

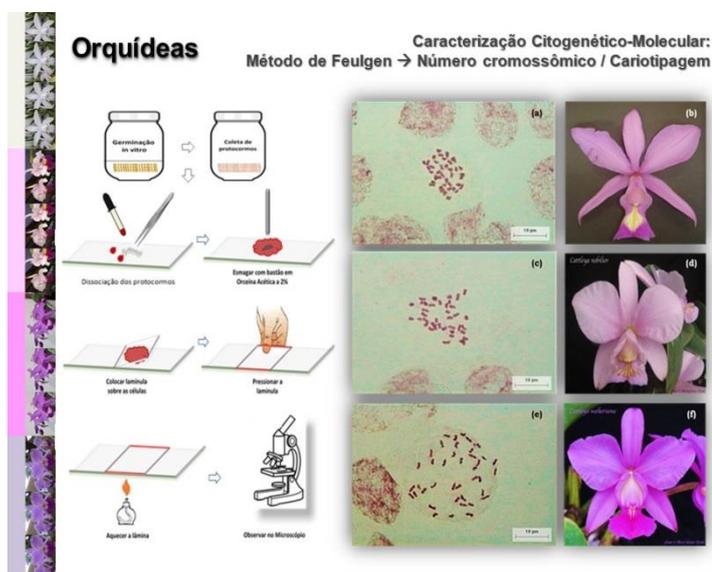
# ORQUÍDEAS E PIMENTAS EM PERSPECTIVA: ... DA GERMINAÇÃO IN VITRO AOS BIORREATORES

Dra. Mônica Rosa Bertão<sup>1</sup>

Plantas como as orquídeas do gênero *Cattleya* (Orchidaceae) e as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceae) têm sido foco de inúmeras pesquisas em diferentes áreas do conhecimento, seja devido à sua beleza, seu potencial biotecnológico, seu benefício nutricional e, principalmente, pela sua importância no agronegócio brasileiro e mundial.

O Brasil é detentor de uma grande diversidade de espécies nativas de orquídeas, algumas amplamente exploradas no cultivo comercial, enquanto outras se encontram em risco de extinção. Em se tratando de espécies endêmicas do gênero *Cattleya*, são 95 espécies distribuídas no território nacional, sendo 14 somente no Estado de São Paulo. O interesse dos orquidicultores por tais espécies está na beleza, forma, tamanho e durabilidade das flores, em seus aromas. E na pesquisa científica outras particularidades têm sido objeto de avaliação, como os conflitos taxonômicos, as divergências citogenéticas e moleculares e o potencial biotecnológico para produção de mudas, com especial atenção para estudos de germinação assimiótica e micropropagação.

Pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (LabVeg), vinculado ao Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Letras da Unesp, Campus de Assis, vem explorando espécies de *Cattleya* e outras, em diferentes vertentes. Quanto ao conhecimento relativo à citogenética da família Orchidaceae, que tem contribuído para o entendimento das relações filogenéticas em todos os níveis taxonômicos em



vários gêneros, foi confirmado o número cromossômico de *Cattleya walkeriana*, *C. nobilior* e *C. mesquiteae* como  $2n = 40$  cromossomos, através da aplicação do Método de Feulgen. O mesmo método tem sido utilizado para elucidar conflitos taxonômicos envolvendo *Cattleya guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*, já que muitos taxonomistas consideram *C. tigrina* e *C. leopoldii* como sinônimos de *C. guttata*.

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Grupo de Engenharia de Bioprocessos, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Letras, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Assis, Brasil, Avenida Dom Antonio 2100, Bairro Parque Universitário, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil. E-mail: mrbertao@assis.unesp.br, Telefone: +55-18-3302-5848

Objetivando elucidar relações filogenéticas entre as espécies, ferramentas moleculares como marcadores ISSR foram usados para determinar relações entre *C. guttata*, *C. tigrina* e *C. leopoldii*. A análise do padrão total de bandas demonstrou elevada taxa de polimorfismo (96,9%) para as espécies e evidenciou que *C. guttata* e *C. leopoldii* são espécies mais relacionadas do ponto de vista molecular e mais distantes de *C. tigrina*.



## Orquídeas

Caracterização Citogenético-Molecular:  
Extração de DNA (CTAB)  
Marcadores Moleculares: ISSR

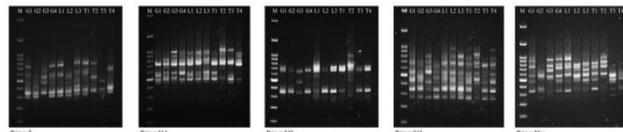
Moraes, M. C., Bertão, M. R., Loose, P. V., dos Santos Cordeiro, A. F., & Palmieri, D. A. (2014). Molecular Study on Endemic *Cattleya* Species from Brazilian Flora. *American International Journal of Biology*, 77-84.



Flores de (A) *Cattleya tigrina*; (B) *Cattleya leopoldii*, (C) *Cattleya guttata*.

Índices de  $2n = 40$   
cromossomos

Marcadores ISSR – (Internal Simple Sequence Repeat)



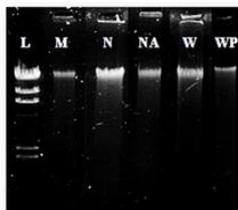
## Orquídeas

Caracterização Citogenético-Molecular:  
Extração de DNA (CTAB)

Otimização das etapas de extração de DNA de espécies de *Cattleya*  
Rodrigues, F. G.; Bertão, M. R.



(1) *C. mesquitae*, (2) *C. nobilior*, (3) *C. nobilior* var. *amaliae*, (4) *C. walkeriana* e (5) *C. walkeriana* var. *princeps*.



Eletroforese em gel de agarose 0,8%, (L) Marcador Lambda, (M) *C. mesquitae*, (N) *C. nobilior*, (NA) *C. nobilior* var. *amaliae*, (W) *C. walkeriana* e (WP) *C. walkeriana* var. *princeps*.



## Orquídeas

Caracterização Citogenético-Molecular:  
Marcadores Moleculares: ISSR

Análise de ferramentas moleculares para o estudo de espécies no gênero *Cattleya* (Orchidaceae). Rodrigues, F. G.; Bertão, M. R.; Palmieri, D. A.; Moraes, M. C. 2015.

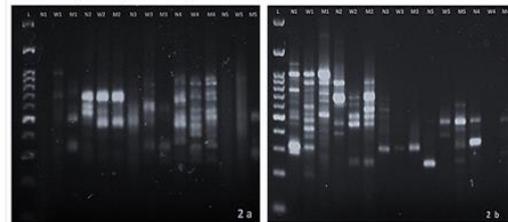
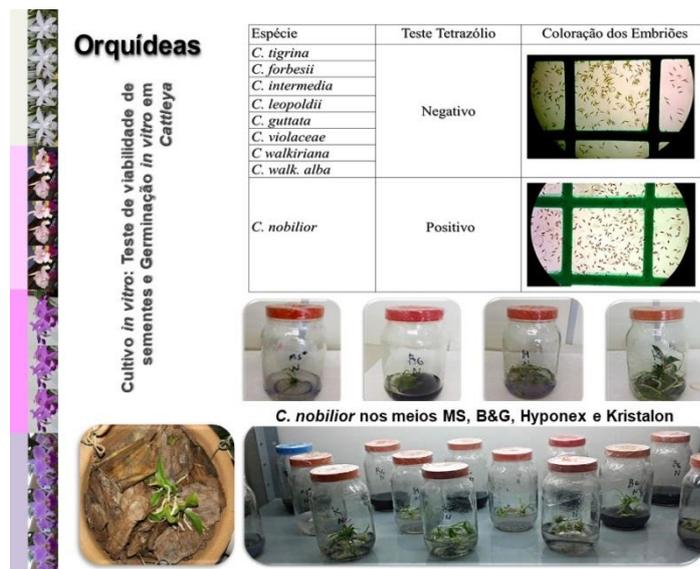
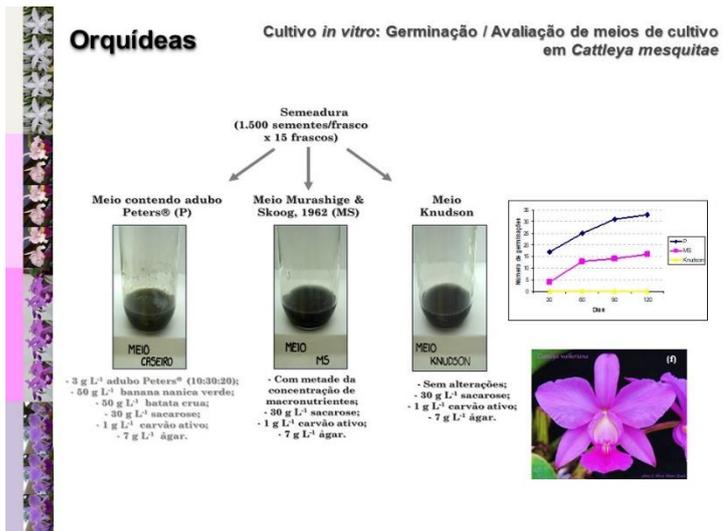


Figura 2. Géis resultantes das reações de amplificação empregando os coquetéis de amplificação 1 (a) e 2 (b), onde: (N) *C. nobilior*, (V) *C. walkeriana* Gardner e (M) *C. mesquitae* em cada primer, (L) Marcador Ladder; (N1, W1 e M1) primer 7; (N2, W2 e M2) primer 814; (N3, W3 e M3) primer 843; (N4, W4 e M4) primer MAO e (N5, W5 e M5) primer 844.

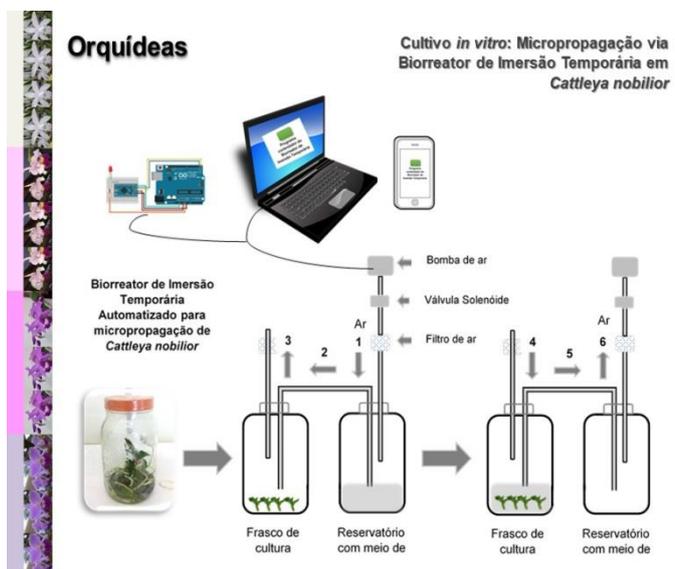
O aspecto mais importante considerado para os estudos com as orquídeas no LabVeg tem sido seu potencial para o cultivo *in vitro*. E, neste contexto, exploramos diferentes aspectos, desde mecanismos relacionados ao processo de germinação *in vitro* até parâmetros envolvidos no estabelecimento de biorreatores visando a micropropagação de espécies de interesse.

Sabendo-se que a polinização das orquídeas na natureza é limitada, com baixa probabilidade de germinação das sementes, diferentes protocolos de cultivo *in vitro* vem sendo desenvolvidos, utilizando formulações variadas de meios de cultivo, mais adequados e adaptados a germinação de sementes e ao crescimento das diferentes espécies, resultando em maiores percentuais de germinação, em comparação com condições naturais. A prioridade do LabVeg é a avaliação do uso potencial de meios convencionais simplificados para a germinação *in vitro* e meios suplementados com fertilizantes comerciais (Kristalon™ laranja, Biofert® Plus Universal, Hyponex®, JR Peters Inc. Blossom Booster) e/ou meios com aditivos orgânicos (polpa de banana, batata, extrato pirolenhoso) para o desenvolvimento das plântulas.



Meios de cultura suplementados com fertilizantes comerciais têm sido efetivos para a germinação e crescimento de plantas das espécies *Cattleya mesquitae*, *C. nobilior*, *Guarianthe bowringiana* (*Cattleya bowringiana*). Os resultados indicam que tais espécies apresentam exigência nutricional relativamente baixa para germinação e desenvolvimento *in vitro*, não sendo necessário o uso de meios de alta complexidade nutricional.

O LabVeg vem utilizando estratégias empreendedoras no desenvolvimento de ferramentas inovadoras com potencial para geração de novos produtos ou processos, como o estabelecimento de um biorreator para micropropagação de espécies de *Cattleya* de importância para o agronegócio local, como *C. nobilior*, uma espécie muito



admirada, que apresenta porte pequeno e flores grandes com variações de cores incríveis e raras, o que a torna uma espécie de valor elevado conforme a qualidade e variedade da planta.

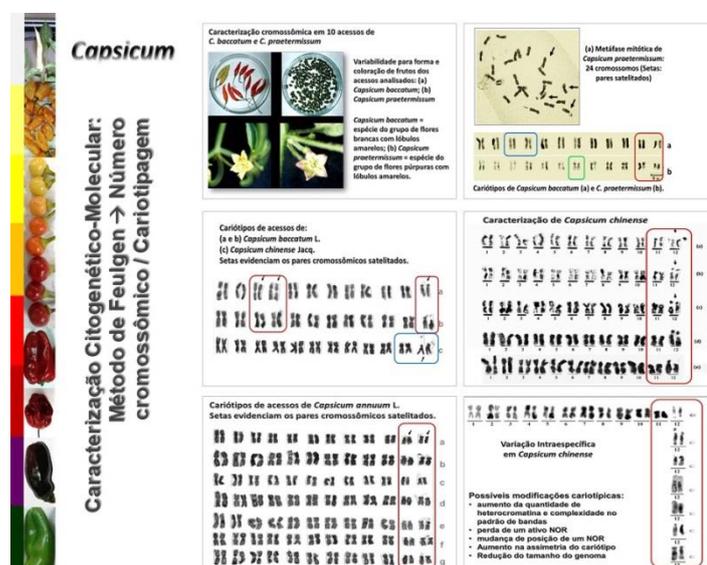
Outro grupo de plantas tem sido avaliados no LabVeg, as pimentas e pimentões pertencentes ao gênero *Capsicum*. O Brasil é o principal centro de origem e domesticação de espécies cultivadas e silvestre de *Capsicum* e neste gênero observamos cerca de 36 espécies, das quais cinco são amplamente cultivadas pelo homem desde os primórdios da Agricultura. Atualmente, inúmeras variedades morfológicamente distintas das espécies cultivadas (*Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacquin., *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pavon) podem ser encontradas em mercados e feiras livres, abastecendo a agroindústria mundial, sustentando a agricultura familiar e criando perspectivas no crescimento da área cultivada e no consumo para os mercados interno e externo, seja na forma *in natura* ou processada (condimentos, conservas, temperos).

O que atrai a atenção de pesquisadores de todo o mundo para as espécies de *Capsicum* é o fato de que as mesmas constituem uma rica fonte de compostos bioativos, com destaque para os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), carotenoides envolvidos na pigmentação dos frutos (capsantina,  $\beta$ -criptoxantina, capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, p.ex.), alguns dos quais responsáveis pela ardência (pungência) e vitaminas dos complexos C, E, A ( $\beta$ -caroteno e provitamina A) e B (B2-riboflavina, B3-niacina, B6). Tais compostos vêm sendo extensivamente explorados quanto às suas propriedades funcionais como antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antialérgicos, antimutagênicos, hormonais, anti-hemorragicos, antivirais ou antibacterianos e assim empregados na conservação de alimentos ou como agentes no controle de processos complexos como neuropatia diabética, osteoartrite, psoríase e obesidade, entre outras enfermidades que afligem o homem.

Os “Capsicums” apresentam outras particularidades importantes, seja em termos das relações de parentesco entre as espécies, na evolução de seus cariótipos, na sua ampla variabilidade genética. Recursos genéticos de *Capsicum* têm sido identificados, caracterizados, avaliados, conservados e explorados em programas de melhoramento visando a promoção do desenvolvimento agrícola sustentável e na produção alimentícia.

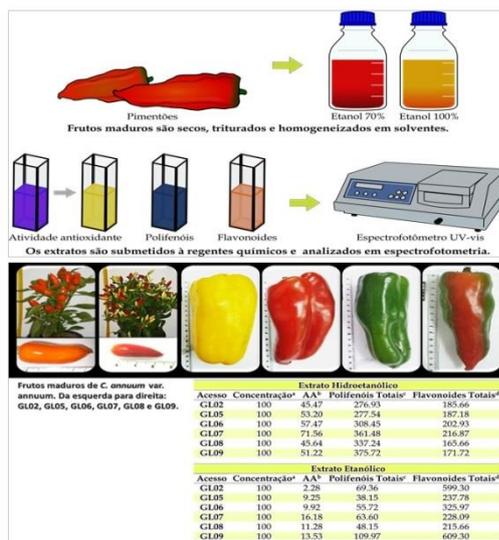
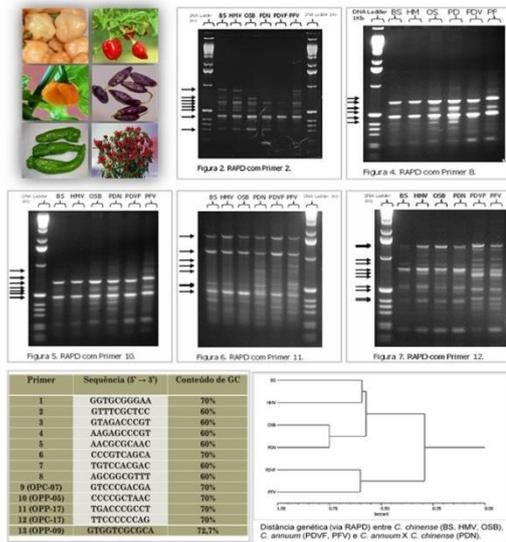
Considerando este panorama, o LabVeg, vem desenvolvendo ações que envolvem desde pesquisas de caracterização dos recursos genéticos até projetos de germinação e cultivo de células *in vitro*.

Variedades cultivadas e semi-cultivadas de *Capsicum* consumidas por populações locais, vêm sendo analisadas



para verificação da ocorrência de polimorfismos cromossômicos intra e interespecíficos que podem auxiliar na elucidação de questões referentes à evolução cariotípica do gênero.

Marcadores moleculares RAPD tem permitido a caracterização da variabilidade genética em *Capsicum annum*, *C. chinense*, acessos de provável origem híbrida e outras espécies. Níveis expressivos de polimorfismo entre os acessos foram demonstrados, comprovando a grande diversidade genética existente nas espécies cultivadas e, complementando tais análises, marcadores moleculares ISSR têm sido ensaiados.



Extratos de frutos maduros dos materiais caracterizados quanto ao número e morfologia cromossômica e marcadores moleculares vêm sendo avaliados quanto aos níveis de compostos bioativos como fenóis, flavonóides e capsaicinóides e a sua atividade antioxidante e aqueles com atividade expressiva explorados quanto a sua competência para o desenvolvimento *in vitro*.

Espécies semi-cultivadas como *C. praetermissum* tem mostrado maior atividade antioxidante total, maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonóides e níveis mais elevados de capsaicina e dihidrocapsaicina em comparação a *C. annum*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. chinense*. Os extratos de *C. praetermissum* e *C. baccatum* apresentaram baixo potencial citotóxico



Bertão MR, Moraes MC, Palmieri DA, Pereira SI L, Gonçalves RM. 2016. Cytotoxicity, Genotoxicity and Antioxidant Activity of Extracts from *Capsicum* spp. Res J Med Plants. 10:265-275.

Tabela 1 – Identificação dos genótipos de *Capsicum* spp.

Espécies	Nome popular	Cor do fruto no estágio maduro
<i>Capsicum annum</i>	Pimenta Ornamental	Vermelho/ Escuro
<i>Capsicum baccatum</i>	Pimenta Lemon Drop Hot	Verde claro
<i>Capsicum chinense</i>	Pimenta Bodinho	Vermelho
<i>Capsicum frutescens</i>	Pimenta Tabasco	Vermelho
<i>Capsicum praetermissum</i>	Pimenta Cumari Verdadeira	Vermelho

Extensiva variabilidade no conteúdo de fenóis totais, flavonóides e capsaicinóides

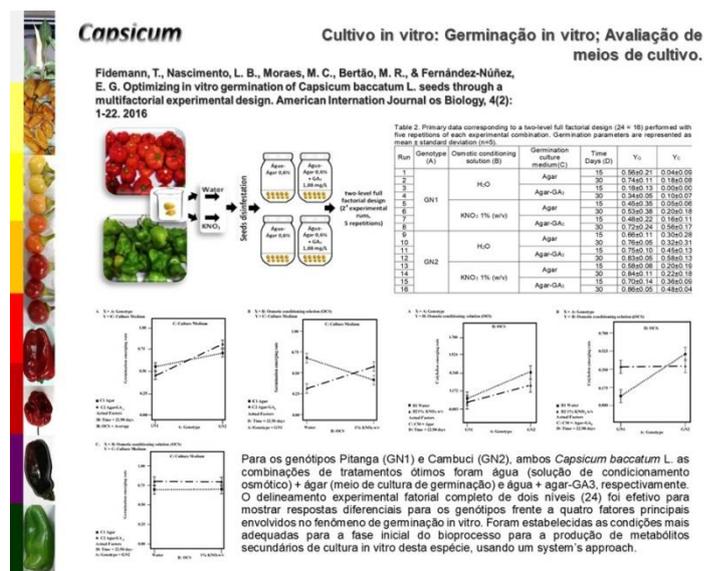
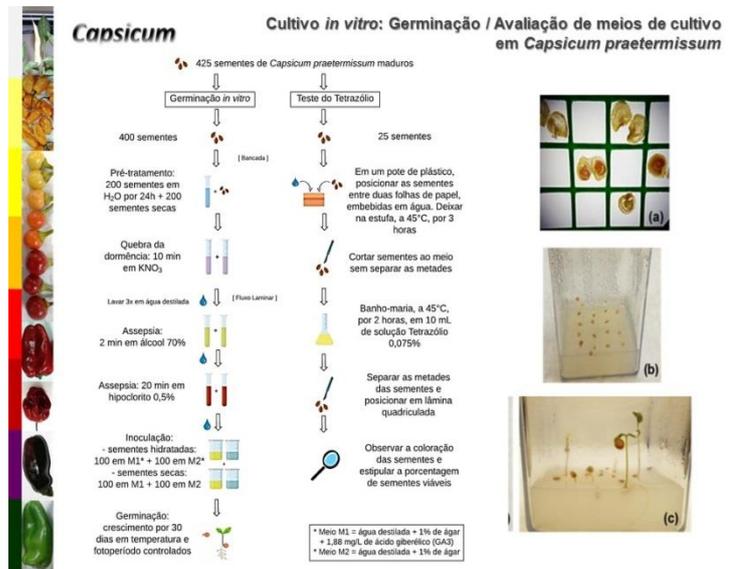
Relação direta entre o conteúdo de biocompostos e atividade antioxidante

***Capsicum praetermissum***

- conteúdo significativo de biocompostos
- atividade antioxidante significativa
- Níveis de toxicidade e genotoxicidade reduzidos
- Perspectiva do uso dessa espécie como fonte de biocompostos
- Exploração como quimioprotetores.

e genotóxico em comparação com outros genótipos, abrindo perspectivas para o uso seguro e sustentável, seja na produção de fármacos ou cosmética.

Acessos contendo as maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonóides, níveis elevados de capsaicina e dihidrocapsaicina e baixo potencial citotóxico e genotóxico como *C. praetermissum* e *C. baccatum* têm sido explorados em experimentos de germinação *in vitro*. Protocolos estão sendo otimizados para a obtenção de explantes axênicos visando o estabelecimento de cultura de calos e células em suspensão.



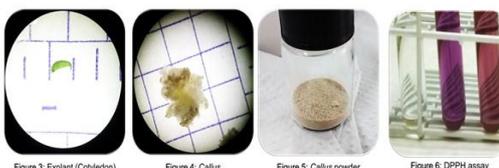
Variáveis críticas de operação associadas às etapas de cultivo de células em suspensão de *Capsicum baccatum*, utilizando sistema de frascos em agitação, têm sido avaliadas para produzir metabólitos secundários com propriedades antioxidantes. Os resultados empregados no estabelecimento de um bioprocesso a ser executado em biorreator tipo tanque com agitação e aeração, permitindo o escalonamento da produção de extratos com propriedades

antioxidantes.

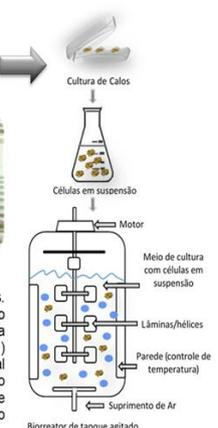
Assim, através da pesquisa científica o LabVeg tem procurado a aplicação e desenvolvimento de estratégias clássicas e inovações tecnológicas que possam contribuir com o conhecimento e exploração da rica biodiversidade

**Capsicum** Cultivo in vitro: Cultura de calos; Cultura de Células em Suspensão; Biorreator

Fidemann, T., Pereira, G. A. de A., Nascimento, L. B., Moraes, M. C., Bertão, M. R., Silva, R. M. G. da & Fernández-Núñez, E. G. Holistic protocol for callus culture stage optimization using statistical modelling. *Natural Product Research*. 2017



Otimização da cultura do calo em *Capsicum baccatum* para produzir polifenóis. Avaliação sistemática dos efeitos origem do explante (raiz, hipocótilo e cotilédone), tipo homônio do crescimento (2,4-Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e uma combinação de 2,4-D / BAP (5:1) e concentração (0,023-10,000 mg L<sup>-1</sup>) nos parâmetros de eficiência da cultura de calos, usando um delineamento fatorial multinível. As principais respostas avaliadas e seus valores ótimos foram massa do calo (225,03 mg), atividade antioxidante (35,95 %), fenóis totais (11,48 mg de GAE/g DE) e produção de flavonóides (15,92 mg de RU/g DE) encontrada no explante raiz usando BAP a 1,138 mg de L<sup>-1</sup>.



brasileira, bem como com a agricultura através do estudo de espécies vegetais de interesse econômico.