

Desenvolvimento de protocolo de desinfestação de explantes de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)

Development of a protocol for disinfestation of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) explants

Maria Eduarda Vilas Boas¹, Glauco Vieira Miranda²

RESUMO

A *Tropaeolum majus* L. é uma planta conhecida popularmente como capuchinha e pertence à família Tropeoláceas. É uma espécie versátil que pode ser caracterizada como planta ornamental, hortaliça não convencional e planta medicinal. A micropropagação é um método eficiente de se multiplicar uma espécie de interesse agrônômico em alta escala e uma das primeiras etapas é a desinfestação, pois se utiliza meio de cultura estéril. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de desinfestação para a cultura de tecidos de *Tropaeolum majus* com a finalidade de produção em grande escala de extração de bioativos. Para isso, foram realizados oito experimentos, variando a solução de desinfestação, a sua concentração e seus componentes e o tempo de imersão do explante na solução. O protocolo mais eficiente para a desinfestação foi a solução de hipoclorito de sódio a 0,25% e uma gota de detergente neutro por sete minutos em agitação constante.

PALAVRAS-CHAVE: capuchinha; cultivo *in vitro*; plantas alimentícias não convencionais.

ABSTRACT

Tropaeolum majus L. is a plant popularly known as nasturtium and belongs to the Tropeoláceas family. It is a versatile species that can be characterized as an ornamental plant, an unconventional vegetable and a medicinal plant. Micropropagation is an efficient method of multiplying a species of agronomic interest on a large scale and one of the first steps is disinfestation, as sterile culture media are used. The objective of this work was to develop a disinfestation protocol for *Tropaeolum majus* tissue culture for the purpose of large-scale production of bioactive extraction. For this, eight experiments were carried out, varying the disinfestation solution, its concentration and components and the time of immersion of the explant in the solution. The most efficient protocol for disinfestation was a 0.25% sodium hypochlorite solution and a drop of neutral detergent for seven minutes with constant agitation.

KEYWORDS: nasturtium; *in vitro* cultivation; non-conventional food plants.

INTRODUÇÃO

A *Tropaeolum majus* L. é uma flor nativa do México e do Peru, conhecida popularmente como capuchinha, pertence à família Tropeoláceas, e é uma espécie versátil que pode ser caracterizada como planta ornamental, hortaliça não convencional e planta medicinal. É uma planta herbácea com folhas redondas e planas e flores vistosas, que podem variar entre branca, amarela, laranja e vermelha, atinge cerca de 2 a 3 metros de comprimento e 30 a 40 cm de altura (EBERT *et al.*, 2021).

A capuchinha na alimentação contribui de diversas maneiras para o consumidor, possui um sabor apimentado e embeleza os pratos, e o mais importante auxilia no combate de radicais livres, é fonte de luteína, antocianinas, benzil glucosinolato e vitamina C. Como planta medicinal possui propriedades expectorante, anti-oxidante,

¹ Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: maralv@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 0865349429783859.

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: glaucovmiranda@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1581269691451530.

anti-inflamatório, hipotensor e o extrato da flor possui capacidade fotoprotetora contribuindo para a dermatologia (SOUZA, 2020).

A cultura de tecido se torna uma ferramenta para a propagação da mesma. Ademais, permite que a planta seja cultivada em ambiente controlado livre de patógenos e sem a interferência de fatores ambientais. Porém, para se chegar a inúmeros clones são necessárias algumas etapas, a primeira delas é a desinfestação do explante. A assepsia do explante e seu estabelecimento *in vitro* é um dos principais determinantes do sucesso da micropropagação (SANTOS, 2021).

Segundo Matallana *et al*, (2006) a capuchinha foi multiplicada *in vitro* com sucesso para a quantificação de benzil glucosinolato. A micropropagação em massa de 10.000 mudas foi realizada seguida de transplante para viabilizar a extração industrial dos bioativos de interesse medicinal (Kleinwächter *et al.*, 2008).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de desinfestação para a cultura de tecidos de *Tropaeolum majus* com a finalidade de produção em grande escala e extração de bio metabólicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de melhoramento e sementes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Santa Helena.

Oito experimentos foram realizados durante o período de três meses com 18 combinações do protocolo de desinfestação. Todos os experimentos possuíam o seguinte protocolo:

1 - Todos os materiais como papel germitest, placas de petri, pinças, béqueres e água destilada foram autoclavados;

2 - A câmara de fluxo laminar foi esterilizada com álcool 70% e luz UV;

3 - Os explantes de segmentos nodais de capuchinha foram lavados com água corrente por dois minutos;

4 - Os explantes foram agitados de maneira constante em 100 ml de solução total completado com água destilada autoclavada. O tempo e os demais componentes da solução foram estabelecidas de acordo com os experimentos e tratamentos (Tabela 1);

6 - Após a imersão dos explantes na solução desinfestante foi realizada a tríplice lavagem em água destilada autoclavada e transferidos para o papel germitest autoclavado para retirar o excesso de água.

7 - O explante foi transferido para a placa de petri contendo meio de cultura MS que posteriormente foi lacrada e mantida em BOD até a avaliação

Tabela 1 – Diferenciação dos experimentos e das soluções de imersão da desinfestação

| Experimento | Data | Tratamento | Hipoclorito de sódio % | Tempo minutos | Reagente ou acesso | Tempo minutos |
|-------------|-------|------------|------------------------|---------------|--------------------|---------------|
| 1 | 11/10 | 1 | 2,5 | 3 | | |
| 1 | 11/10 | 2 | 2,5 | 5 | | |
| 1 | 11/10 | 3 | 2,5 | 7 | | |



| | | | | | | |
|---|-------|---|-------------------|----|-----------------------|-------|
| 2 | 21/10 | 1 | 2,5 | 2 | | |
| 2 | 21/10 | 2 | 2,5 | 2 | Cercobin | 3 |
| 3 | 28/10 | 1 | 0,25 | 1 | Álcool 70% | 1 |
| | | 2 | 0,25 | 1 | Álcool 70% e Cercobin | 1 e 1 |
| 3 | 28/10 | | | | | |
| 4 | 04/11 | 1 | 0,25 e detergente | 10 | | |
| 4 | 04/11 | 1 | 0,25 e detergente | 20 | | |
| 5 | 11/11 | 1 | 0,25 e detergente | 3 | | |
| 5 | 11/11 | 2 | 0,25 e detergente | 5 | | |
| 5 | 11/11 | 3 | 0,25 e detergente | 7 | | |
| 6 | 18/11 | 1 | 0,15 e detergente | 7 | | |
| 6 | 18/11 | 2 | 0,20 e detergente | 7 | | |
| 6 | 18/11 | 3 | 0,25 e detergente | 7 | | |
| 7 | 02/12 | 1 | 0,25 e detergente | 7 | caule verde | |
| 7 | 02/12 | 2 | 0,25 e detergente | 7 | caule roxo | |
| 8 | 09/12 | 1 | 0,25 e detergente | 7 | | |

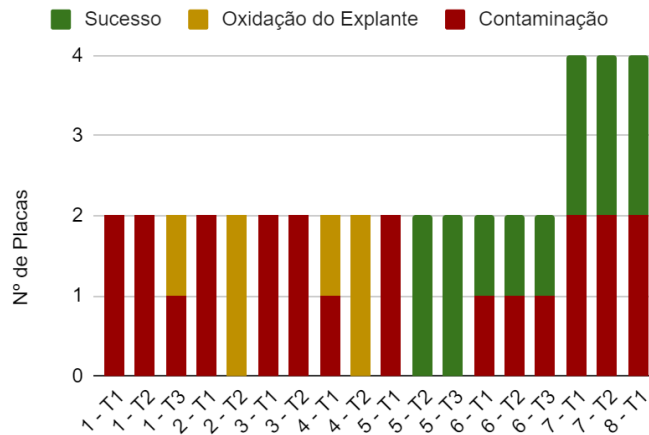
Fonte: Autores (2023).

RESULTADO E DISCUSSÃO

No experimento 1 (11/10), os explantes de capuchinha morreram ou foram contaminados demonstrando que a desinfestação exclusivamente com hipoclorito de sódio a 2,5% (água sanitária) com diferentes tempos de imersão do explante na solução não foram eficientes (Figura 1).

O uso de fungicida pode ajudar a matar patógenos resistentes a meios convencionais de assepsia (Koguta et al., 2017). Assim, no experimento 2 (21/10), os explantes foram imersos em solução com hipoclorito 2,5% por 2 min e todas as placas foram contaminadas. Também, os explantes foram desinfetados em solução com hipoclorito 2,5% e o fungicida Cercobin 850 WG (Tiofanato-metilico) na dosagem de 0,9 g L⁻¹ por dois minutos. Todos os explantes tratados desta maneira oxidaram (Figura 1).

Figura 1 – Número de placas de petri com explantes que apresentaram sucesso, oxidação do explante ou contaminação de acordo com os protocolos de desinfestação



Fonte: Autores (2023).

No experimento 3 (28/10), os explantes foram desinfetados em álcool 70% por 1 min seguido por hipoclorito 0,25% e houve contaminação de todas as placas. No outro tratamento foi acrescentado o fungicida Cercobin, porém os explantes também morreram (Figura 1).

No experimento 4 (4/11), utilizou-se a solução de hipoclorito de sódio a 0,25%, variando apenas o tempo de imersão em solução sob agitação. Em três minutos de imersão houve contaminação dos meios de cultura e com 10 minutos ocorreram as oxidações dos explantes (Figura 1).

No experimento 5 (11/11), utilizou-se a solução de hipoclorito 0,25% e 1 gota de detergente com três tempos de imersão com agitação, 3 minutos, 5 minutos e 7 minutos. Os tempos de 5 e 7 min em agitação nesta solução obtiveram 100% de sucesso enquanto com 3 minutos todas as placas foram contaminadas (Figura 1). A figura 2 mostra um dos explantes saudáveis submetidos a 7 minutos de agitação.

Figura 2 – Explante de capuchinha após 7 dias em meio MS



Fonte: Autores (2023).

No experimento 6 (18/11), os tratamentos apresentaram diferenças nas concentrações de hipoclorito de sódio em solução com agitação. Não houve diferença entre utilizar 0,15%, 0,20% ou 0,25%, porém ocorreu contaminação em uma de duas

placas de petri nos três tratamentos, possivelmente por erro de manipulação, uma vez que esta solução no tempo de imersão de 10 minutos se mostrou eficiente na desinfestação do experimento 5 (Figura 1).

Também foi avaliado se existia diferença entre diferentes acessos de capuchinha no experimento 7 (02/12). Assim, foram cultivados dois explantes com diferença na pigmentação do caule, com e sem antocianina. Ambos explantes no meio de cultura apresentaram 50% de placas não contaminadas, demonstrando que não houve diferença entre os acessos (Figura 1).

Por fim, no experimento 8 (12/12) foi repetido o protocolo de desinfestação de maior sucesso para segmentos nodais de *Tropaeolum majus* com a solução de hipoclorito de sódio a 0,25% em agitação constante por 7 min, repetindo o resultado de 50% de sucesso.

Além de realizar minuciosamente o protocolo de desinfestação, o técnico responsável deve ser treinado em boas práticas laboratoriais, para minimizar ao máximo as chances de contaminação da cultura de tecidos mesmo com protocolo otimizado.

A contaminação foi um obstáculo na micropropagação e causou perdas de materiais e mudas. Os contaminantes surgiram do material propagado, de ferramentas mal esterilizadas e de erros de manipulação na câmara de fluxo laminar.

Também o conhecimento sobre a morfologia da planta facilitou o processo de assepsia e a manutenção da qualidade fisiológica dos explantes. No caso da capuchinha, uma planta herbácea e sensível a tratamentos com produtos químicos, uma das dificuldades foi esterilizar sem causar a oxidação do explante a ser propagado. Em contrapartida, a baixa ocorrência de tricomas no caule permitiu uma menor contaminação da capuchinha durante o processo de desinfestação quando comparado a plantas pilosas, uma vez que os tricomas servem como abrigo para patógenos.

CONCLUSÃO

O protocolo mais eficiente para a desinfestação de *Tropaeolum majus* foi com a solução de hipoclorito de sódio a 0,25% e uma gota de detergente neutro por sete minutos em agitação constante.

É necessário que se realize mais trabalho sobre o cultivo *in vitro* de *Tropaeolum majus*.

Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pela concessão da bolsa e do material necessário para a realização deste trabalho.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

EBERT , E. F. *et al.* Capuchinha (*Tropaeolum majus*) compostos bioativos e sua funcionalidade no organismo. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 16, p. e05101622623, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i16.22623. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/22623>. Acesso em: 19 set. 2023.

KLEINWÄCHTER *et al.* Experimental field cultivation of in vitro propagated high-yield varieties of *Tropaeolum majus* L. **Journal of Applied Botany and Food Quality** 82, 55 - 59 2008. Disponível em: <https://ojs.openagrar.de/index.php/JABFQ/article/view/2080>. Acesso em: 23 set. 2023.

KOGUTA, K.V. *et al.* Adição de fungicidas ao meio de cultura na introdução in vitro de *Acacia mearnsii* De Wild. **Espacios**, 38 (59):26-31, 2017. Disponível em: <https://www.revistaespacios.com/a17v38n59/a17v38n59p26.pdf> Acesso em 23 set. 2023

MATALLANA, L., KLEINWÄCHTER, M., SELMAR, D. Sulfur is limiting the glucosinolate accumulation in nasturtium in vitro-plants (*Tropaeolum majus* L.). **Journal of Applied Botany and Food Quality** 80, 1-5. 2006. Disponível em: <https://ojs.openagrar.de/index.php/JABFQ/article/view/2182>. Acesso em: 23 set. 2023.

SANTOS, Milena Áurea Santana dos *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais da Amazônia: uma revisão. **CIÊNCIAS AMBIENTAIS NA AMAZÔNIA**, p. 77. 2021. Disponível em: https://www.academia.edu/download/80571425/Ciencias_Ambientais_na_Amazonia.pdf#page=77. Acesso em: 19 set. 2023.

SOUZA, H. de A. *et al.* Capacidade antioxidante de flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) . **Revista Ponto de Vista**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 73–84, 2020. DOI: 10.47328/rpv.v9i1.9632. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/RPV/article/view/9632>. Acesso em: 19 set. 2023.