

AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE CALOS DE *CAPSICUM ANNUUM* VISANDO AO ESTABELECIMENTO DE SUSPENSÕES CELULARES

Carolina Augusto de Souza, UNIR.

Milene de Castro Melo Guimarães, UNIR.

Wanessa de Oliveira Nogueira, UNIR.

Mauricio Reginaldo Alves dos Santos, EMBRAPA-RO.

Resumo

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae, é encontrado em ambos os hemisférios, tendo o Brasil ampla diversidade de espécies. Essas plantas são ricas em metabólitos secundários bioativos, incluindo alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, os quais possuem importância medicinal e econômica. Métodos de cultivo in vitro têm sido utilizados com sucesso para a obtenção de metabólitos secundários de plantas em larga escala, incluindo diversas espécies de *Capsicum*. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a formação de calos in vitro a partir de explantes foliares, segmentos internodais e nodais da cultivar *C. annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño, visando ao posterior determinação de sua curva de crescimento, e estabelecimento de suspensões celulares e produção de princípios ativos de interesse agrônômico e pecuário. Explantes foliares de *C. annuum* foram inoculados em meio Murashige & Skoog suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e 2,4-D. Foram avaliadas as variáveis de indução de calos (IC) e a área coberta por células de calos (ACCC) do explante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Houve formação de calos friáveis e esbranquiçados. O tratamento que resultou em maior porcentagem de IC e ACCC para explante foliar e internodal foi: 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; e para o segmento nodal foi o tratamento 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Palavras-chave: Calogênese. Suspensão Celular, Metabolitos Secundários.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um aumento da preocupação com o meio ambiente e a qualidade dos alimentos, neste contexto, a biotecnologia proporciona alternativas para práticas agrícolas sustentáveis (RIOS, 2002). Estudos relativos às substâncias vegetais e sua utilização na agricultura como defensivos se mostram viáveis para solucionar problemas ambientais.

O crescimento de calos é desejado para induzir variações somaclonais e realizar estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (DIXON e PAIVA, 1995; RODRIGUES e ALMEIDA, 2010). Para ocorrer a calogênese, o explante deve ser inoculado em meio de cultura que contenha reguladores de crescimento, os quais alteram o metabolismo celular, ocorrendo a diferenciação, tendo influência o tipo de explante, a composição do meio nutritivo e as condições físicas de incubação, como luz e temperatura (GEORGE et al., 2008). A determinação do meio de cultura mais adequado para o explante desenvolver calos deve ser específico para cada espécie (SIQUEIRA e INOUE, 1992).

Na literatura atual, não há trabalhos que descrevam protocolos para a indução de calos em *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño. A determinação de um protocolo para calogênese possibilitará o estudo da sua curva de crescimento fornecendo subsídios para futuros trabalhos em relação aos seus aspectos fitoquímicos e à bioatividade dos seus metabólitos secundários. O foco desse experimento é o estabelecimento de um protocolo para calogênese a partir de explantes foliares, nodais e internodais de *Capsicum annuum* variedade *annuum* cultivar Iberaba Jalapeño, avaliando diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D e BAP para o estudo de sua curva de crescimento e estabelecimento de suspensões celulares e posterior produção de metabólitos secundários de interesse agrônômico e pecuário.

METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho, Rondônia.

As sementes de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño, adquiridas no comércio local, foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, pH

5,8, autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Em uma câmara de fluxo horizontal, as sementes foram submetidas a uma desinfestação. As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio, sendo uma semente por tubo. Após 45 dias de cultivo, as plantas foram levadas para a câmara de fluxo, onde foram retirados os explantes: as folhas segmentadas em explantes de aproximadamente 1 cm², os segmentos internodais em explantes de 1 cm de comprimento e os segmentos nodais em explantes de 0,03 cm³, utilizando placa de Petri, papel filtro, pinça e bisturi autoclavados.

Os explantes foram inoculados individualmente, com a superfície adaxial em contato com o meio de cultivo, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS com 3% (p/v) de sacarose e 0,6% (p/v) de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar, seguido por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. O meio foi suplementado com BAP (0,0; 0,1; 0,5 e 2,5 mg L⁻¹) e 2,4-D (0,0; 1,0 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), em combinação fatorial. Todos os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas a 26±1°C.

Os experimentos foram avaliados a cada sete dias para observar a formação de calos nos explantes. Os tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições de cinco tubos de ensaio por tratamento, cada tubo contendo um explante (folha, segmento nodal ou internodal). Foi avaliada também a porcentagem da área do explante coberta por células de calo, de acordo com Mendonça, et al. (2013). Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F aos níveis de 5% de probabilidade; as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat 7.5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O efeito da BAP e 2,4-D na indução de calo e ACCC foram altamente significativas nos três tipos de explantes, bem como a sua interação. Análises de variância para porcentagem de IC e ACCC estão resumidos nas Tabelas 1.

Tabela 1 – Resultado da análise de variância da indução de calos (IC) e da área foliar coberta por células (ACCC) de calos de explantes de plantas de Jalapeño submetido a diferentes combinações de BAP e 2,4-D em meio de cultura com 28 dias de inoculação.

Explantes	Fator	GL	QM(IC)	QM (ACCC)	F (IC)	F (ACCC)
Folhas	BAP	3	6.67	13.5	14.40**	48.22**
	2,4-D	3	13.24	18.50	19.73**	9.70**
	BAPx2,4-D	9	1.47	4.00	4,26**	10.67
	Tratamento	15	4.87	8.80	9,39**	35.18
	Resíduo	32	0.14	0.94		
	Total	47				
Segmentos internodais	BAP	3	2.85	6.25	11.11**	13.20**
	2,4-D	3	8.51	10.25	18.22**	39.43**
	BAPx2,4-D	9	3.89	7.08	12.59**	18.06**
	Tratamento	15	4.61	7.55	13.42**	21.36**
	Resíduo	32	0.21	0.56		
	Total	47				
Segmentos nodais	BAP	3	2.02	3.83	5.93**	7.98**
	2,4-D	3	8.05	9.00	13.03**	31.87**
	BAPx2,4-D	9	2.53	4.72	7.31**	10.02**
	Tratamento	15	3.53	5.40	8.36**	13.98**
	Resíduo	32	0.25	0.64		
	Total	47				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

Avaliando as duas variáveis, IC e ACCC os tratamentos com maiores porcentagens foram as combinações de 4 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP para explantes foliares e internodais e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP para o explante nodal. Ocorreu calogênese na ausência de reguladores nos explantes nodais, todavia a área coberta por células de calos teve as menores porcentagens nesse tratamento, evidenciando a necessidade de combinação

destes reguladores de crescimento para uma efetiva proliferação de células de calos. O balanço hormonal entre citocininas e auxinas induz a produção de calos (ANDRADE, 2006).

Houve brotação nos explantes nodais, na concentração de 2,5 mg L⁻¹ de BAP, Otroshy et al. (2011) observou em *C. annuum* brotações, as quais regeneraram plântulas, a partir de explantes nodais utilizando 2,5 mg L⁻¹ de BAP. Ebida e Hu (1993) obtiveram brotações em *C. annuum* L. cv. Early California Wonder utilizando variações de 1,0 a 10,0 mg L⁻¹ de BAP em combinação com 0,1 mg L⁻¹ de ANA. Em geral, a presença de uma citocinina é essencial para a produção de brotos.

CONCLUSÕES

Para a indução de calos em explantes foliares e internodais de *C. annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño recomenda-se a utilização de meio de cultura MS suplementado com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e para explantes nodais indica-se a utilização da combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, as quais resultam em calogênese, em todos os explantes, com 100% da sua área coberta por células de calos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W.F. **Atuação do pulse na orgânogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Waterbury, v. 7, n. 7, p.1085. 1995.
- EBIDA, A.I.A.; HU, C. *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. **Plant cell reports**, v. 13, n. 2, p.107-110. 1993.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D. **Plant propagation by tissue culture**. Netherlands: Background, 2008. 501p.
- MENDONÇA, E.G. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobacterial method. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 419-429. 2013.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, Hoboken, v. 15, n. 3, p. 473-497. 1962.
- OTROSHY, M.; MORADI, K.; KHAYAM NEKOUEI, M. The effect of different cytokinin in propagation of *Capsicum annuum* L. by *in vitro* nodal cutting. **Trakia Journal of Sciences**, Studentski Grad, v. 9, n. 3, p. 21-30. 2011.
- RIOS, A. V. V. O ambiente no meio rural: dos agrotóxicos à biotecnologia. In: LIMA, A. (Org.). **O direito para o Brasil socioambiental**. Porto Alegre, Porto Alegre: Sergio Antonio Fabris, 2002. p. 413.
- RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calluses from *Cissampelos* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 333-340. 2010.
- SIQUEIRA, E. R.; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecido. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 639-646. 1992.