

ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS DE CALO DE *Cereus peruvianus* IRRADIADOS COM COBALTO-60

Gabriel de Oliveira Correia (PIBIC/CNPq/FA/Uem), João Victor Kuller, Adrieli Rodrigues da Costa Nunes, Claudete Aparecida Mangolim (Orientador), e-mail: mangolimca@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Molecular / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas - Genética Vegetal

Palavras-chave: Mutação induzida, radiação gama, linhagens de células

Resumo:

Para induzir variabilidade genética os calos de *Cereus* foram irradiados com 10, 20, 30, 40, 50 e 60 Gy de Cobalto⁶⁰ (Co⁶⁰) no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA / USP. O objetivo deste estudo foi selecionar setores de calos de *Cereus peruvianus* tratados com diferentes doses desenvolvendo diferentes linhagens que possam ser mutantes. Após 12 subcultivos os calos sobreviventes (tratados com 20, 30 e 40 Gy) foram avaliados quanto à produção de massa e à proliferação celular após 30 e 60 dias de subcultivo. Observou-se que a taxa de proliferação celular e o crescimento não foram afetados sob a ação destas três doses de Cobalto⁶⁰.

Introdução

A família Cactaceae é nativa do continente americano e compreende mais de 2.000 espécies distribuídas principalmente na região centro-norte do México até o sudoeste dos Estados Unidos, na Ecorregião do Deserto de Chihuahuan (CDE), e a zona árida e semiárida do sudoeste andino, incluindo partes do Peru, Chile e Argentina. O leste do Brasil, região da América Central e parte do sudeste do México também possuem grande diversidade de cactos, com cerca de 587 espécies, sendo o terceiro maior centro (Hunt, 2016). Na subfamília Cactoideae, tribo Cereeae, encontra-se o gênero *Cereus*, que ocorre desde o México até a Argentina, sendo o Brasil o centro de diversidade. O número de espécies descritas para o gênero *Cereus* no Brasil é de 16 e oito foram descritas como endêmicas (Zappi et al., 2020). O gênero *Cereus* apresenta rica diversidade de compostos bioativos como alcalóides, ácidos orgânicos, polissacarídeos, ácidos fenólicos, flavonóides, proteínas e enzimas identificadas como potentes catalisadores biológicos. Nos últimos anos, tem ocorrido um crescente interesse por estudos de fitoquímicos presentes em cladódios de vários gêneros da família Cactaceae (Dutra et al., 2019). O desenvolvimento de linhagens que possam produzir diferentes compostos de interesse em concentrações diferentes deve representar um avanço biotecnológico para o gênero *Cereus*. As mutações têm sido utilizadas para gerar vários recursos genéticos vegetais, a maior vantagem consiste na capacidade de melhorar

características específicas na variedade escolhida. O melhoramento genético por mutação é simples e de fácil aplicação. O raio gama é uma radiação ionizante que causa variação na estrutura cromossômica proporcional à dose da radiação do feixe de íons, e as mais comuns que ocorrem na estrutura cromossômica são inversões e deleções. O raio gama é a radiação ionizante mais amplamente utilizada, corresponde a 63% das variedades mutantes registradas desenvolvidas usando um mutagênico físico (Joint FAO / IAEA) (Hase et al., 2020). O isolamento e análise de mutantes são as ferramentas mais diretas e poderosas para identificar as funções genéticas.

O objetivo deste estudo foi irradiar calos de *Cereus peruvianus* com raios gama, utilizando doses de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 Gy de Cobalto-60 (Co^{60}). Realizar subculturas com repiques mensais e selecionar setores destes calos que sobreviveram aos tratamentos desenvolvendo linhagens, avaliar a taxa de proliferação celular e obtenção de massa por 30 e 60 dias obtendo massa suficiente para futuros estudos moleculares e químicos.

Materiais e Métodos

Os calos de *Cereus peruvianus* tem sido mantida por mais de 30 anos em meio MS contendo vitaminas B5, 0,8% de ágar, 3% de sacarose, 10% de água de coco e suplementado com 4 mg/L de 2,4-D e 4 mg/L de cinetina (kin), mantidos em $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, com $15 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ de intensidade luminosa (Oliveira et al., 1995). Para este experimento foram preparadas placas contendo o mesmo meio de cultura utilizado para a manutenção dos calos, em cada placa foram acondicionados sete calos, para cada tratamento foram preparadas cinco repetições. As placas contendo os calos foram levadas ao Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA / USP e irradiadas em 15 de outubro de 2020 com as diferentes doses no irradiador de raios gama Gammacell 220. Os calos foram irradiados com 10, 20, 30, 40, 50 e 60 Gy de Cobalto⁶⁰ e avaliados mensalmente, os setores sobreviventes foram transferidos para meio fresco, procedimento necessário para o desenvolvimento e manutenção das respectivas linhagens. Este procedimento foi essencial para a manutenção das linhagens irradiadas com Co^{60} e para a produção de massa suficiente para futuras análises. Após 12 subcultivos, sete calos de cada tratamento sobrevivente (20, 30 e 40 Gy), foram acondicionados em placas de petri contendo o meio normal de crescimento, cada tratamento foi realizado com cinco repetições. Foram realizadas pesagens com 30 dias, e após este período os calos foram transferidos sem repique para uma placa contendo meio fresco. Após mais 30 dias os calos foram novamente pesados. Os pesos frescos dos calos foram avaliados por 30 e 60 dias. Também foi avaliada a taxa de proliferação celular utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{P F} - \text{P I}}{\text{P I}} \times 100$$

Onde:

P F = Peso fresco dos calos proliferados P I = Peso fresco Inicial dos calos

Resultados e Discussão

Até o momento foram selecionados os setores sobreviventes dos calos com diferentes tratamentos com Co^{60} desenvolvendo linhagens que possam ser mutantes. Após várias etapas de repiques, que estão sendo realizados desde 15 de outubro de 2020, os tecidos de calo de cada tratamento se tornaram homogêneos e são estabelecidas linhagens. Nenhum mutante morfológico foi observado para os tratamentos realizados. Os calos estão se mantendo verdes e com as mesmas características morfológicas dos calos não irradiados com cobalto 60 (Figura 02).

Os calos irradiados com 10, 50 e 60 Gy de Co^{60} se tornaram marrons e não sobreviveram após serem irradiados ou ao longo do período de subcultivo (Figura 01 **C** e **D**). Os materiais irradiados com 20, 30 e 40 Gy de Co^{60} estão sendo repicados e subcultivados mensalmente em meio fresco (Figura 01 **A** e **B**; Figura 02). O tratamento com cobalto para as três doses que mantêm as células proliferantes não afetou significativamente o crescimento dos calos durante o período de avaliação. Ao final de 60 dias de cultivo para os calos não tratados (Normal) foi obtido 19,7704 g. Para os calos tratados com 20, 30 e 40 Gy de Co^{60} , após 60 dias, obteve-se 22,025 g, 24,7108 g e 18,704 g respectivamente (Figura 03). A taxa de proliferação celular foi avaliada, sendo que a maior taxa foi verificada para os calos irradiados com 30 Gy de Co^{60} , para este tratamento observou-se 511,1% de proliferação e a menor taxa foi observada para os calos tratados com 40 Gy de Co^{60} , para este tratamento a taxa de proliferação foi de 365,7%. Para os calos não irradiados a taxa de proliferação foi 454,5% e para os irradiados com 20 Gy de Co^{60} foi de 446,9%.

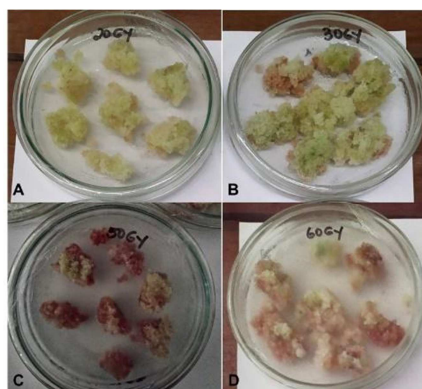


Figura 01. Calos após serem irradiados com 20, 30, 50 e 60 Gy de Co^{60} . Calos submetidos a 20 e 30 Gy de Co^{60} com aspecto de calo normal (**A** e **B**). Calos irradiados com 50 e 60 Gy de Co^{60} e com aspecto de necrose (**C** e **D**).

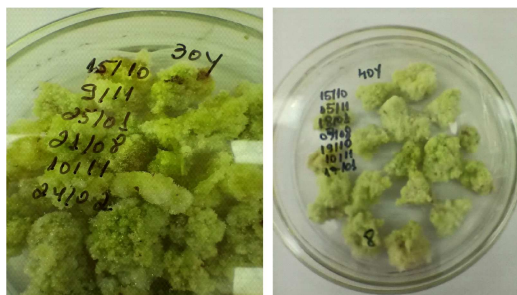


Figura 02. Calos irradiados com 30 e 40 Gy de Co^{60} que estão sendo repicados e subcultivados mensalmente em meio de cultura MS fresco.

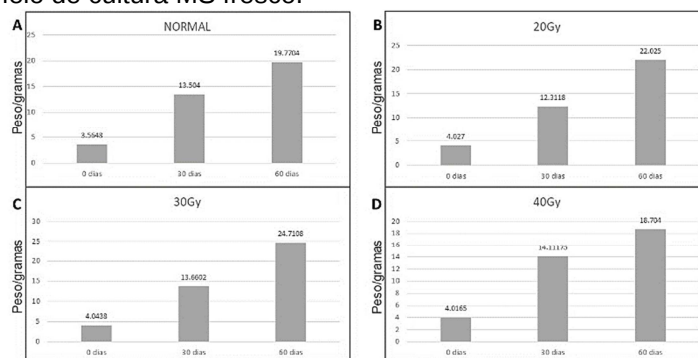


Figura 03. Crescimento dos calos em gramas avaliados após 30 e 60 dias de subcultivo em meio MS. Calos não tratados (Normal) (A). Calos tratados com 20 Gy de Co^{60} (B). Calos tratados com 30 Gy de Co^{60} (C). Calos tratados com 40 Gy de Co^{60} (D).

Conclusões

A irradiação com 10, 20, 30, 40, 50 e 60 Gy de Cobalto⁶⁰ é importante para promover mutações. Os calos irradiados com 10, 50 e 60 Gy de Co^{60} se tornaram marrons e não sobreviveram após serem irradiados. As demais doses não interferiram no crescimento dos calos, e foram obtidas massas suficientes para posteriores análises químicas e moleculares.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela Bolsa concedida ao Projeto de Iniciação Científica –PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Referências

- Dutra, J.C.V., Oliveira, J.B.H., Santos, V.S., Pereira, P.R.C., Ferreira, J.M., Batitucci, M.D.C.P. Fruiting increases total content of flavonoids and antiproliferative effects of *Cereus jamacaru* DC cladodes in sarcoma 180 cells in vitro. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.9, p.66, 2019.
- Hase, Y.; Satoh, K.; Seito, H.; Oono, Y. Genetic Consequences of Acute/Chronic Gamma and Carbon Ion Irradiation of *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v.11, p.1-12, 2020.
- Hunt, D. (third ed). **CITES Cactaceae checklist**. Royal Botanic Gardens Kew, 2016.
- Oliveira, A.S., Machado, M.F.P.S. Prioli, A.J. Mangolin, C.A. In vitro propagation of *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.31, p.47-50, 1995.

Zappi, D.C, Taylor, N.P., Santos, M., Larocca, J., 2015. Cactaceae in lista de espécies da flora do Brasil. <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1434>, Accessed 20st Ouct 2020.