

## INFLUÊNCIA DE CITOCININAS EM SUBCULTIVOS *IN VITRO* DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum*)

MOURA, E. F.<sup>1</sup>; LEMOS O. F.<sup>2</sup>; MENEZES I.C.<sup>3</sup>; LAMEIRA O. A.<sup>4</sup>; ROCHA, C. B.R.<sup>1</sup>

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) é uma planta largamente utilizada como condimento na culinária. É de extrema importância para a economia do Pará, que contribui com 90% da economia nacional, sendo o Brasil o quarto maior exportador de pimenta-do-reino. Em 1998 a pimenta-do-reino contribuiu com 3,34% das exportações totais do Pará. A fusariose aparece como uma barreira limitante ao aumento da produção e a baixa variabilidade genética dessa espécie é um problema para os programas de melhoramento genético. Além disso, a produção de pimenta-do-reino vem caindo desde 1991, devido a crescente diminuição da área plantada por fatores climáticos, doenças entre outros. As técnicas de culturas de tecidos surgem como uma alternativa para tentar solucionar estes problemas, já que, entre outras coisas, possibilita a indução de variação genética, produção de mudas assépticas e proliferação *in vitro* de mudas selecionadas. A micropropagação é uma das técnicas de maior utilização comercial, pois possibilita a proliferação de mudas assépticas em curto espaço de tempo e a clonagem de plantas com características agrônômicas superiores.

O presente trabalho tem como objetivo definir protocolo para micropropagação mais eficiente de pimenta-do-reino utilizando diferentes citocininas combinadas ou não com auxina e para então selecionar o tratamento com melhor taxa de brotações por subcultivo.

Foram utilizados frutos maduros de plantas da cultivar guajarina. Estes frutos foram lavados em água corrente com sabão neutro e submetidos a uma pré-asepsia em hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% e colocados a 38<sup>o</sup>C *overnight*. Foram então despulpados e lavados em água destilada e, em câmara de fluxo laminar, tratados com álcool à 70% por 1 minuto e NaOCl 2% por 15 minutos e então lavadas em água esterilizada por 5 vezes. Foram retirados os ápices caulinares das plântulas germinadas *in vitro*, e que foram inoculados em meio básico MS suplementado com AIA (0,0 e 1,25 $\mu$ M) combinado com KIN ou BAP (6,2 ; 12,5 e 25 $\mu$ M) totalizando 12 tratamentos, por 30 dias. A cada 30 dias foram feitos subcultivos para multiplicação de brotos a partir de ápices caulinares e segmentos nodais, inoculados em meio básico MS suplementado com AIA (0,0 e 1,0 $\mu$ M) combinado com BAP ou KIN (5,0 ; 10,0 e 20,0 $\mu$ M) perfazendo 12 tratamentos, sendo que o terceiro subcultivo foi feito com intervalo de 90 dias.

Os dados dos subcultivos foram avaliados segundo esquema da análise da variância inteiramente casualizado com teste de Duncan a 5% para comparação das médias (Tabela 1). Pela análise dos dados, a média geral de emissão de brotos durante o estabelecimento foi de 1,85, não havendo diferenças estatísticas entre as médias dos tratamentos. No primeiro subcultivo a média geral encontrada foi de 4,6 brotos/explante. Entretanto, as médias dos tratamentos também não apresentaram diferenças estatísticas entre si, apesar de diferirem numericamente. A maior média observada foi de 6,25 propágulos/explante no tratamento AB<sub>1</sub> e a menor foi 3,0 propágulos/explante no tratamento AK<sub>3</sub>.

<sup>1</sup> Bolsista do PIBIC/CNPq/EMBRAPA- Acadêmicas do 6<sup>o</sup> semestre do curso de Bacharelado em Biologia-UFGA

<sup>2</sup> Pesquisador M.Sc. Embrapa Amazônia Oriental - CP 48 CEP 66.095-100 Belém-PA

<sup>3</sup> Téc. Especializada M Sc. Embrapa Amazônia Oriental

<sup>4</sup> Pesquisador Dr. Embrapa Amazônia Oriental

No segundo subcultivo a média geral apresentada foi 10,23 propágulos/explante. Ao ser feita a comparação entre as médias, verificou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos e as maiores médias verificadas foram 19,25, 12,88 e 12,62 propágulos/explante para os tratamentos AB<sub>4</sub>, AB<sub>1</sub> e AB<sub>5</sub>, respectivamente. Para o terceiro subcultivo, não foi feita análise estatística. A maior média obtida foi de 18,92 propágulos/explante para o tratamento AB<sub>4</sub> e a menor média 2,06 para o tratamento AK<sub>5</sub>.

Tabela 1: Média de explantes de pimenta-do-reino obtidas no estabelecimento e subcultivos *in vitro* em meio MS suplementado com auxina e citocinina.

Tratamento <sup>1</sup>	Estabelecimento	1º. Subcultivo	2º. Subcultivo	3º. Subcultivo
AB <sub>1</sub>	2,25 a	6,25 a	12,88 ab	18,7
AB <sub>2</sub>	2,00 a	3,75 a	6,66 b	6,1
AB <sub>3</sub>	2,00 a	3,75 a	9,37 b	5,33
AB <sub>4</sub>	2,25 a	5,75 a	19,25 a	18,92
AB <sub>5</sub>	2,25 a	5,75 a	12,62 ab	13,46
AB <sub>6</sub>	1,75 a	3,25 a	6,83 b	3,87
AK <sub>1</sub>	1,25 a	3,25 a	5,16 b	3,00
AK <sub>2</sub>	1,50 a	4,75 a	6,80 b	11,00
AK <sub>3</sub>	1,25 a	3,00 a	9,50 b	4,375
AK <sub>4</sub>	1,75 a	5,00 a	11,55 b	12,89
AK <sub>5</sub>	2,25 a	5,75 a	7,81 b	2,06
AK <sub>6</sub>	1,75 a	5,00 a	10,09 b	3,64

<sup>1</sup>Meio de cultura MS suplementado com ácido indolacético (A - 0 e 1 µM), 6-benzilaminopurina (B- 5,10 e 20 µM) e cinetina (K - 5,10 e 20 µM): AB<sub>1</sub>(1 e 5µM); AB<sub>2</sub>(1 e 10 µM); AB<sub>3</sub> (1 e 20 µM); AB<sub>4</sub> ( 0 e 5 Mm); AB<sub>5</sub> (0 e 10 µM); AB<sub>6</sub> (0 e 20 µM); AK<sub>1</sub> (1 e 5 µM);AK<sub>2</sub> (1 e 10 µM); AK<sub>3</sub> (1 e 20 µM); AK<sub>4</sub> ( 0 e 5 µM); AK<sub>5</sub> (0 e 10 µM); AK<sub>6</sub> (0 e 20 µM).

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si em nível de 5% pelo teste de Duncan

Trabalhos com micropropagação de pimenta-do-reino demonstram que melhor taxa de brotações é produzida em meio suplementado apenas com BAP, independente de combinações com outros reguladores ( Menezes, 1997). No presente trabalho, as melhores médias apresentadas no segundo subcultivo correspondem aos tratamentos com 5 µM de BAP, 1 µM de AIA e 5 µM de BAP e 10 µM de BAP. Estes resultados mostram que a auxina AIA parece não ter influência na produção de brotos. Em geral, os tratamentos com cinetina não foram eficientes como os tratamentos utilizando BAP, concordando que este é o regulador de crescimento mais eficiente e por isso o mais utilizado em experimentos que visam proliferação *in vitro* de brotos das espécies vegetais em geral (Grattapaglia *et al.*, 1990)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EXPORTAÇÕES sofrem queda. **O Liberal**, Belém, 1 mar. 1999

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura. p. 99 - 170, 1990

MENEZES, I. C.; Morfogênese *in vitro* em tecido somático de pimenta-do-reino ( *Piper nigrum* L. ). Belém: Mestrado - Universidade Federal do Pará. 1997. 86p.

PEPPER REPORT, Castanhal: OKAJIMA- Agrocomercial Ltda, 1998.