



20º Seminário de  
Iniciação Científica e  
4º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



20º Seminário de  
Iniciação Científica e  
4º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

**Embrapa Amazônia Oriental**  
Belém, PA  
2016



## **CULTIVO *in vitro* DE EXPLANTES DE PIMENTA-DO-REINO EM MEIO CONTENDO HIGROMICINA**

Nayara Camelo de Souza<sup>1</sup>, Simone de Miranda Rodrigues<sup>2</sup>, Gleyce Kelly de Souza Ramos<sup>3</sup>, Orlando Maciel Rodrigues Junior<sup>4</sup>

<sup>1,4</sup>Graduando do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: nay\_gondim@hotmail.com; orlando\_maciel@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

<sup>3</sup>Mestranda em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: gleyceramos17@yahoo.com.

**Resumo:** A pimenteira-do-reino é extremamente utilizada na indústria alimentícia. O Brasil é o quarto maior produtor mundial dessa especiaria, e a fusariose é a principal doença que afeta sua produção. Visando o estabelecimento de um protocolo de transformação genética para a espécie, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de explantes *in vitro* de pimenta-do-reino em meio contendo higromicina, para verificação da concentração ideal do antibiótico visando identificar concentração do antibiótico capaz de impedir o desenvolvimento dos tecidos dessa espécie. Para tal, cultivou-se explantes da cv. laçarará em meio MS com BAP em diferentes concentrações desse antibiótico. As avaliações ocorreram ao final de oito semanas e foram quanto ao comprimento dos brotos, surgimento dos números de folhas e gemas. Os resultados demonstraram que o aumento na concentração do antibiótico influenciou negativamente o desenvolvimento dos brotos de pimenteira-do-reino.

**Palavras-chave:** curva de morte, cv. laçarará, *Piper nigrum* L.

### **Introdução**

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), originária da Índia, foi introduzida no Brasil pelos portugueses no século XVII. Do ponto de vista econômico, seu cultivo ocorreu a partir de 1933, após introdução de mudas da cultivar Kucing, conhecida como Cingapura, a qual foi propagada e expandida no Pará, por meio de propagação vegetativa, via estacas (DUARTE, 1999). Em termos de produção mundial, o Brasil se destacou como um dos maiores países produtores em 1991, chegando a produzir 50.000 t, porém, em 2013 o rendimento médio do Brasil passou a ser de 2.291kg/ha, com o



estado do Pará sendo responsável por 2.214 kg/ha (IBGE, 2013), devido principalmente à ocorrência de doenças, como a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp *piperis*.

Atualmente, as cultivares comercializadas são suscetíveis a fusariose, e mesmos os estudos focados na obtenção de híbridos interespecíficos, utilizando espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia e resistentes ao patógeno, não alcançaram resultados satisfatórios. Estudos de micropropagação e de bioinformática resultaram na obtenção de protocolos para clonagem e identificação de sequências gênicas para pimenteira-do-reino (MENEZES, 1997; MOREIRA, 2012). Esses trabalhos, unindo a futuras pesquisas de identificação de genes de resistência ao patógeno, permitirão aumentar a variabilidade genética dessa cultura, reduzindo as perdas econômicas provocadas no campo pelo patógeno.

Deste modo, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de brotos *in vitro* de pimenteira-do-reino em diferentes concentrações do antibiótico higromicina, visto que esse antibiótico é comumente usado em ensaios de transformação genética por inibir o crescimento de tecidos vegetais não transformados.

### Material e Métodos

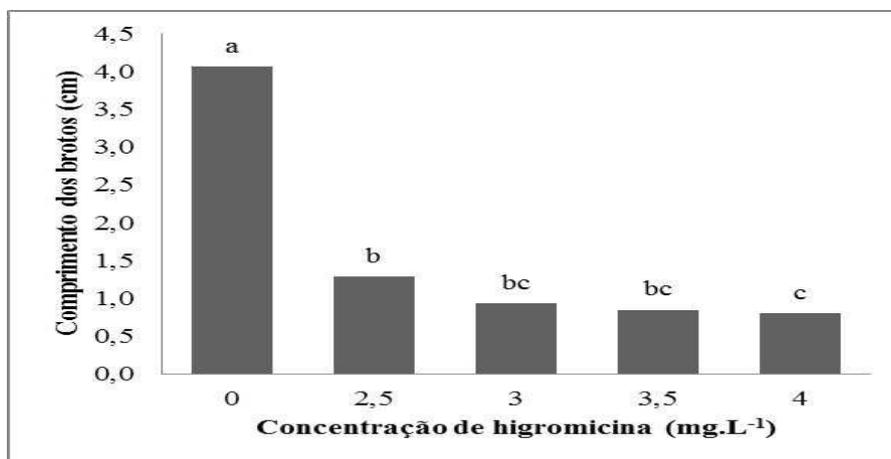
Foram utilizadas como material vegetal brotos de 1 cm da cultivar laçará, originárias de matrizes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Para a implantação desse experimento, realizou-se o preparo do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), suplementado nas concentrações de 0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> do antibiótico higromicina.

Os explantes foram introduzidos em frascos contendo 30 ml de meio de cultura, e permaneceram em sala de crescimento, em condições controladas de temperatura (25 ± 3°C) e fotoperíodo de 16 h em um período de oito semanas. Foram avaliados semanalmente quanto ao número de folhas, número de gemas e o comprimento dos brotos (cm). Considerou-se 3 explantes/frascos, em um total de 4 frascos/tratamento. Os resultados foram analisados considerando um delineamento inteiramente casualizado, e a análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT.



### Resultados e Discussão

Após os primeiros 10 dias de avaliação, foi verificado o aparecimento de uma folha/explante/broto introduzido. Porém, na concentração de 0 mg.L<sup>-1</sup>, o aparecimento foi mais tardio, 17 dias após a inoculação. Entretanto, observou-se com o passar dos dias que o desenvolvimento dos explantes foi comprometido nos meios contendo o antibiótico, de modo que quanto maior a concentração do antibiótico menor foi o desenvolvimento dos brotos (Figura 1). A concentração de 0 mg.L<sup>-1</sup> foi a que obteve o melhor desempenho no desenvolvimento dos tecidos vegetais, apresentando brotos com média de 4 cm. As demais concentrações apresentaram diferenças estatísticas, sendo que as concentrações de 2,5; 3,0 e 3,5 mg.L<sup>-1</sup> não diferiram entre si, enquanto que a concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup> de higromicina resultou no desenvolvimento menor do comprimento dos brotos, com média de 0,8 cm, não sendo considerado estatisticamente diferente das concentrações de 3,0 e 3,5 mg.L<sup>-1</sup> do antibiótico.

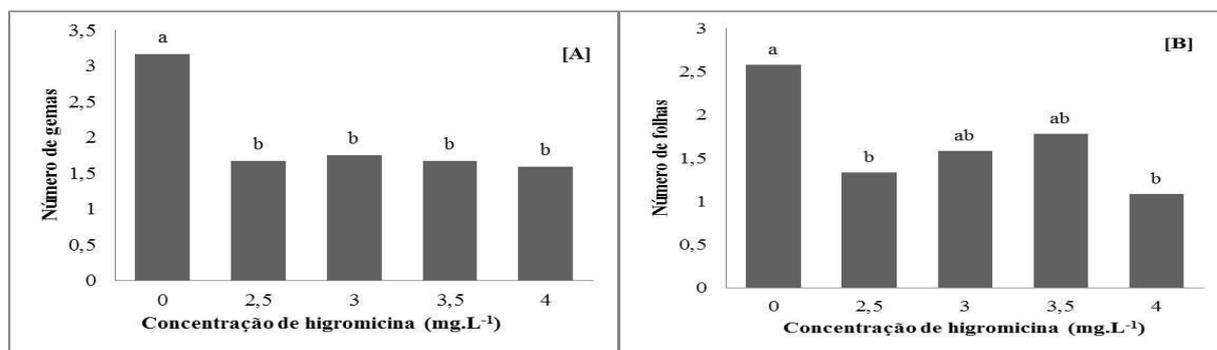


**Figura 1:** Influência da higromicina no desenvolvimento dos brotos de pimenteira-do-reino. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Com relação ao surgimento do número médio de gemas por broto, a figura 2A demonstra que a ausência do antibiótico resultou no surgimento de 3 gemas/explantes, em média. As outras concentrações não diferenciaram estatisticamente entre si, apresentando médias de 1,5 gemas/explante, evidenciando que o aumento da concentração do antibiótico inibiu o desenvolvimento das gemas de pimenteira-do-reino. Na figura 2B é possível verificar que nenhuma das concentrações do antibiótico foi capaz de inibir o desenvolvimento das folhas até a oitava



semana de desenvolvimento, entretanto, observou-se o amarelecimento de folhas, indicando a atuação positiva do antibiótico em conter o desenvolvimento da planta.



**Figura 2:** Influência da higromicina no desenvolvimento de gemas (A) e folhas de pimenteira-do-reino (B). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Segundo Rodrigues (2007), 4 mg.L<sup>-1</sup> de higromicina para hipocótilos de urucum foi suficiente para inibir a regeneração de brotos. Para a pimenteira-do-reino é necessário outros estudos visando estabelecer uma concentração de higromicina que reduza o surgimento de folhas de pimenteira-do-reino, menor que uma folha/explante após cultivo *in vitro*, a qual deverá ser usada em ensaios de transformação genética para a espécie.

### Conclusões

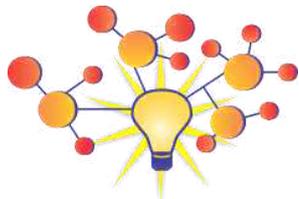
O antibiótico higromicina é mais severo para o desenvolvimento de brotos de pimenteira-do-reino quando usado na concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup>.

### Referências Bibliográficas

DUARTE, M. L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro: I. plantas industriais.** Belém, PA: Embrapa-CPATU, 1999. 296 p.

IBGE. **Produção agrícola municipal.** Rio de Janeiro, 2013.

MENEZES, I. C. **Morfogênese *in vitro* em tecido somático de pimenta-do-reino *Piper nigrum* L.** 1997. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.



20º Seminário de Iniciação Científica e 4º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

21 a 23 de setembro de 2016, Belém, PA.

MOREIRA, E. C. O. **Análise da expressão diferencial do transcriptoma de raiz de *Piper nigrum* L. em resposta a infecção por *Fusarium solanif. sp. piperis*.** 2012. 87 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

RODRIGUES, S. M. **Influência de antibióticos na morfogênese *in vitro*, transformação genética e isolamento de RNA de urucum (*Bixa orellana* L.).** 2007. 69 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.