



Belém (PA), 18 a 20 de Novembro de 2015.
ISSN 2316-7637

ANAIS

Artigos Aprovados – 2015

Volume III

ISSN: 2316-7637



**Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Naturais e
Tecnologia**
18, 19 e 20 de novembro de 2015

GERMINAÇÃO IN VITRO E FORMAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *Piper divaricatum* G. MAYER SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Rosana Silva Corpes¹, Ilmarina Campos de Menezes², Jéssica Manoelli Costa da Silva³,
Orlando Maciel Rodrigues Junior⁴

¹ Mestre em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará. E-mail:
rosanacorpes@hotmail.com

² Doutora em Genética e Biologia Molecular. Embrapa Amazônia Oriental.

³ Graduanda em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará

⁴ Graduando em Agronomia. Universidade Federal Rural da Amazônia

RESUMO

A espécie *Piper divaricatum* G. Mayer é uma piperácea encontrada na Amazônia brasileira e possui em seu óleo essencial metabólitos com propriedades antioxidante e fungicida. Descobertas recentes apontam que a mesma possui tolerância in vivo contra o fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*). A micropropagação pode se tornar importante para esta espécie devido à mesma possibilitar a clonagem e multiplicação de plantas em qualquer época e com boa qualidade fitossanitária. Outro fator de relevância é que as sementes desta piperácea levam em torno de dez meses para atingir o seu estágio de maturação logo, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para conservação in vitro de *P. divaricatum* através de sementes visando obter estudos mais aprofundados em relação ao metabolismo secundário, bem como sua possível utilização em programas de melhoramento. Para o estabelecimento do cultivo in vitro, sementes foram inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog) e ½ MS (meio Murashige e Skoog com a metade da concentração dos sais), acrescido do antibiótico sulfato de estreptomicina na concentração de 100 mg/mL⁻¹, após a inoculação as sementes foram acondicionadas em estufas incubadoras BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas ou na ausência de luz. Observou-se que para emissão de radícula os maiores percentuais são atingidos ao 30º dia em ambos os tratamentos nas condições de claro e a partir do 35º dia, para os estádios de emissão de hipocótilo com a total formação da plântula. Nas condições de escuro, o percentual de sementes responsivas foi maior para o meio ½ MS, demonstrando que os meios de cultivo bem como as condições de luminosidade influenciam nos aspectos morfológicos do processo de germinação in vitro, podendo apresentar períodos de maior culminância durante os estádios de desenvolvimento.

Palavras-chave: conservação. micropropagação. piperaceae

Área de Interesse do Simpósio: Biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é rica em biodiversidade de espécies, e muitas delas, com grande valor econômico tanto no mercado nacional quanto no internacional. A Amazônia é o melhor exemplo dessa biodiversidade, embora apresente espécies ainda pouco conhecidas e pesquisadas (SANTIAGO, 2003).

Atualmente, a grande demanda das pesquisas concentra-se nas atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas, os quais são utilizados há séculos na medicina popular e nos dias atuais como medicamentos, cosméticos, matéria prima para a química fina e ainda mais recentemente como nutracêuticos (BIAVATTI, et al., 2007; BARBOSA-FILHO et al., 2008).

Nesse contexto, insere-se a espécie *Piper divaricatum* G. Mayer, uma piperácea encontrada na Amazônia brasileira e também conhecida como “pau-da-angola”, “jaborandi-manso” ou “betre”. Esta espécie também é encontrada na América do Sul nos países Bolívia, Brasil (AM, AP, BA, CE, ES, GO, MT, MS, MG, PA, PE, RJ, RO, RR), Colômbia, Equador, Guiana, Peru e Suriname (YUNCKER, 1973; GUIMARÃES e GIORDANO, 2004).

Descobertas atuais indicam que *P. divaricatum* possui um elevado potencial fungicida in vitro e tolerância in vivo contra o fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum*) (MEIRELES, 2014). Estudos feitos com a finalidade de produzir e avaliar a atividade antioxidante de metabólitos secundários sob diferentes condições de cultivo desta espécie durante 90 dias apontaram que no cultivo in vitro de ápices caulinares, os compostos voláteis identificados nas folhas foram metileugenol, β -elemeno e E- β -ocimeno, os quais não diferiram do cultivo in vivo, com exceção dos 90 dias e detectou-se que a atividade antioxidante das raízes foi bastante expressiva. (CORPES, 2015).

Vários trabalhos descrevem diferentes compostos com atividade antioxidante (KOSAR et al., 2005), porém estudos com plantas cultivadas in vitro são escassos e também não se encontram relatados na literatura estudos a respeito destes compostos em *P. divaricatum*. Além disso, a utilização das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais fornecem plantas em qualquer época do ano e constituem uma importante ferramenta para estudos bioquímicos, podendo eleger as mesmas como uma alternativa para produzir os correspondentes metabólitos secundários in vitro (FUMAGALI et al., 2008).

Dessa forma, frente à carência de estudos com o cultivo *in vitro* desta piperácea a micropropagação pode se tornar viável, uma vez que as sementes levam cerca de dez meses para atingir o seu estágio de maturação (CORPES, 2015). Tendo em vista que, a utilização da cultura de tecidos para *P. divaricatum* torna-se uma importante estratégia para sua aplicação em programas de melhoramento, juntamente com *Piper nigrum* para a clonagem e multiplicação de plantas. É de extrema importância que sejam desenvolvidos métodos alternativos para produção em larga escala desta espécie, visando sua aplicação biotecnológica ou até como trato cultural. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para conservação *in vitro* de *P. divaricatum* através de sementes visando estudos mais aprofundados em relação ao metabolismo secundário bem como sua possível utilização em programas de melhoramento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

2.1. Coleta do material Vegetal

Para a produção de plântulas, frutos de *Piper divaricatum* G. Mayer, foram coletados de plantas cultivadas no banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental-Belém/PA em estágio maduro com coloração esverdeada e em seguida estes foram conduzidos ao laboratório e submetidos à pré-asepsia que constou de despulpamento manual das sementes, lavagem com água corrente, imersão em solução de fungicida Derosal a 0,5% (v/v) durante 60 minutos e imersão em rifampicina a 0,1% (v/v) durante 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à solução de etanol a 70% (v/v) por 4 minutos, solução de NaClO a 2,5% (v/v) por 20 minutos e 5 lavagens com água destilada estéril, sendo em seguida secas em papel filtro estéril e transferidas para placas de Petri esterilizadas, posteriormente houve o semeio *in vitro*.

2.2. Ontogênese: Germinação *in vitro* e formação de plântulas

Em câmara de fluxo laminar, as sementes assépticas de *Piper divaricatum* foram semeadas em frascos cilíndricos de 300 mL contendo 30 mL de meio de cultura básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), com a concentração completa (T1) ou com a metade da concentração dos sais, ½ MS (T2), 3% de sacarose, vitamina de MS, 0,2% de Phytigel para solidificação do meio de cultura e adição do antibiótico sulfato de estreptomicina na

concentração de 100mg/mL. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos e pressão de 1,5 atm.

O material inoculado foi acondicionado em estufas incubadoras BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 8 horas ou na ausência de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 10 repetições para cada tratamento sendo cada parcela composta por 10 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e 400 sementes no total. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x2 sendo dois meios de cultura, MS e ½ MS e duas condições de cultivo, luz e escuro.

Os dados foram coletados aos 20, 25, 30, 35 e 40 dias de cultivo e referem-se aos estádios de desenvolvimento observados quanto às sementes sem respostas, emissão de radícula, emissão do hipocótilo e plântula formada a partir da emissão do epicótilo. A avaliação do experimento foi realizada quanto à percentagem de respostas para cada estágio de desenvolvimento durante a germinação in vitro de *Piper divaricatum*, considerando cada tratamento as quais foram submetidas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização morfológica de *Piper divaricatum* foi feita de acordo com as primeiras manifestações de germinação e estas se iniciaram entre o 20° e 30° dia após a semeadura com o intumescimento da micrópila ao nível de embrião. Posteriormente a radícula rompe o tegumento, dando início à germinação ao 25° dia de cultivo, porém, ressalta-se que a radícula é emitida em maior quantidade ao 30° dia após o semeio.

Aos 35 dias, a raiz começa a apresentar escurecimento em sua coloração, ganhando tonalidade levemente amarronzada. Neste período percebe-se o surgimento de raízes secundárias e também é possível notar o surgimento de pêlos translúcidos. O ápice para a emissão do caulículo ocorre neste período e em seguida surge o hipocótilo que aos 40 dias após a semeadura apresentou-se em maior número nas plântulas observadas. O caulículo se diferencia do hipocótilo devido ao mesmo apresentar-se curvado e com coloração verde-clara, enquanto que o hipocótilo é epigeo, cilíndrico e longo em relação ao epicótilo, cuja coloração é verde escura.

Em concordância com a classificação de Duke e Polhill, (1981) a espécie apresenta germinação epigea, devido aos cotilédones se elevarem acima do substrato e também fanerocotiledonar devido aos cotilédones saírem por completo do tegumento. Observar o

desenvolvimento da plântula permite diferenciar grupos taxonômicos muito semelhantes entre si, bem como auxiliar nos estudos de regeneração e nos trabalhos de melhoramento genético, além do reconhecimento das espécies em viveiros de produção e em campo (SILVA et al., 2008).

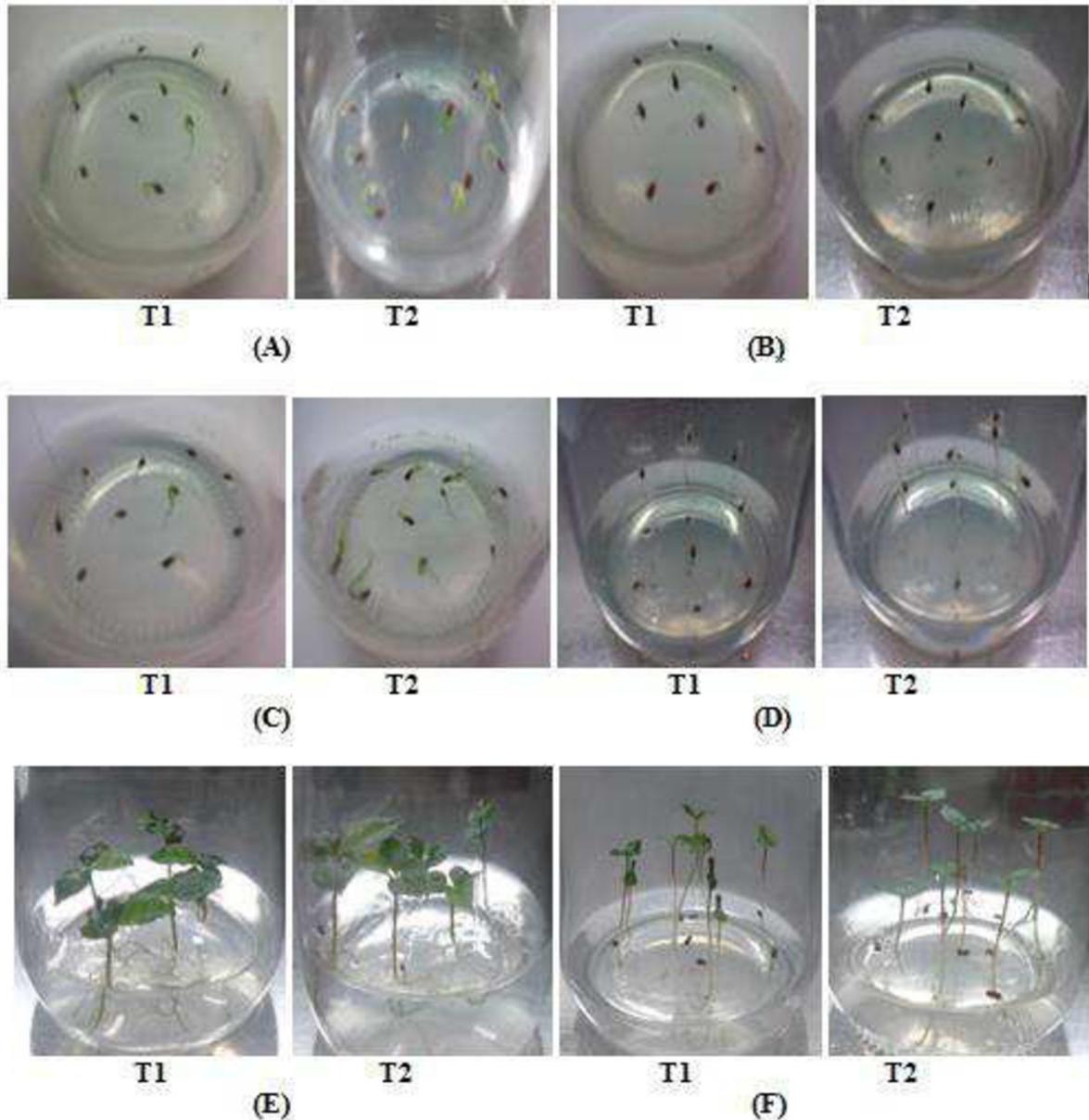
No que diz respeito aos tratamentos, estes influenciaram nos aspectos morfológicos no processo de germinação *in vitro* apresentando períodos de maior culminância durante os estádios de desenvolvimento. De forma generalizada, observou-se que os estádios iniciais da germinação, inclusive a emissão da radícula apresentaram percentuais maiores aos 30 dias após a inoculação nos tratamentos T1 e T2 nas condições de claro (figura 1 A), sendo um total de 89% para T1 e 95% para T2, já nas condições de escuro, houve um percentual de 39% para o T1 e 86% para T2 (figura 1 B).

Para o estágio de emissão de hipocótilo, os maiores percentuais foram alcançados aos 35 dias após o início do cultivo nas condições de claro, sendo um total de 87% para T1 e 95 % para T2 (figura 1 C), no entanto nas condições de escuro, houve um percentual de 44% para T1 e 81% para T2. (figura 1D). Na fase final do processo de germinação caracterizado pela emissão do epicótilo com a total formação da plântula, os tratamentos T1 e T2 nas condições de claro, possibilitaram os maiores percentuais de germinação para *Piper divaricatum*, sendo 87% para T1 e 96% para T2 (figura 1E), porém nas condições de escuro, houve um percentual de 34% para T1 e 74% para T2 (figura 1F).

Aos 40 dias de cultivo *in vitro* ocorreu a avaliação final para as sementes sem resposta, ou seja, aquelas que não entraram em processo de germinação, e percebeu-se que nas condições de claro o percentual de sementes sem resposta para T1 foi de 10% e para T2 foi 5%, porém nas condições de escuridão total, o percentual de sementes sem resposta para T1 foi de 33% e para T2 foi 10 %. Estes percentuais nos sugerem que estas sementes, apesar de germinarem no escuro, respondem melhor a este processo nas condições de claro e o meio em que estas sementes são cultivadas também possui influência, pois quando as mesmas são cultivadas no escuro, T2 (1/2 MS) é o melhor para o processo de germinação.

A resposta ao estímulo luminoso recebe o nome de fotoblastia. As sementes que germinam na presença de luz são classificadas como fotoblásticas positivas. As fotoblásticas negativas são as espécies que apresentam melhor germinação na ausência de luz. As fotoblásticas neutras germinam independente do regime de luz. (KLEIN e FELIPPE, 1991). No presente estudo, as sementes de *Piper divaricatum* apresentaram sucesso na germinação quando incubadas tanto na presença quanto na ausência de luz.

Figura 1: Estádios de desenvolvimento ao longo de 40 dias após o semeio de *Piper divaricatum* G. Meyer, mostrando em **A** - emissão de radícula (claro), **B** emissão de radícula (escuro); **C** - emissão de hipocótilo (claro), **D** emissão de hipocótilo (escuro); **E** - emissão do epicótilo com a total formação da plântula (claro), **F** - emissão do epicótilo com a total formação da plântula (escuro).



Fonte: Autores (2015)

4. CONCLUSÕES

Para o cultivo *in vitro* de *Piper divaricatum* através de sementes, constatou-se que as condições em que estas são cultivadas podem influenciar nos aspectos morfológicos no processo de germinação *in vitro*, apresentando períodos de maior culminância durante os estádios de desenvolvimento. No período em que houve a avaliação das amostras, foi possível perceber que os estádios iniciais da germinação, inclusive a emissão da radícula se dão em

maior percentual ao 30° dia para os tratamentos T1 e T2 nas condições de claro e a partir do 35° dia, para os estádios de emissão de hipocótilo e emissão do epicótilo com a total formação da plântula. Durante o processo de avaliação das sementes foi possível perceber que nas condições de escuro, o meio pode influenciar na resposta destas sementes, e constatou-se que para esta situação T2 é o melhor para germinação das sementes desta espécie.

Estudos envolvendo o processo de germinação, bem como o cultivo in vitro de *Piper divaricatum* ainda são escassos e o processo de estabelecimento da mesma em laboratório torna-se muito importante devido aos metabólitos de interesse encontrados na mesma, bem como a possibilidade desta ser utilizada em programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS

BARBOSA-FILHO, et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.18, p.135-154, 2008.

BIVATTI, M. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.17, p.640-653, 2007.

CORPES, R.S. **Produção e avaliação da atividade antioxidante de metabólitos secundários de *Piper divaricatum* G. Meyer sob diferentes condições de cultivo**. 2015 60 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia . Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2015.

DUKE, J.A; POLHILL, R.M. Seedlings of Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Garden, p.941-949, 1981.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecido de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Angiosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n.4, p. 627-641, 2008.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**. v. 55 p. 21-46, 2004.

KLEIN, A.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.26, n.7, p.955-966, 1991.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry**. v. 91, p.525-533, 2005.

MEIRELES. E. das N. Influência dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região Amazônica no controle do *Fusarium solani* f.sp. *piperis* causador da fusariose em pimenta-do

reino. 2014. 83 p. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2014.

SANTIAGO, E.J.A de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2003.

SILVA, K. B. et al. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* Willd., leguminosae – papilionideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p.104-114, 2008.

YUNCKER, T .G. The Piperaceae of Brazil. II. Piper group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorrhachis. **Hoehnea** v. 3 p. 29-284, 1973.