



V Simpósio de Estudos e
Pesquisas em Ciências
Ambientais na Amazônia

ANAIS

Trabalhos Completos Aprovados – 2016

Volume II

ISSN: 2316-7637

Belém - Pará



INFLUÊNCIA DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO NA INDUÇÃO DE CALOS PRIMÁRIOS EM *Piper divaricatum* G. MAYER

Rosana Silva Corpes¹, Ilmarina Campos de Menezes², Alberdan Silva Santos³, Oriel Filgueira de Lemos⁴, Orlando Maciel Rodrigues Junior⁵, Rosiene Silva Corpes⁶

¹Doutoranda em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará. E-mail: rosanacorpes@hotmail.com

²Doutora em Genética e Biologia Molecular. Embrapa Amazônia Oriental.

³Doutor em Bioquímica. Universidade Federal do Pará

⁴Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas. Embrapa Amazônia Oriental.

⁵Engenheiro Agrônomo. Universidade Federal Rural da Amazônia.

⁶Licenciada em Pedagogia. Universidade Federal do Pará

RESUMO

O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende de vários fatores, onde os reguladores de crescimento se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. *Piper divaricatum* G. Mayer é uma piperácea encontrada na Amazônia brasileira e vem sendo estudada nos últimos anos devido ao seu elevado potencial fungicida *in vitro* e tolerância *in vivo* contra o fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*). O estudo do desenvolvimento celular através da cultura de calos torna-se interessante devido a possibilidade de se explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensões celulares além de possibilitar a propagação via formação de gemas ou embriões somáticos que podem preservar a espécie e serem úteis em programas de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de cultivo para indução de calos primários em *P. divaricatum* com a finalidade de se realizar estudos futuros referentes a embriogênese somática e metabólitos secundários presentes nas células desta planta. Para a obtenção dos calos, foram utilizados como explantes segmentos foliares de *P. divaricatum* provenientes de plântulas micropropagadas *in vitro*. O cultivo foi feito em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) formando seis tratamentos com diferentes combinações. Aos 60 dias de cultivo, verificaram-se diferenças na formação dos calos, sendo o tratamento T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) o que apresentou os melhores resultados na indução de calos em *P. divaricatum*, atingindo um total de 100%, seguido do tratamento T3 (0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) com 84% da formação de calos. Os resultados nos demonstram que a combinação destes reguladores foi eficaz para o processo de indução de calos, o que possibilitará inúmeros estudos com as células que podem ser proliferadas.

Palavras-chave: Biotecnologia vegetal. Metabólitos. Piperaceae

Área de Interesse do Simpósio: Biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de tecidos vegetais consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (GIACOMETTI, 1990). A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, onde uma célula madura (diferenciada ou especializada), poderá ser estimulada a funcionar como uma célula meristemática, um fenômeno conhecido como desdiferenciação e neste processo, as células ditas diferenciadas retêm toda a informação genética requerida para o desenvolvimento de uma planta inteira (HOPKINS, 2000).

O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário e obter suspensões celulares, também pode ocorrer a propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000). *Piper divaricatum* é uma dicotiledônea pertencente à família Piperaceae que vem sendo estudada nos últimos anos devido ao seu elevado potencial fungicida *in vitro* e tolerância *in vivo* contra o fitopatôgeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) (MEIRELES, 2014). Estudos visando o estabelecimento de um protocolo de cultivo *in vitro* através de sementes desta espécie foram desenvolvidos por (CORPES, et al., 2015) e percebeu-se que o meio de cultivo em que esta piperácea é cultivada, bem como as condições de luminosidade podem influenciar nos aspectos morfológicos no processo de germinação *in vitro*, apresentando períodos de maior culminância durante os estádios de desenvolvimento. O uso de reguladores vegetais quando empregados no manejo da planta podem modificar seu comportamento, alterando não só a produtividade desta, como o seu metabolismo secundário, obtendo-se às vezes um aumento do teor de óleo essencial (SHUKLA; FAROOQI, 1990).

Esta planta produz em seu óleo essencial elevadas concentrações de metileugenol (50 – 90%), um fenilpropanoide com propriedades antioxidante e fungicida (CORPES, 2015). No que diz respeito a condições de cultivo (CORPES, et al., 2016) detectaram que os principais compostos identificados nas folhas aos 90 dias no cultivo *in vitro* e *in vivo* foram metileugenol (80,9 / 79,7%), β -elemeno (7,2 / 4,7%) e E- β -ocimeno (6,1 / 8,7%). Nas raízes *in vitro*, houve produção de metileugenol em baixa quantidade (10,2%) e altas concentrações de elemol (38,2%) e α -selineno (38,2%). Por outro lado, as raízes cultivadas *in vivo* foram ricas em monoterpenos com δ -3-careno



(19,8%), limoneno (14,8%) e α -felandreno (12,7%) e não houve variação no teor de compostos fenólicos nas folhas e raízes em ambos cultivos, porém percebeu-se que nas folhas in vitro ocorre uma maior atividade antioxidante aos 90 dias.

Realizar estudos que comparem diferentes condições de cultivo em determinadas espécies torna-se muito importante, uma vez que se pode reforçar a hipótese de que plantas regeneradas in vitro podem sintetizar metabólitos semelhantes a planta matriz e manter suas propriedades biológicas. Neste aspecto o cultivo in vitro de *P. divaricatum* é uma alternativa viável, uma vez que apresenta várias aplicações e ocorrência restrita na Amazônia. Vale ressaltar que esta espécie pode ser utilizada em programas de melhoramento juntamente com *P. nigrum* para a clonagem e multiplicação de plantas. A cultura de calos in vitro nos fornece a possibilidade de obter embriões somáticos que podem deter todas as informações necessárias para formação de um indivíduo completo. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de cultivo para indução de calos primários nesta espécie com a finalidade de realizar estudos futuros referentes a embriogênese somática e metabólitos secundários presentes nas células.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de cultivo in vitro foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

Nesta etapa, foram utilizados como explantes segmentos foliares de *P. divaricatum* de aproximadamente 0,5 cm², provenientes de plântulas micropropagadas in vitro. Em seguida, os explantes foram cultivados em placas de Petri (15 x 90 mm) contendo meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) formando seis tratamentos com diferentes combinações (Tabela 1).

Os explantes foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura e cultivados em estufas incubadoras com temperatura a 25°C \pm 2°C no escuro durante 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 5 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 5 explantes. A variável analisada foi a percentagem de formação de calos em relação aos tratamentos utilizados e estes foram dispostos em esquema fatorial 3 x 2 x 2, sendo ANA nas concentrações (0,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹); BAP (combinado ou não com ANA) e dois tempos de incubação (30 e 60 dias).

Tabela 1. Tratamentos utilizados para indução de calos em segmentos foliares de *P. divaricatum*.

Tratamentos	Concentrações
T0	0 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T1	5 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T2	10 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T3	0 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP
T4	5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP
T5	10 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP

Fonte: Autores (2016)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 60 dias de cultivo, verificaram-se diferenças na formação de calos primários. O tratamento T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) foi o que apresentou os melhores resultados na indução de calos em *P. divaricatum*, com 100 % de formação de calos aos 60 dias, seguido de T3 (0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) com 84% da formação de calos (Tabela 2)

Tabela 2: Percentagem de formação de calos em relação ao tempo de incubação e aos tratamentos utilizados para indução de calos em *P. divaricatum*

Fonte: Autores (2016)

A tabela acima também nos demonstra que durante os 30 primeiros dias de incubação

Tratamentos	Tempos de Incubação em dias		Calos formados aos 30 dias (%)	Calos formados aos 60 dias (%)
	30	60		
T0: 0 mg.L⁻¹ de ANA + 0 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	0	0
T1: 5 mg.L⁻¹ de ANA + 0 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	0	0
T2: 10 mg.L⁻¹ de ANA + 0 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	16	16
T3: 0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	64	84
T4: 5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	84	100
T5: 10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP	30	60	48	68

nem todos explantes que irão formar calos primários já expressam esta característica, sendo



importante observar quais explantes irão formar calos até os 60 dias para uma maior fidelidade dos dados.

SOUSA, (2013) ao testar a influência dos reguladores de crescimento para indução de calos em *P.aduncum* e *P.hispidinervum* durante o período de 60 dias obteve resultados satisfatórios para *P.aduncum* tendo obtido 88% da formação de calos quando submeteu esta espécie ao tratamento que continha 5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP, entretanto, não obteve o mesmo resultado para *P.hispidinervum*, tendo obtido apenas 32% na formação de calos.

Com o objetivo de testar a influência das auxinas (ANA, AIA, AIB e 2,4-D) na indução de calos primários em explantes foliares e entrenós de *Piper hispidinervum* (COSTA et al., 2008) concluíram que ao adicionar o regulador de crescimento auxina nas concentrações 2,5 e 5 mg.L⁻¹, ocorre uma maior indução de calos quando o tipo de explante é oriundo da região foliar.

Visando a produção de moléculas biologicamente ativas, (PEREIRA et al., 2000) avaliaram o processo de indução de calos em explantes foliares de *Piper aduncum* através da combinação de diferentes concentrações de ANA e BAP e constataram que quando se utiliza a combinação de 4,4 µM de BAP + 5,4 µM de ANA, ocorre 100% da formação de calos.

Com a finalidade de induzir a organogênese in vitro de *P.hispidinervum* através de estacas oriundas de germinação in vitro (SALVARO, 2009) testou as concentrações 0,25 ; 0,50; 0,75; e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP isoladamente ou combinadas com AIB e constatou que dentre estas concentrações citadas, somente na concentração 0,25mg.L⁻¹ de BAP, não ocorre a formação de calo.

4. CONCLUSÕES

No que diz respeito a influência dos reguladores de crescimento para produção de calos primários em *P. divaricatum*, constatou-se que a combinação dos reguladores ANA e BAP, é eficaz no processo de indução de calos, sendo a concentração 5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP (T4) considerada a melhor para tal finalidade, porém quando se utiliza apenas o regulador BAP na concentração 2,5 mg.L⁻¹(T3), também é possível obter resultados satisfatórios, porém a formação de calos ocorrerá em menor percentual.

O processo de indução de calos em *P. divaricatum*, nos possibilita obter estudos mais aprofundados em relação à produção dos metabólitos produzidos pelas células desta espécie, bem

como sua possível utilização em programas de melhoramento juntamente com *P. nigrum*, uma vez que trabalhos anteriores mostraram que *P. divaricatum* possui metabólitos de elevado interesse, porém ainda se faz necessário aprimorar cada vez mais os estudos a respeito desta espécie tendo em vista que ela ainda é pouco relatada na literatura.

REFERÊNCIAS

CORPES, R.S. **Produção e avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo.** 2015 60 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia . Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2015.

CORPES, R.S. et al. Germinação in vitro e formação de plântulas de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo. **Anais do 4º Simpósio de Estudos e Pesquisas em Ciências Ambientais na Amazônia.** Universidade do Estado do Pará, 2015.

CORPES, R. S et al. Propagação in vitro e in vivo de *Piper divaricatum* (Piperaceae) e avaliação da produção de fenilpropanoides. **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Goiânia, 2016.

COSTA, F. H. S. et al . Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência e Agronegócio**, v.39, n.2, p.269-274, 2008.

GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, p.19-28, 1990.

HOPKINS, W. G. **Introduction to Plant Physiology.** 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 512 p. 2000.

LANDA, F. S. L. et al . Indução in vitro de calos em explantes foliares de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 56-63, 2000.

MEIRELES. E. das N. **Influência dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região Amazônica no controle do *Fusarium solani* f.sp. *piperis* causador da fusariose em pimenta-do-reino.** 2014. 83 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2014.



PEREIRA, A. M. et al. Callus Culture of *Piper aduncum* for the Production of Bioactive Micromolecules. In: **Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants** v. 569 (p. 41-45), 2000.

SALVARO, L. M. S. **Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese in vitro de *Piper hispidinervium* Candolle de Candolle: análises biométricas e bioquímicas.** Tese (doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP, 2010.

SHUKLA. A; FAROOQI AHA E. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**,v. 12, n. 3, p. 152-157, 1990.