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. San Diego: Academic Press, 1992. 71p.
30. THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology*, v.81, n.2, p.681-683, 1986.
31. TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R.A. (ed.). *Plant cell culture, a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985. p.79-105.
32. WOO, H.M.; DO, J.C.; SON, H.K. Five new spirostanol glycosides from the subterranean parts of *Smilax sieboldii*. *Journal of Natural Products*, v.55, n.8, p.1129-1135, 1992.