



## CONTROLE DA OXIDAÇÃO DE MERISTEMA DE PIMENTEIRA-DO REINO (*PIPER NIGRUM* L.) EM CULTIVO *IN VITRO* SOB BAIXAS TEMPERATURAS

Danielle Pereira Mendonça<sup>1</sup>, Oriel Filgueira de Lemos<sup>2</sup>, Gleyce Kelly Sousa Ramos<sup>3</sup>, Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. [danielleprereiraam@gmail.com](mailto:danielleprereiraam@gmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisador D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental. [oriel.lemos@embrapa.br](mailto:oriel.lemos@embrapa.br)

<sup>3</sup>Doutoranda em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. [gleyceramos17@yahoo.com.br](mailto:gleyceramos17@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Graduanda em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia. [fernanda\\_bernaldo@hotmail.com](mailto:fernanda_bernaldo@hotmail.com)

**Resumo:** A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pertence à família Piperaceae, é uma planta trepadeira e perene. Tem grande valor econômico, pois é um condimento utilizado em todo o mundo. O Brasil é o 5º maior produtor mundial, e o estado do Pará é o maior produtor do país, com cerca de 74% da produção nacional. O objetivo deste trabalho foi avaliar a percentagem de oxidação da pimenteira-do-reino por cultivo de meristema em diferentes concentrações de mercaptoetanol sob baixas temperaturas. Ápices caulinares foram coletados e submetidos à assepsia para a retirada dos meristemas posteriormente à inoculação. O delineamento experimental foi fatorial 2 x 2 x 3 (2 temperaturas de incubação na assepsia, 2 cultivares, e 3 doses de  $\beta$ -mercaptoetanol). Os meristemas foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de  $25 \pm 3$  °C. Os explantes foram mantidos em fotoperíodo de 16h luz, e após isso foram condicionados no escuro por 15 dias. Passando-se esse período no escuro os explantes voltam a ser acondicionados no foto período inicial de 16h luz. O genótipo Clonada apresentou uma taxa de 4% de explantes não oxidados e após 25 dias de cultivos, os meristemas provenientes do mesmo genótipo apresentaram um aspecto esverdeado claro com um acréscimo de tamanho, mostrando-se competentes para a regeneração *in vitro*. O genótipo influencia na regeneração de pimenteira-do-reino e o pré-tratamento térmico reduziu a oxidação em meristemas do genótipo Clonada.

**Palavras-chave:** antioxidante, baixas temperaturas, limpeza clonal

### Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pertence à família Piperaceae, é uma planta trepadeira, perene, usada como condimento em todo o mundo e de grande valor econômico. O Brasil é o quinto maior produtor mundial e o Pará é o principal produtor, com cerca de 74% da produção nacional (IBGE, 2016).

Uma alternativa para se obter plantas livres de vírus é a limpeza clonal via cultivo de meristema, pois, as células meristemáticas estão frequentemente em divisão celular e há ausência de vascularização do meristema, o que sugere que o vírus não consegue alcançar essa região. No entanto, existe um fator



limitante para estabelecimento, que é a oxidação fenólica que consiste na liberação de compostos fenólicos que promovem o escurecimento do meristema, o que dificulta a sua sobrevivência e consequentemente o estabelecimento deste em cultura (MENDONÇA et al., 2016). O 2-mercaptoetanol, mais conhecido como  $\beta$ -Mercaptoetanol, é um composto químico bastante utilizado para reduzir pontes de dissulfureto e que pode atuar como um antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a porcentagem de oxidação de dois genótipos de pimenteira-do-reino por cultivo de meristema em diferentes concentrações do  $\beta$ -Mercaptoetanol sob baixas temperaturas.

### Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Em casa de vegetação, foram coletados ápices caulinares de dois genótipos de pimenteira-do-reino (Cingapura e Clonada) infectadas com o vírus PYMoV. Após a coleta, os ramos contendo gemas apicais foram cortados em pequenas estacas e imersos em solução de ácido cítrico (50 mM) e encaminhados ao Laboratório para o processo de assepsia e obtenção de meristemas. O processo de assepsia foi dividido de acordo com a temperatura, onde todas as estacas permaneceram imersas nas soluções, em frascos de vidro com capacidade para 300 mL, em gelo seco ( $\pm 4$  °C) e sem gelo ( $\pm 25$  °C) até o término do processo e inoculação dos meristemas.

No laboratório, foram realizadas lavagens das estacas em água corrente e detergente neutro, sendo as mesmas imersas em solução de Derosal® (0,1%) durante 20 minutos. Posteriormente, sob câmara de fluxo laminar, as estacas foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida, em solução de cloreto de mercúrio (0,1%) por 10 minutos, seguidas de cinco lavagens com água destilada autoclavada. Antes dos meristemas serem extraídos para inoculação, as estacas ficaram imersas em solução de sulfato de estreptomicina (antibiótico) durante 20 minutos e por fim, em solução de mercaptoetanol (antioxidante). Nesta última etapa, a imersão ocorreu em diferentes concentrações de mercaptoetanol (5, 10 e 15 mM) por 60 minutos, sendo cada tratamento representado por 10 explantes com 5 repetições. O delineamento experimental foi fatorial 2 x 2 x 3 (2 temperaturas de incubação na assepsia, 2 cultivares, e 3 doses de  $\beta$ -mercaptoetanol).

Após esse processo de assepsia, os meristemas foram excisados com bisturi sob o auxílio de estereomicroscópio. Os meristemas retirados ( $\leq 1$  mm) foram inoculados em meio de cultura em frascos contendo 5ml de meio básico de cultura MS o qual foi suplementado com BAP (benzilaminopurina) a 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, AIA a 0,2 mg.L<sup>-1</sup>, sulfato de estreptomicina a 100 mg. L<sup>-1</sup>, PVP (polivinilpirrolidona) a 100 mg.L<sup>-1</sup>, solidificado com phytigel a 0,2%, e pH ajustado para 5,8 sendo submetidos a posterior autoclavagem a 121 ° C durante 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os meristemas foram mantidos



em ambiente controlado com controle de temperatura ( $25 \pm 3$  °C). Os explantes foram mantidos em fotoperíodo de 16h luz, e após isso foram condicionados no escuro por 15 dias. Passando-se esse período no escuro os explantes voltam a ser acondicionados no foto período inicial de 16h luz. Foram usados 20 meristemas por tratamento. O grau de oxidação foi verificado após uma semana de cultivo, em que O<sup>o</sup> foi considerado sem oxidação; O\* pouca; O\*\* moderadamente e O\*\*\* totalmente oxidado. Foi analisada a percentagem de oxidação.

### Resultados e Discussão

O genótipo Clonada apresentou uma taxa de 4% explantes não oxidados (Figura 1). De acordo com Barreto Cid e Teixeira (2010) o estresse causado pela excisão de explantes com o bisturi e associados ao pequeno tamanho dos meristemas isolados, desencadeia a oxidação fenólica que é uma das limitações. O baixo percentual de explantes em desenvolvimento, a partir do meristema, também foi observado por Costa (2016) na multiplicação *in vitro* de pimenteira-do-reino via cultivo meristema nas cultivares Apra, Bragantina, Kottanadan e Kuthiravally, onde apenas 10% do material inoculado se desenvolveram *in vitro*.

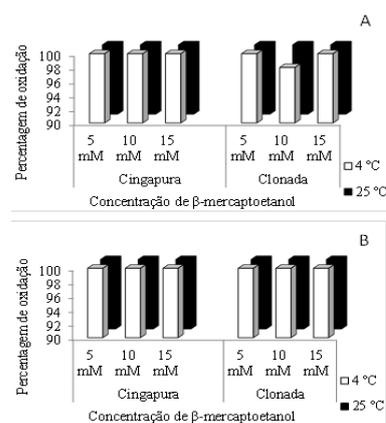


Figura 1. Taxa de meristemas oxidados aos 30 dias de cultivo, 15 dias iniciais no escuro (A); fotoperíodo 16h. luz.

Após 25 dias de cultivo, meristemas do genótipo Clonada apresentaram um aspecto esverdeado claro com aumento de tamanho, caracterizando-se como competentes para a regeneração *in vitro*. (Figura 2).



Figura 2. Meristema do genótipo Clonada de pimenteira-do-reino, em diferentes dias após o cultivo *in vitro*.



Diferente de Umadevi et al. (2015) que obtiveram sucessos na regeneração de brotações proveniente de meristema apical de pimenteira-do-reino para produção de mudas na Índia, cujo protocolo proporcionou 40% de sucesso na regeneração do meristema *in vitro*. Esse processo é importante para a produção massal de plantas elites e conservação da espécie na região. Resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram que o genótipo influenciou na resposta quanto à oxidação e que a incubação inicial dos explantes também favoreceu o processo de estabelecimento *in vitro*. O fato do genótipo clonada ter apresentado uma taxa de sobrevivência provavelmente está ligado a maior taxa regenerativa e níveis endógenos de compostos fenólicos em relação ao genótipo Cingapura.

### **Conclusões**

O genótipo influencia na regeneração de pimenteira-do-reino e o pré-tratamento térmico reduz a oxidação em meristemas do genótipo Clonada. O mercaptoetanol na concentração de 15mM controla a oxidação do meristema de pimenteira-do-reino no estabelecimento da cultura para a micropropagação.

### **Agradecimentos**

A Embrapa Amazônia Oriental pela concessão da bolsa de estudo.

### **Referências Bibliográficas**

- BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. p. 15-49.
- COSTA, L. C. **Respostas in vitro de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) para micropropagação via meristema**. 2016. 75 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: Sistema de recuperação automática - SIDRA. 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=1&i=P>>. Acesso em: 05 fev. 2017.
- MENDONÇA, D. P.; LEMOS, O. F. de; RAMOS, G. K. S.; SILVA, F. B. B. da; RODRIGUES JUNIOR, O. M.; RODRIGUES, S. de M. Mercaptoetanol no controle da oxidação de meristema de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em cultivo in vitro. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 4., 2016, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.
- UMADEVI, P.; SAJI, K. V.; SURABY, E. J. Meristem culture for rapid regeneration in Black pepper (*Piper nigrum* Linn.). **Annals of Plant Sciences**, v. 4, n. 3, p. 1029-1032, 2015.



## ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO NA RIZOGÊNESE *IN VITRO* DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum L.*)

Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva<sup>1</sup>, Oriel Filgueira de Lemos<sup>2</sup>, Danielle Pereira Mendonça<sup>1</sup>,  
Gleyce Kelly de Sousa Ramos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicas de Agronomias – UFRA [Fernanda\\_bernaldo@hotmail.com](mailto:Fernanda_bernaldo@hotmail.com); [daniellepereir@gmail.com](mailto:daniellepereir@gmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, [oriel.lemos@embrapa.br](mailto:oriel.lemos@embrapa.br)

<sup>3</sup>Mestranda em biotecnologia – UFRA [Gleyceramos17@yahoo.com](mailto:Gleyceramos17@yahoo.com)

**Resumo:** O enraizamento *in vitro* é uma etapa importante no processo de micropropagação, por permitir a formação de plantas completas para posterior aclimatização às condições *ex-vitro*. Objetivou-se no trabalho verificar o efeito do ácido naftalenoacético (ANA) no enraizamento *in vitro* de dois híbridos de pimenteira-do reino, um proveniente do cruzamento entre Bento x Guajarina e o segundo do cruzamento entre Bragantina x Arborium. Foram usados os ápices caulinares e segmentos nodais com gemas laterais como explantes, inoculados em condições assépticas em frascos contendo 40 ml de meio básico de cultura de Murashige e Skoog (MS), sacarose a 3%, vitamina 0,2, phytigel a 0,2% e pH ajustado para 5,8 com dose de 0,05 mg L<sup>-1</sup> ANA e o testemunha com ½ MS + 0 ANA para os dois genótipos. Ambos cultivados por seis semanas sob condições de fotoperíodo de 16 h.luz.dia<sup>-1</sup>, com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 3°C. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 2 tratamentos e 5 repetições, sendo um frasco com cinco brotos por repetição. Os parâmetros avaliados foram: A percentagem de explante enraizados e o comprimento da raiz (mm) comprimento do broto (mm), número de raízes. Os dados foram submetidos à análise da variância. Pode-se concluir com os resultados que não há diferença significativa no desenvolvimento entre os dois híbridos a partir de brotos em meio 1/2 MS com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

**Palavras-chave:** brotos, enraizamento, genótipo

### Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum L.*) é uma planta trepadeira originária da Índia. É a mais importante especiaria comercializada mundialmente e é usada em larga escala como condimento, e também em indústrias de carnes e conservas. Os maiores produtores mundiais da pimenta-do-reino são Índia, Vietnã, Indonésia, Malásia e Brasil. No Brasil, o maior estado produtor é o Pará que é responsável por cerca de 80% da produção do país. A produtividade média varia de 2 a 5 toneladas de grãos por hectare (APHORTESP, 2015).