

INDUÇÃO DE CALOGÊNESE *IN VITRO* DE *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst.

Ana Luiza Assis Semonato, Aline dos Santos Bergamin, Mayla Bessa Scotá, Thalya Campelo Vitor, 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, alinebergamin258@hotmail.com, mayla_scotta@hotmail.com, thalyavitor26@gmail.com, elias.werner@ufes.br, milenemiranda@yahoo.com.br.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente de indução de calogênese *in vitro* para a espécie *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst., visando à obtenção de biomassa vegetal para extração de óleos essenciais. Plântulas regeneradas foram obtidas a partir de explantes nodais cultivados em meio MS com diferentes concentrações de reguladores de crescimento vegetal (RCVs), sendo os explantes foliares posteriormente inoculados em meios suplementados com auxinas sintéticas (2,4-D, Picloram e Dicamba) para induzir calos. Após 30 dias, avaliou-se a formação de calos, e utilizou-se análise estatística (ANOVA e teste de Scott-Knott) para validação dos dados. Os resultados indicaram diferenças significativas na formação de calos, com os tratamentos contendo 2,4-D (M1, M2 e M3) e Dicamba (M7 e M8) apresentando as maiores taxas de indução. Esses resultados fornecem insights valiosos para futuros estudos visando a micropropagação de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata*.

Palavras-chave: Explantes. Calos. Micropropagação. Auxina. Citocinina.

Área do Conhecimento: Fisiologia.

Introdução

A família Piperaceae está entre as oito famílias de angiospermas basais mais representativas em número de espécies, destacando-se pelo seu valor econômico, ornamental (Barroso *et al.*, 2002) e medicinal (Sen e Rengaiyan, 2022), com muitas espécies utilizadas na medicina tradicional devido aos compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (Arrigoni-Blank *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2008), cicatrizantes (Villegas *et al.*, 2001), antitumorais (Li *et al.*, 2003), antifúngicas e bactericidas (Michel *et al.*, 2007), antidepressivas e ansiolíticas (Michel *et al.*, 2010), dentre outras. Dentro desta família, o gênero *Peperomia*, além de ser usado para ornamentação, é apontado como a segunda maior fonte de compostos bioativos da família, no entanto, é pouco estudado quimicamente (Batista Júnior *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2018).

No Brasil, existem 105 espécies de *Peperomia* descritas, e 55 são encontradas no Espírito Santo, distribuídas principalmente nos fragmentos de Mata Atlântica (Flora do Brasil, 2024). Dentre essas espécies, *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst. é encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Santa Catarina (Flora do Brasil, 2024).

Devido à distribuição e ao número reduzido de indivíduos da espécie, os estudos envolvendo-a tornam-se um desafio. A cultura de tecidos vegetais apresenta-se como uma solução eficaz para a propagação em larga escala sem afetar drasticamente populações naturais, permitindo a multiplicação rápida, a obtenção de maior quantidade de plantas e o armazenamento de germoplasma (Klíma *et al.*, 2019; Barceló-Muñoz *et al.*, 2022). A morfogênese *in vitro* envolve a propagação vegetativa de explantes cultivados em meios nutritivos com concentrações específicas de reguladores de crescimento vegetal (RCVs), como auxinas e citocininas, que promovem a formação de calos e a regeneração de plantas inteiras, respectivamente. A adição de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxyacético) ao meio de cultura induz a formação de calos e embriões somáticos, enquanto a combinação de auxinas e citocininas pode promover a regeneração de órgãos e plântulas inteiras (Klíma *et al.*, 2019; Barceló-Muñoz *et al.*, 2022). Essas técnicas facilitam a produção em massa de biomassa e a síntese de compostos bioativos, contribuindo para a conservação de espécies.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Diante dos desafios relacionados à distribuição limitada e ao número reduzido de indivíduos dessa espécie, juntamente ao seu valor ecológico, comercial e o potencial medicinal dos compostos bioativos, este estudo tem como objetivo estabelecer plântulas regeneradas *in vitro* para obtenção de explantes foliares e, a partir deles, elaborar um protocolo de indução de calogênese *in vitro* de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst., visando a embriogênese somática, a fim de prover material para a extração de óleos essenciais.

Metodologia

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo. Exemplares de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata* (Miq.) Dahlst. foram obtidos a partir de coletas realizadas no Parque Estadual Forno Grande, localizado no município de Castelo-ES. Os segmentos nodais foram submersos em uma solução de fungicida (contendo 2 g L⁻¹ de manzate e 3 ml L⁻¹ de across e captan), enxaguados em água corrente, submersos em álcool 70% (v/v) por 1 min e posteriormente colocados em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaClO 2,5%) com tween 20, por 20 minutos, seguidos de 4 enxágues com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram mantidos por 60 dias no meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescido do RCV 6-Benzilaminopurina (BAP) na concentração de 2.5 mg L⁻¹ para a indução de brotos. Em seguida, os brotos foram mantidos por 20 dias no meio de cultura MS suplementado com 1.0 mg L⁻¹ de BAP e 0.5 mg L⁻¹ de ácido-1- naftalenoacético (ANA) e ácido giberélico (GA3), e, sem seguida, subcultivados para meio de cultura MS suplementado com o RCV BAP (2.5 mg L⁻¹). Transcorrido 60 dias as plântulas regeneradas a partir dos brotos, foram trocadas para meio de cultura MS suplementado com 0.5 mg L⁻¹ de ANA e GA₃ e assim foram mantidas por mais 60 dias para o alongamento das plântulas (Figura 1A), e, desenvolvimento de folhas para a obtenção dos explantes foliares para a indução da calogênese *in vitro*. O pH de todos os meios preparados foram ajustados para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem, e, os experimentos foram mantidos na sala de crescimento a 25 ± 2 °C sob o fotoperíodo 16/8h (luz e escuro).

Para a indução de calogênese *in vitro*, os explantes foliares foram inoculados em placas de Petri (Figura 1B) contendo 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com diferentes concentrações e combinações de RCV conforme descrito na Tabela 1. O pH de todos os meios preparados foram ajustados para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. O experimento foi mantido na sala de crescimento a 25 ± 2 °C sob escuro constante. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada tratamento, sendo cada repetição uma placa de Petri, contendo cinco explantes por placa. Após 30 dias do estabelecimento *in vitro*, foram avaliados a porcentagem de calos de explantes foliares de *P. glabella*. Após atender os pressupostos de linearidade, normalidade dos erros e a homogeneidade das variâncias, os dados obtidos de cada variável foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias. Todas as análises foram realizadas utilizando o Programa R Stúdio, versão 4.1.1 (R Development Core Team, 2021).

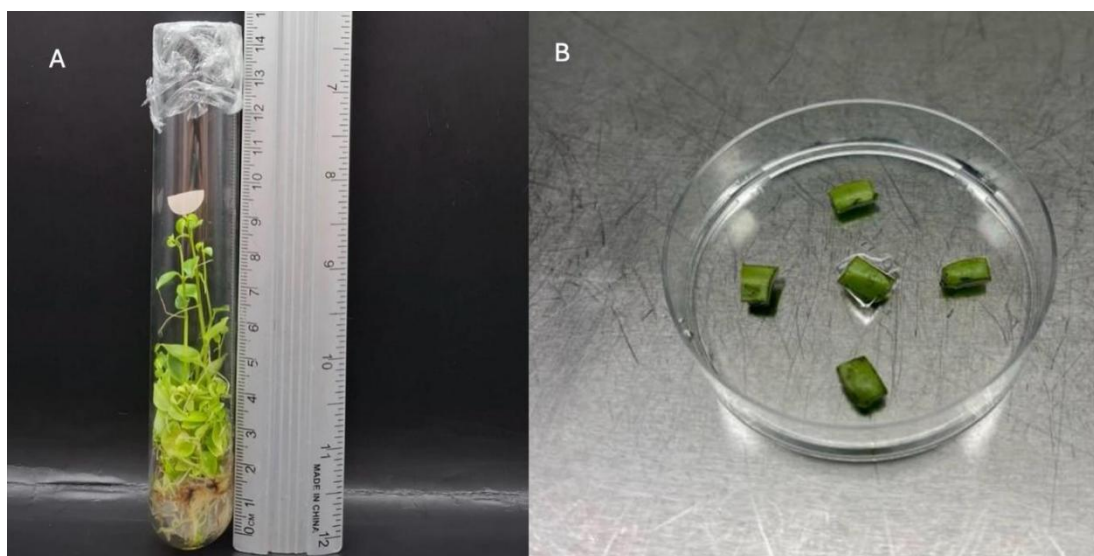
Tabela 1. Meios de cultura que serão utilizados para indução da calogênese a partir de segmentos foliares.

Componentes	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
MS (g/L)	4,4	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	30
Ácido ascórbico (g/L)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Phytigel (g/L)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
2,4-D (mg/L)	1,0	2,0	3,0	-	-	-	-	-	-
Picloram (mg/L)	-	-	-	1,0	2,0	3,0	-	-	-
Dicamba (mg/L)	-	-	-	-	-	-	1,0	2,0	3,0

Fonte: Produção do próprio autor.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 1 - Plântulas propagadas *in vitro* originadas de explantes nodais (A) utilizadas como fonte de explantes foliares (B) para o processo de calogênese *in vitro* de *P. glabera*.



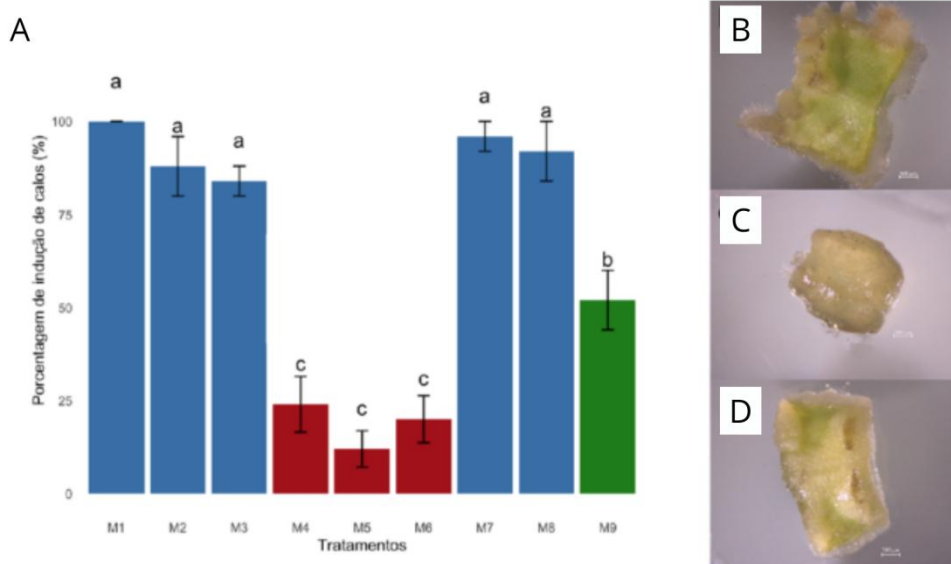
Fonte: Produção do próprio autor.

Resultados

A partir da análise de variância (ANOVA) verificou-se diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com coeficiente de variação de 21,9%. A análise de porcentagem de calos classificou os tratamentos em três grupos distintos, conforme apresentado na Figura 2. Os tratamentos com as maiores porcentagens — M1(100%), M7 (96%), M8 (92%), M2 (88%) e M3 (84%) — foram agrupados juntos, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si. O tratamento M9 (52%) formou um grupo intermediário, apresentando diferença estatística em relação aos tratamentos com maiores e menores porcentagens. Os tratamentos com as menores porcentagens — M4 (24%), M6 (20%) e M5 (12%) — compuseram o último grupo, não diferindo estatisticamente entre si, com as menores médias de indução de calos.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 2 - (A) Porcentagem de indução de calos em explantes de folhas de *P. glabella* inoculados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento 2,4-D (M1, M2 e M3), Picloram (M4, M5 e M6) e Dicamba (M7, M8 e M9). Calos com 30 dias suplementados com 2,4-D (B), Picloram (C) e Dicamba. As barras em azul representam o grupo estatístico 'a', em vermelho o grupo 'c' e em verde o grupo 'b', de acordo com o teste de comparação de médias.



Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade (p Valor 1.4169e-14). Tratamentos: 2,4-D (M1-M3), Picloram (M4-M6), Dicamba (M7-M9), sequencialmente correspondendo as doses de cada auxina (1,0, 2,0 e 3,0 mg/L). Fonte: Produção do próprio autor.

Discussão

A indução de calos *in vitro* é favorecida pelo uso de auxinas, como o 2,4-D, que promovem a desdiferenciação celular (George *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2011). Explantes jovens, como folhas, são ideais devido aos seus altos níveis de auxinas endógenas, maior densidade estomática e melhor absorção de nutrientes, facilitando a produção de biomassa (Thorpe *et al.*, 1984; Werner *et al.*, 2009; Taiz *et al.*, 2013; Forket *et al.*, 2013). O 2,4-D é uma auxina sintética de uso comum, conhecida por sua alta atividade na indução de calos e embriogênese somática em diversas espécies (Alvez, 2015). O dicamba e o picloram são auxinas sintéticas que, embora também mimetizem a ação das auxinas naturais, possuem estruturas químicas mais complexas, sendo derivados do ácido benzoico e da piridina, respectivamente (Titon, 2007; Scispace, s.d.). Resultados semelhantes foram encontrados por Briskin *et al.* (2001), que também avaliaram a formação de calos e brotações com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D em explantes foliares de *Piper methysticum*. Um estudo com *Euterpe edulis*, realizado por Mello *et al.* (2024), indicou o uso de picloram na indução de calos *in vitro*. De maneira semelhante, estudos realizados por Scotá (2024) e Mariano (2024) sobre a indução de calos *in vitro* de *Paubrasilia echinata* demonstraram que o uso dos RCV 2,4-D, dicamba e picloram é indispensável para a calogênese *in vitro* dessa espécie. A variação na dose e no tipo de auxina necessária para a indução de calos entre diferentes espécies, como observado nos estudos com *Piper methysticum*, *Euterpe edulis* e *Paubrasilia echinata*, pode ser atribuída a diversos fatores. Estes incluem as diferenças genéticas intrínsecas de cada espécie, que determinam a sensibilidade dos tecidos aos reguladores de crescimento, a capacidade de metabolização da auxina exógena, e a interação com os níveis de auxinas endógenas (Terhaag, 2020; Botin & Carvalho, 2015).

De acordo com os resultados alcançados e com estudos sobre reguladores análogos a auxinas, diferentes resultados podem ser obtidos conforme a espécie em estudo. No caso de *P. glabella*, o protocolo adotado foi eficiente na indução de calos, permitindo, a longo prazo, a obtenção de biomassa para novas pesquisas.

Conclusão

Os tratamentos com 2,4-D (1,0 mg/L – M1) e Dicamba (1,0 mg/L – M7; 2,0 mg/L – M8) apresentaram as maiores taxas de indução de calos (100%, 96% e 92%, respectivamente), demonstrando alta eficiência na calogênese de *Peperomia glabella* var. *nigropunctata*.

Referências

- ALVEZ, B. **Efecto de Dicamba y de ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. 2015. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752015000200084&script=sci_arttext&lng=es. Acesso em: 29 set. 2025.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. **Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae)**. Journal of Ethnopharmacology, v. 91, n. 2/3, p. 215-218, Apr. 2004.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 309 p.
- BOTIN, A. A.; CARVALHO, A. **Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais**. 2015.
- BRISKIN, D. et al. **Production of kavapyrones by Kava (*Piper methysticum*) tissue cultures**. Plant Cell Reports, v. 20, n. 6, p. 556-561, 2001.
- BUDIYANTO, K. M.; ABADI, S. Y. **Growth and carrageenan content of local and tissue culture seed of *Kappaphycus alvarezii* cultivated in floating cage**. AACL Bioflux, v. 12, n. 1, p. 167-178, 2019.
- 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, 2008.
- CÉLINE, V. et al. **Medicinal plants from the Yaneshá (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts**. Journal of Ethnopharmacology, v. 123, n. 3, p. 413-422, June 2009.
- DE MELLO, T. et al. **Optimization of somatic embryogenesis in *Euterpe edulis* Martius using auxin analogs and atomic force microscopy**. Scientia Horticulturae, v. 331, p. 113164, 2024.
- DE SOUZA, J. A.; SOUSA, Z. L. **Estudo da atividade biológica do extrato etanólico da *Peperomia pellucida* (L.) Kunth**. Revista Cereus, v. 10, n. 4, p. 147-159, 2018.
- FELIPPE, L. G. **Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): abordagem de aspectos estruturais, metabólitos e biossintéticos**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- FORKET, D. E.; KIEBER, J.; HILL, C. C. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 619-646.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. de. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 115-173.
- INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Flora do Brasil – *Peperomia glabella***. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/?grupo=6&familia=190&genero=Peperomia&especie=glabella>. Acesso em: 24 mar. 2025.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

KLÍMA, P. et al. Plant cell lines in cell morphogenesis research: from phenotyping to - omics. In: **Plant Cell Morphogenesis: Methods and Protocols**. [S.l.: s.n.], 2019. p. 367- 376.

LI, N. et al. **Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from Peperomia duclouxii**. Journal of Natural Products, v. 66, n. 11, p. 1421-1426, Dec. 2003.

MARIANO, G. F. **Desinfestação, estabelecimento e calogênese in vitro de Paubrasilia echinata Lam E. Gagnon, H. C. Lima & G. P. Lewis**. 2024. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2024.

MICHEL, J. L. et al. **Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of Piper hispidum Swingle (Piperaceae)**. Journal of Ethnopharmacology, v. 129, n. 2, p. 220-226, May 2010.

PEPEROMIA galioides: **investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids**. Journal of Natural Products, v. 64, n. 10, p. 1357-1359, Oct. 2001.

RHO, M.-C. et al. **Acat inhibition of alkamides identified in the fruits of Piper nigrum**. Phytochemistry, v. 68, n. 6, p. 899-903, Mar. 2007.

SCISPACE. **Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram**. s.d. Disponível em: <https://scispace.com/pdf/efeito-dos-reguladores-de-crescimento-dicamba-e-picloram-na-4aiuedq7np.pdf>. Acesso em: 29 set. 2025.

SEN, S.; RENGAIAN, G. **A review on the ecology, evolution and conservation of Piper (Piperaceae) in India: future directions and opportunities**. The Botanical Review, p. 1-26, 2022.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p.

TERHAAG, K. **Efeitos de tipos de explantes e auxinas no crescimento e produção de metabólitos secundários em culturas celulares de Passiflora setacea BRS Pérola do Cerrado**. 2020. Repositório UFSC. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/204047>. Acesso em: 29 set. 2025.

THORPE, T. A.; PATEL, K. R. Clonal propagation: adventitious buds. In: VASIL, I. (ed.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications**. Orlando: Academic Press, 1984. v. 1, p. 49-60.

TITON, M. **Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram**. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rarv/a/tJnFQX6GWrqzRB86rKHwJGS/>. Acesso em: 29 set. 2025.

VILLEGAS, L. F. et al. **(+)-epi-alfa-bisbolol is the wound-healing principle of Peperomia galioides: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids**. Journal of Natural Products, v. 64, n. 10, p. 1357-1359, Oct. 2001.

WERNER, E. T. et al. **Controle da calogênese do pau-brasil in vitro**. Revista Árvore, v. 33, p. 987-996, 2009.

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).