

## ORGANOGENESE DIRETA *IN VITRO* DE *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst.

Ana Luiza Assis Semonato, Aline dos Santos Bergamin, Loren Cristina Vasconcelos, Mayla Bessa Scotá, Geisiele Silva Martins, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, [alassissemonato@gmail.com](mailto:alassissemonato@gmail.com), [alinebergamin258@hotmail.com](mailto:alinebergamin258@hotmail.com), [lorenvasconcelos@hotmail.com](mailto:lorenvasconcelos@hotmail.com), [mayla\\_scotta@hotmail.com](mailto:mayla_scotta@hotmail.com), [martinsgeisiele@gmail.com](mailto:martinsgeisiele@gmail.com), [elias.werner@ufes.br](mailto:elias.werner@ufes.br), [milenemiranda@yahoo.com.br](mailto:milenemiranda@yahoo.com.br).

### Resumo

A família Piperaceae, importante economicamente e com distribuição pantropical, inclui o gênero *Peperomia*, valorizado por seu uso ornamental e por ser fonte de bioativos. O objetivo foi avaliar diferentes combinações de reguladores de crescimento para induzir a formação de órgãos em *Peperomia glabella* var. *nigropunctata*, utilizando como explantes segmentos foliares de plântulas já estabelecidas *in vitro*. Os resultados indicaram que os melhores meios para obtenção de raízes foram M3 (10 mg L<sup>-1</sup> de ANA) e M7 (5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 5 mg L<sup>-1</sup> de ANA), enquanto para a obtenção de brotos destacaram-se os meios M2 (5 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 10 mg L<sup>-1</sup> de AIA) e M6 (15 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 15 mg L<sup>-1</sup> de Kn). Esses resultados fornecem insights valiosos para futuros estudos visando a micropropagação de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata*.

**Palavras-chave:** Auxina. Citocinina. Explante. Órgãos vegetais.

**Área do Conhecimento:** Fisiologia.

### Introdução

A família Piperaceae está entre as oito famílias de angiospermas basais mais representativas em número de espécies, e destaca-se, em importância econômica (Barroso *et al.*, 2002), com distribuição pantropical e um vasto número de espécies ocupando florestas tropicais e subtropicais da América, Ásia e do Pacífico-Sul (Jaramillo *et al.*, 2008; Frenzke *et al.*, 2015). Dentre os gêneros da família Piperaceae, destaca-se o gênero *Peperomia*, amplamente utilizado com interesse ornamental e fonte de bioativos, através de extratos etanólicos e óleos essenciais (Gutierrez *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2019).

É o segundo maior gênero em número de espécies, que são predominantemente epífitas, mas que podem ser encontradas em fendas de rochas ou no solo, e ocorrem preferencialmente em locais úmidos e sombreados, sendo menos frequente em matas secas e vegetações campestres (Carvalho-Silva, 2008). Apesar da abundância de compostos bioativos disponíveis para estudos científicos, a dificuldade de obter exemplares do gênero por longos períodos é um dos desafios que dificultam a pesquisa.

Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais emerge como uma ferramenta promissora, baseada na teoria da totipotência celular, que tem sido explorada desde os primeiros estudos sobre cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Twaij *et al.*, 2020). De acordo com Haberlandt (1902), as células vegetais possuem um potencial genético para regenerar um organismo completo, o que implica na capacidade das células diferenciadas de se desdiferenciarem, adquirirem competência e seguirem uma trajetória morfogenética.

A cultura de tecidos vegetais, consiste na propagação vegetativa *in vitro* por meio de pequenos explantes, os quais geralmente são cultivados em frascos, onde os meios nutritivos e fatores abióticos controlados contribuem na formação e no desenvolvimento de tecidos, órgãos e plantas *in vitro* (Cardoso, 2014). A técnica apresenta vantagens, como multiplicação em grande escala em espaço/tempo reduzido, além da probabilidade de indivíduos livres de patógenos, além da possibilidade de manipulação da morfogênese (Mehbub *et al.*, 2022). Desta maneira, células, tecidos ou órgãos com diferentes graus de determinação podem adquirir novas competências através da ação de

determinados sinais químicos, possibilitando a regeneração de órgãos como raízes e folhas (Wong *et al.*, 2023), assim, contribuindo para a obtenção de plântulas em grande quantidade.

Sendo assim, o trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito de diferentes tipos e combinações de reguladores para indução da organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst.

## Metodologia

Plântulas de *P. glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst. já estabelecidas *in vitro* no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo, foram selecionadas e utilizadas para obtenção de segmentos foliares, que foram utilizados como fonte de explantes.

Os explantes foram excisados em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> e inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, sendo o 6-benzilaminopurina (BAP), ácido-1-naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e Cinetina (Kn) (Tabela 1) para a indução de organogênese *in vitro*. Todos os meios utilizados tiveram o pH ajustado para 5,8±1 e foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento em placas de Petri, contendo cinco explantes em cada repetição. As culturas foram mantidas na sala de crescimento com temperatura a 25±2 °C, e fotoperíodo de 8 horas escuro e 16 horas de luz branca fluorescente com 25,2 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de fluxos de fótons fotossintéticos. As variáveis avaliadas foram a porcentagem de brotos e raízes e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias ao teste de Tukey à 5% de significância.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para indução da organogênese *in vitro* de *P. glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst.

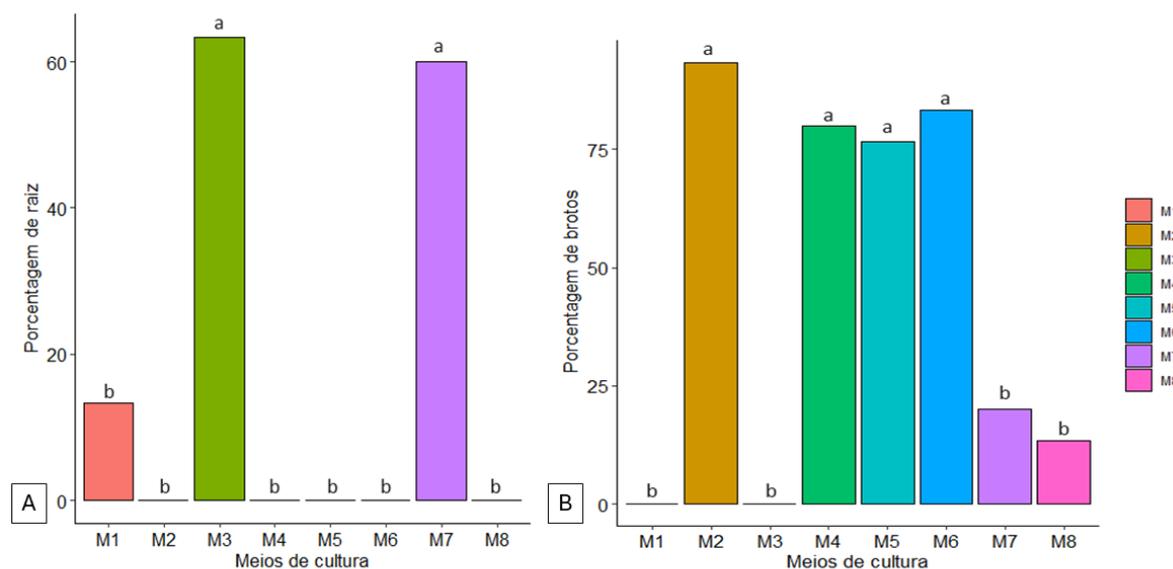
Componentes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
MS (g/L) *	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
Sacarose (g/L)	30	30	30	30	30	30	30	30
Ácido ascórbico (g/L)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ágar (g/L)	10	10	10	10	10	10	10	10
BAP (mg/L) *	5	5	-	10	15	15	5	10
ANA (mg/L) *	10	-	10	-	-	-	5	10
AIA (mg/L) *	-	10	-	-	-	-	-	-
Kn (mg/L)	-	-	-	-	10	15	-	-

Fonte a autora

## Resultados

Após 50 dias do estabelecimento *in vitro*, foram avaliados a porcentagem de brotos e raízes de explantes foliares de *P. glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst. Os melhores resultados em relação a porcentagem de raízes foram observados no M3 (10 mg/L ANA) e M7 (5 mg/L BAP + 5 mg/L ANA) (Figura 1A). Em relação ao número de brotos, os melhores resultados foram observados nos meios suplementados apenas com citocinina (Figura 1B), com exceção do meio M2, que continha ANA em sua composição, além da citocinina.

Figura 1. Porcentagem média de raízes (A) e brotos (B) obtidas a partir de explantes foliares de *P. glabella* var. *nigropunctata* submetidos aos tratamentos: M1 (5 mg/L BAP + 10 mg/L ANA), M2 (5 mg/L BAP + 10 mg/L ANA), M3 (10 mg/L ANA), M4 (10 mg/L BAP), M5 (15 mg/L BAP + 10 mg/L Kn), M6 (15 mg/L BAP + 15 mg/L Kn), M7 (5 mg/L BAP + 5 mg/L ANA) e M8 (10 mg/L BAP + 10 mg/L ANA). As barras seguidas pela mesma letra indicam semelhança entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: a autora.

## Discussão

Os melhores resultados em relação a porcentagem de raízes foram observados nos tratamentos com o regulador de crescimento ácido-1-naftalenoacético (ANA) o que é coerente já que a auxina é um hormônio que promove o alongamento de células contribuindo na formação de raízes (Cardoso, 2014). Assim como observado por Chatterjee, Chatterjee e Chandra (2022), em que os meios suplementados com a ANA promoveram eficientemente o desenvolvimento de raízes em *Piper longum*, a partir de segmentos foliares.

Já os resultados encontrados para a porcentagem de brotos, corrobora com resultados encontrados por Rojas-Idrogo *et al.*, (2020), em que seus resultados confirmaram achados anteriores de que citocininas como BAP e cinetina são úteis nos processos morfogênicos de propagação clonal de *Peperomia*.

Os reguladores de crescimento vegetal utilizados no meio de cultura têm importantes implicações nos eventos morfogênicos. O equilíbrio hormonal estabelecido por esses reguladores leva à desdiferenciação e rediferenciação das células dos explantes, promovendo a formação e desenvolvimento de diferentes órgãos (De Oliveira *et al.*, 2022). As citocininas e auxinas são os principais reguladores de crescimento vegetal para a desdiferenciação celular, levando a transdiferenciação para uma rota alternativa, formando novas estruturas como brotos (Almeida *et al.*, 2015).

É sabido que o destino morfogênico da diferenciação do tecido vegetal é afetado pela proporção dos níveis de citocinina e auxina no tecido, em que uma alta relação auxina/citocinina estimula o desenvolvimento das raízes, enquanto uma alta relação citocinina/auxina é favorável ao desenvolvimento do tecido da parte aérea (Raspor *et al.*, 2021).

A capacidade de regeneração dos explantes é fortemente influenciada pelos níveis de auxina endógena, por exemplo, mutantes de *Arabidopsis* que superexpressam os genes *YUCCA* da biossíntese de auxina obtêm uma alta capacidade de regeneração (Zhao *et al.*, 2013). No mamão, embora o hipocótilo tenha um alto nível de auxina endógena o 2,4-D ainda é necessário para induzir a formação de calo embriogênico, especulando-se, portanto, que a auxina endógena não poderia ativar a expressão dos genes de indução de calos (Zhao *et al.*, 2021).

## Conclusão

Para obtenção de raízes os melhores meios foram o M3 (10 mg/L ANA) e M7 (5 mg/L BAP + 5 mg/L ANA), já para obtenção de brotos melhores meios foram M2 (5 mg/L BAP + 10 mg/L AIA) e M6 (15 mg/L BAP + 15 mg/L Kn).

## Referências

- ALMEIDA, M.; GRANER, É. M.; BRONDANI, G. E., DE OLIVEIRA, L. S., ARTIOLI, F. A., DE ALMEIDA, L. V., BATAGIN-PIOTTO, K. D. Plant morphogenesis: theoretical bases. **Advances in Forestry Science**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2015. DOI: 10.34062/afs.v2i1.2363. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/afor/article/view/2363>.
- ALVES, N. S. F.; SETZER, W. N.; DA SILVA, J. K. R. The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 232, p. 90-102, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.021>.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 309 p.
- CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo in vitro de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 383-384, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-053620140000400002>.
- CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES E. F. Piperaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, p. 235-245, 2009. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/42871702>.
- CHATTERJEE, M.; CHATTERJEE, S.; CHANDRA, I. In vitro regeneration of *Piper longum* L. and comparative RP-HPLC analysis of piperine production of in vitro and in vivo grown plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 149, n. 1, p. 205-212, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02237-0>
- DE OLIVEIRA, L. S.; BRONDANI, G. E.; MOLINARI, L. V.; DIAS, R. Z.; TEIXEIRA, G. L.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Optimal cytokinin/auxin balance for indirect shoot organogenesis of *Eucalyptus cloeziana* and production of ex vitro rooted micro-cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 33, n. 5, p. 1573-1584, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11676-022-01454-9>.
- FRENZKE, L.; SCHEIRIS, E.; PINO, G.; SYMMANK, L.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; SAMAIN, M. S. A revised infrageneric classification of the genus *Peperomia* (Piperaceae). **Taxon**, v. 64, n. 3, p. 424-444, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.12705/643.4>.
- GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; DE MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry reviews**, v. 15, p. 1009-1033, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9461-5>.
- HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen, sitz-ungs. **Akad. D. wissensch. Mathermatusch-naturwissenschaftlicher** c169, 1902.
- JARAMILLO, M. A.; CALLEJAS, R.; DAVIDSON, C.; SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J. A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ-petA. **Systematic Botany**, v. 33, p. 647-660, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1600/036364408786500244>.

MEHBUB, H.; AKTER, A.; AKTER, M. A.; MANDAL, M. S. H.; HOQUE, M. A.; TULEJA, M.; MEHRAJ, H. Tissue culture in ornamentals: Cultivation factors, propagation techniques, and its application. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3208, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11233208>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, 1962.

RASPOR, M.; MOTYKA, V.; KALERI, A. R.; NINKOVIĆ, S.; TUBIĆ, L.; CINGEL, A.; ĆOSIĆ, T. Integrating the roles for cytokinin and auxin in de novo shoot organogenesis: from hormone uptake to signaling outputs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8554, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22168554>.

ROJAS-IDROGO, C.; OLIVERA-MORANTE, M. I.; DELGADO-PAREDES, G. E. Propagación in vitro de Peperomia albobittata y Peperomia galioides por organogénesis. **Biotecnología Vegetal**, v. 20, n. 2, p. 92-103, 2020. Disponível em: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S207486472020000200092&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S207486472020000200092&script=sci_arttext&tlng=en)

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. In: **Symp. Soc. Exp. Biol.** 1957. p. 118-131.

TWAIJ, B. M.; JAZAR, Z. H.; HASAN, M. N. Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. **International Journal of plant biology**, v. 11, n. 1, p. 8385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>.

WONG, C.; ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M. A. Spatial regulation of plant hormone action. **Journal of Experimental Botany**, v. 74, n. 19, p. 6089-6103, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erad244>.

ZHAO, X. Y.; SU, Y. H.; ZHANG, C. L.; WANG, L.; LI, X. G.; ZHANG, X. S. Differences in capacities of in vitro organ regeneration between two Arabidopsis ecotypes Wassilewskija and Columbia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 112, p. 65-74, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0216-8>.

ZHAO, X.; SONG, J.; ZENG, Q.; MA, Y.; FANG, H.; YANG, L.; YUE, J. Auxin and cytokinin mediated regulation involved in vitro organogenesis of papaya. **Journal of Plant Physiology**, v. 260, p. 153405, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153405>.

## Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).