



## GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DA CULTIVAR BRAGANTINA DE PIMENTEIRA-DO-REINO

Ana Carolina Melo Ribeiro<sup>1</sup>, Oriel Filgueira de Lemos<sup>2</sup>, Gabriela Tavares Pires<sup>3</sup>,  
Cinara Rafaela de Oliveira Neves<sup>4</sup>, Tinayra Teyller Alves Costa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Engº Agrônômica da UFRA/Estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, carolm.ribeiro95@gmail.com.

<sup>2</sup>Pesquisador Doutor da Embrapa Amazônia Oriental, oriel.lemos@embrapa.br.

<sup>3</sup>Estudante de Engº Agrônômica da UFRA/Estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, gabrielatavaresp18@gmail.com.

<sup>4</sup>Estudante de Engº Agrônômica da UFRA/Estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, cinara.d.ferreira@gmail.com.

<sup>5</sup>Estudante de Engº Agrônômica da UFRA/Estagiária da Embrapa Amazônia Oriental, tinayra.teyller@yahoo.com.br.

**Resumo:** Uma das dificuldades na produção da pimenta-do-reino é a presença de doenças no cultivo que prejudicam a produtividade. A germinação e clonagem *in vitro* de plantas requer protocolos eficientes de desinfestação de sementes para proporcionar germinação e desenvolvimento de plantas com qualidade para a clonagem via micropropagação. A obtenção de plântulas saudáveis *in vitro* a partir de sementes é uma forma viável de produzir plantas livres de patógenos. O trabalho teve como objetivo a obtenção de plântulas de uma cultivar de pimenteira-do-reino em condições *in vitro*. Foram usadas sementes da cultivar Bragantina divididas em três grupos de 35 sementes cada e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio básico de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962), vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 mg L<sup>-1</sup>, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2%, nos seguintes tratamentos: T1 composto de sais de MS completo suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> ANA (ácido naftalenoacético); T2 ½ MS (metade da concentração dos macro e micronutrientes) suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> BAP e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> ANA; e T3 composto de ½ MS sem BAP e ANA. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, e a autoclavagem foi a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. As avaliações foram quanto a formação e a não formação de plântulas durante o processo de germinação das sementes. Para a obtenção de plântulas provenientes de sementes da cultivar Bragantina de pimenteira-do-reino, deve ser utilizado o meio de cultura básico com ½ MS ou MS completo, 0,17 g.L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, carvão ativado 02% e suplementado com BAP e ANA 0,5 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** cultivo *in vitro*, propagação vegetativa, *Piper nigrum* L.

### **Introdução**

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma cultura perene pertencente à família Piperaceae, cultivada em regiões tropicais, nativa da Índia, porém apresenta ampla distribuição no território brasileiro, destacando-se a região Norte (Jaramillo; Manos, 2001; Ramos et al., 2018). Possui elevada importância econômica por ser uma das especiarias mais consumidas no mundo, e por absorver grande quantidade de mão-de-obra e fixar o homem no campo (Duarte, 2005). Contudo, a produção Brasileira vem decrescendo devido a ocorrência de doenças que reduz seu ciclo produtivo, variando de cinco a seis anos em ocorrência da doença (Lemos, 2003).

A propagação da pimenteira-do-reino pode ser realizada por via vegetativa ou sexuada, por meio de métodos convencionais ou biotecnológicos os quais possibilitam acelerar o processo de propagação, denominado de cultivo *in vitro* ou micropropagação. Segundo Ramos et al. (2018) o cultivo *in vitro* de plantas, apresenta importância prática na área agrícola e científica, despertando interesse, entre outros fatores por acelerar métodos de propagação convencionais e por permitir obter material livre de patógenos.

A obtenção de explantes livres de contaminações é um fator que limita a técnica de micropropagação, o qual é importante para a cultura da pimenteira-do-reino por apresentar microrganismos endógenos. Para que o cultivo *in vitro* seja viável, diversos processos para originar plantas doadoras de acessos foram realizados, por meio da germinação *in vitro* para produzir estacas em casa de vegetação ou pela obtenção de embriões zigóticos (Lemos, 2003). Visando dar suporte ao programa de melhoramento e propagar plantas saudáveis, objetivou-se a obtenção de plântulas de uma cultivar de pimenteira-do-reino em condições *in vitro*.

### **Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Para a germinação, inicialmente foram coletados frutos maduros, de plantas cultivadas na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental. Sementes da cultivar de

pimenteira-do-reino (Bragantina) foram submetidas à assepsia. Inicialmente foram imersas em solução de NaClO 0,5% e colocadas em estufa a 37 °C por 12 horas, após esse período, foram despulpadas e lavadas com detergente neutro. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram colocadas em solução fungicidas (nativo a 0,4% e derosal a 0,2%) por 20 minutos, depois em álcool a 70% por mais 1 minuto, mais 15 minutos em solução de NaClO 1%, posteriormente foram lavadas em água destilada autoclavada por cinco vezes.

As sementes foram divididas em três grupos de 35 sementes cada e inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de diferentes combinações meio básico de cultura, o primeiro meio (T1), foi composto de meio básico de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 mg L<sup>-1</sup>, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2%, suplementado com fitohormônios 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP (6- benzilaminopurina) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA (ácido a-naftalenoacético). O segundo meio (T2), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade da concentração dos macro e micronutrientes) MS (Murashige; Skoog, 1962) e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 mg L<sup>-1</sup>, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2%, suplementado com fitohormônios 0,5% BAP (6- benzilaminopurina) e 0,2% ANA (ácido a-naftalenoacético). O terceiro (T3), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade das concentrações dos macros e micronutrientes) MS (Murashige; Skoog, 1962) e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 mg L<sup>-1</sup>. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, e a autoclavagem foi a 120 °C e 1 atm por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 35 repetições por tratamento. As sementes foram transferidas para tubo de ensaio, uma por tubo, contendo o meio de cultura, mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 ± 3 °C), fotoperíodo de 16 horas, e luminosidade de 3.000 lux. As avaliações foram quanto a formação e a não formação de plântulas finalizando o processo de germinação das sementes. Os dados foram submetidos às análises estatísticas por meio do programa Past3.zip, para teste de comparação de Qui-quadrado para o efeito do meio de cultura sobre a formação de plântulas do genótipo a 5% de probabilidade.



## Resultados e Discussão

No processo de germinação *in vitro* à formação de plântulas houve diferença significativa entre os meios de cultivo (Figura 1), no tratamento 3 mais da metade das sementes não converteram-se em plântulas em relação aos demais tratamentos, entende-se que possivelmente devido à ausência de fitormônios e/ou antioxidante. De acordo com Ramos et al. (2018), os meios de cultivo controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*, fornecendo condições ideais para a conversão dos explantes em plântulas, as quais tem caráter clonal embutido em sua natureza baseado também na totipotencialidade celular. Há diversos fatores que contribuem com o desenvolvimento *in vitro*, entre eles além do meio de cultivo podemos citar o tipo e a idade do explante, os reguladores de crescimento, iluminação entre outros (Zhang et al., 2003). O acréscimo de reguladores de crescimento é primordial na cultura de tecidos. Além dos reguladores de crescimento, o carvão ativado é usado para reduzir as taxas de oxidação dos explantes, dessa forma viabilizando maior número de brotações (Madhusudhanan; Rahiman, 2000). Com isso, pode-se inferir que a falta desses componentes, limitaram a germinação das sementes pela ausência da síntese de hormônios ou reservas suficientes e a ausência de estímulos do meio de cultura para desencadear o processo.

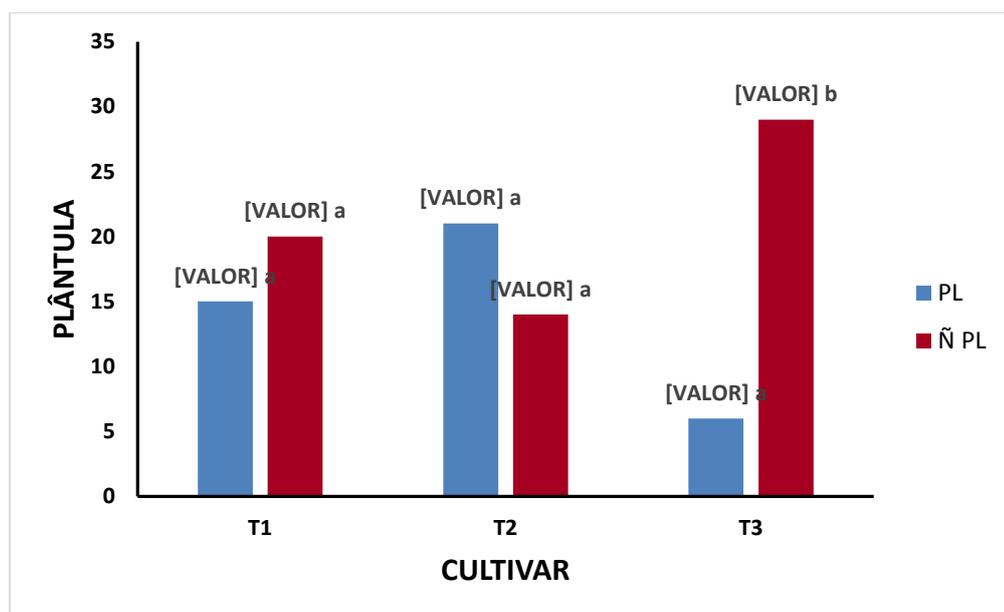


Figura 1. Formação de plântulas *in vitro*.



### Conclusão

Para a obtenção de plântulas provenientes de sementes da cultivar Bragantina de pimenteira-do-reino, deve ser utilizado o meio de cultura básico com ½ MS ou MS completo, 0,17 g.L-1 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, carvão ativado 0,2% e suplementado com BAP e ANA 0,5 mg.L-1.

### Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Oriental pela oportunidade de realização da pesquisa, ao grupo PET Agronomia UFRA por todo apoio e ao Banco da Amazônia pelo suporte financeiro.

### Referências Bibliográficas

DUARTE, M. de L. R. (Ed.). **Cultivo da pimenteira-do-reino na região norte**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 185 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Sistema de produção, 1).

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of diversity in the genus piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, n. 88, p. 706-716, 2001.

LEMOS, O. F. **Mutagênese e tecnologia in vitro no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MADHUSUDHANAN, K.; RAHIMAN, B. A. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of in vitro cultures of Piper species. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 297-299, 2000.

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

RAMOS, G. K. S.; MENDONÇA, D. P.; SILVA, F. B. B.; FERREIRA, C. S.; LEMOS, O. F. Ácidonaftalenoacético na Rizogênese e Benzelaminopurina na Indução de Brotos de Genótipos de Pimenteira-do-Reino (*Piper nigrum* L) em cultivo in vitro. In:

CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 2., 2017, Natal.  
**Anais...** [S.l.: s.n.], 2018.

ZHANG, L.; XU, T.; SUN, X.; ZHANG, H.; TANG, K. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* fort. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 5, p. 459-462, 2003.