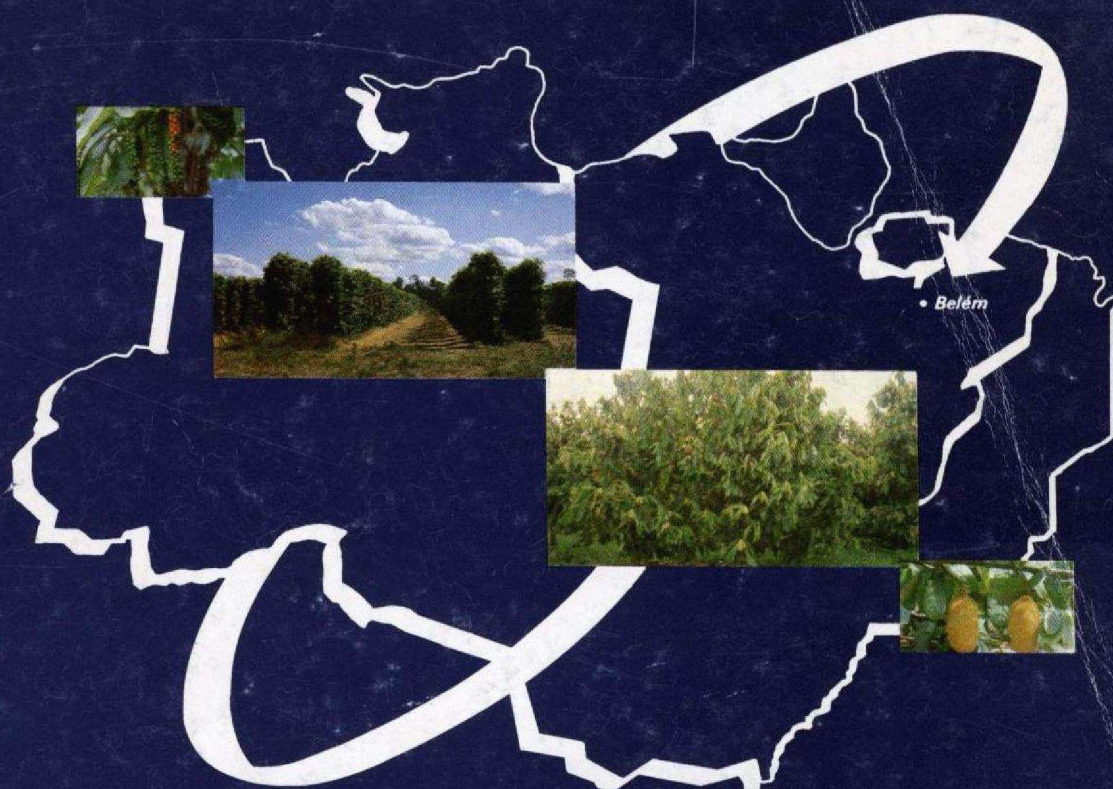


*Seminário Internacional Sobre
Pimenta-do-reino e Cupuaçu*

*International Seminar on
Black Pepper and Cupuaçu*

*Seminario Internacional Sobre
Pimienta y Cupuaçu*

17 a 19 de dezembro de 1996



ANAIS

PROCEEDINGS

ANALES

Embrapa

Amazônia Oriental

JICA

**Belém - Pará - Brasil
1997**

Anais...
1997

PC-2005.00226



AI-SEDE- 28762-2

ISSN 0101-2835

***Seminário Internacional Sobre
Pimenta-do-reino e Cupuaçu***

***International Seminar on
Black Pepper and Cupuaçu***

***Seminario Internacional
Sobre Pimienta y Cupuaçu***

***Belém, 17 a 19 de dezembro de 1996
Belém, December 17 through 19, 1996
Belém, 17 a 19 de diciembre de 1996***

ANAIS

PROCEEDINGS

ANALES

Embrapa

Amazônia Oriental

JICA

***Belém - Pará - Brasil
1997***

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (091) 246-6653, 246-6333

Telex: (91) 1210

Fax: (091) 226-9845

Caixa Postal, 48

66095-100 - Belém, Pará

Tiragem: 300 exemplares

Embrapa	
Unidade:	Ar-Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º II. Fiscalização:	
Fornecedor:	
N.º CCC:	
Origem:	Dodca
N.º Registro:	226/05

Comissão de Organização e Editoração

Dilson Augusto Capucho Frazão - Coordenador

Emmanuel de Souza Cruz

José Furlan Júnior

Expediente

Coordenação Editorial: Dilson Augusto Capucho Frazão

Normalização: Célia Maria Lopes Pereira

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Daniel Luiz Leal Mangas

Décio Mangueira da Silva

Emmanoel Ubiratan de Lima

Euclides Pereira dos Santos Filho

Paulo Sérgio Oliveira

Nota: Os trabalhos publicados nestes anais não foram revisados pelo Comitê de Publicações da Embrapa Amazônia Oriental como normalmente se procede para as publicações regulares. Assim sendo, todos os conceitos e opiniões emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., 1996, Belém, PA. Anais. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, 1997. 440p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

1. Pimenta-do-reino - Congresso. 2. Cupuaçu - Congresso. I. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). II. Título. III. Série.

CDD: 633.840601

PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE PLANTAS DE PIMENTA-DO-REINO

Oriel Filgueira de Lemos¹, Ilmarina Campos de Menezes² e Vanusa Lopes da Silva³

RESUMO: Apíces caulinares de pimenta-do-reino provenientes de plântulas a partir da germinação de sementes "in vitro", foram estabelecidos em meio básico MS, contendo AIA (0,5; 1,0 ou 2,0 mg.l⁻¹) e BAP (1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹) durante 10 e 20 dias. Para a indução de múltiplas brotações, os explantes estabelecidos foram transferidos para o mesmo meio básico, mas contendo somente BAP (1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹). Maior número de brotos por explante inicial foi obtido quando estabelecidos por 20 dias em meio MS (AIA 0,5 ou 1,0 mg.l⁻¹ e BAP 4,0 mg.l⁻¹) e transferidos para meio contendo somente BAP a 4,0 mg.l⁻¹ (média de seis brotos/explante), ou estabelecidos por 10 dias (AIA 1,0 mg.l⁻¹ e BAP 2,0 mg.l⁻¹ ou 1,0 e 2,0 mg.l⁻¹), e transferidos para mesmo meio, mas contendo somente BAP (média de 5,0 brotos/explante). As brotações emitidas foram enraizadas em meio contendo ANA ou AIB (0,5; 1,5 e 2,5 mg.l⁻¹, de cada). Os "plantlets" foram aclimatados com sucesso sob câmara de plástico em solo e as plantas cresceram normalmente em telado.

IN VITRO PROPAGATION OF BLACK PEPPER PLANTS

ABSTRACT: Shoot tips were taken from black pepper seedlings which had in vitro grown and transferred to MS medium supplemented with IAA (0,5; 1,0 and 2,0 mg.l⁻¹) and BAP (1,0; 2,0; and 4,0 mg.l⁻¹) for 10 or 20 days in order to micropropagate black pepper. Multiple shoots were induced on basic MS medium containing BAP (1,0; 2,0; and 4,0 mg.l⁻¹), only. Large number of shoots were recorded when shoot tips cultures for 20 days on MS medium (IAA 0,5 and 1,0 mg.l⁻¹ and BAP 4,0 mg.l⁻¹) and were transferred to basic MS containing 4,0 mg.l⁻¹ BAP (mean of 6 shoots/explant), or cultures for 10 days (IAA 1,0 mg.l⁻¹ and BAP 1,0 or 2,0 mg.l⁻¹) and were transferred to basic MS containing 1,0 or 2,0 mg.l⁻¹ BAP (mean of 5,0 shoot/explant). Multiple shoots rooted on MS medium containing ANA or AIB (0,5; 1,5 and 2,5 mg.l⁻¹ of each) developed into plantlets and were successfully hardened in vinyl house on soil and normally growth in net house.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma especiaria muito cultivada em algumas regiões tropicais e que assume grande importância social e econômica em países como a Índia, Malásia, Brasil, Sri-Lanka e outros. A produção mundial estimada para 1996 é superior a 180.000 toneladas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor, com uma produção acima de 19.000 toneladas, menor que a da Índia e da Indonésia (International, 1993). Foi introduzida no Brasil por japoneses, e a partir de poucas estacas, expandiu-se rapidamente. Atualmente, um dos grandes entraves para sua produção é a doença fusariose causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*, responsável pela redução do ciclo econômico e da produção (Albuquerque & Duarte, 1977). A propagação vegetativa por estacas, forma comumente utilizada, favorece a proliferação da doença e somente permite a produção de cerca de 50 estacas enraizadas por ano, a partir de plantas com dois anos de idade (Milanez et al. 1987; Milanez & Ventura, 1987). As cultivares disponíveis para cultivo são apenas três, Cingapura, Guajarina e Bragantina, as duas últimas obtidas por introdução, competição

¹ Eng.- Agr., M.Sc., Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

² Téc. Esp., Embrapa Amazônia Oriental.

³ Discente da UFFa, Caixa Postal 1611, CEP 66075-900, Belém, PA.

e seleção através da Embrapa-CPATU, mas todas susceptíveis à doença (Albuquerque & Duarte, 1986, 1991). Espécies do gênero *Piper* como *P. colubrinum* e *P. attenuatum* têm demonstrado tolerância e/ou resistência à fusariose (Albuquerque, 1968), mas o melhoramento convencional não tem conseguido êxito na obtenção de genótipos com essa característica.

As técnicas de biotecnologia têm apresentado novas alternativas para o melhoramento genético vegetal, principalmente para aquelas espécies cujo melhoramento convencional, por si só, não tem avançado. Esta técnica permite a multiplicação rápida de genótipos superiores, resgate de embriões de híbridos raros, conservação de germoplasma "in vitro", produção de plantas transgênicas, dentre outras, porém o processo de regeneração de plantas "in vitro" é a maior limitação para sua aplicação (Emons et al. 1993).

A micropropagação tem sido a principal aplicação prática das técnicas de cultura de tecidos de plantas. O uso tem viabilizado a propagação clonal em massa de plantas de bananeira (Cronauer & Krikorian, 1984) e de várias outras espécies frutíferas e ornamentais. Em pimenta-do-reino alguns trabalhos têm sido realizados para regeneração e multiplicação de plantas "in vitro", cujo fator limitante vem sendo o problema de contaminação por fungos e bactérias endógenas (Mathews & Rao, 1984; Fitchet, 1990; Philip et al. 1992). Philip et al. (1992), considerando os resultados obtidos, estimam que é possível a micropropagação de mais de 15.000 plantas por ano a partir de um explante.

Neste trabalho descreve-se a metodologia empregada para a micropropagação de pimenta-do-reino a partir de ápices caulinares provenientes de plântulas "in vitro".

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pimenta-do-reino provenientes do Banco de Germoplasma do CPATU foram despulpadas e submetidas a tratamento de assepsia. Primeiramente em álcool a 70 % por dois minutos e depois imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, durante 15 minutos. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por três a cinco vezes e, finalmente, inoculadas em frascos cilíndricos com capacidade para 300 ml, contendo meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962), 3 % de sacarose, 0,7% de ágar e ajuste para pH 5,8, antes da autoclavagem à temperatura de 121°C, por 15 minutos. As sementes em meio de cultura foram incubadas em condições de temperatura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux para germinação e formação de plântulas.

Estabelecimento e indução de brotações

Ápices caulinares excisados de plântulas "in vitro" foram inoculados em tubos de ensaio de 25 x 75 mm contendo meio básico de cultura MS e 6-benzilamino purina (BAP: 1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹) combinado com ácido indolacético (AIA: 0,5; 1,0 e 2,0 mg.l⁻¹), sacarose a 3 %, gelrite a 0,2 % e pH 5,8, antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos. A incubação foi realizada em sala de crescimento com temperatura de

25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 h de luz por 8 h de escuro, intensidade de iluminação de 3.000 lux e umidade relativa do ar de 50%, em média. Após 10 ou 20 dias de estabelecimento da cultura, os ápices caulinares que permaneceram verdes, com tecido vivo, foram transferidos para *becker's* de 100 ml com o mesmo meio básico, mas contendo BAP (1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹) combinado com ácido giberélico (GA₃ 0,3 mg.l⁻¹), durante 30 dias, sob as mesmas condições de incubação de estabelecimento de cultura. Então, para a obtenção de múltiplos brotos, os explantes foram repicados para o mesmo meio de cultura e condições de cultivo, mas, somente com BAP (1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹). Os explantes foram mantidos em meios de cultura com a mesma concentração inicial de BAP. Os parâmetros avaliados foram quanto à formação ou não de calos na base do explante e número de brotos emitidos por explante.

Enraizamento e aclimação das plantas

Para enraizamento, os brotos individualizados foram transferidos para meio básico de cultura MS contendo auxina, ácido indolbutírico (AIB) ou ácido α -naftalenoacético (ANA), à concentração de 0,5; 1,5 ou 2,5 mg.l⁻¹, por regulador de crescimento. Após 30 dias foi verificado o enraizamento ou não dos brotos. Os brotos enraizados, "plantlets", foram retirados dos frascos, lavados em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura e transferidos para copos de plástico de 300 ml contendo como substrato terra preta, serragem e esterco de curral na proporção de 2:1:1 e mantidos por duas semanas sob condições de alta umidade proporcionada por pulverizações freqüentes no ambiente de uma câmara de 140 x 70 x 70 mm, construída de madeira com plástico sob um telado com sombrite de 50 %. As plântulas permaneceram por duas semanas nessas condições e, em seguida, foram retiradas para condições apenas de telado até a formação das mudas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de germinação do tipo epigeal "in vitro" teve início a partir do décimo dia através do desenvolvimento, inicialmente, de raízes. Após 20 dias de cultura houve formação de plântulas e aos 30 dias as sementes viáveis germinaram e desenvolveram-se em plântulas. As plântulas com duas folhas definitivas foram usadas para retirada dos ápices caulinares, os quais foram usados no processo de micropropagação.

No estabelecimento de cultura, os explantes inicialmente sofreram processo de escurecimento, que em alguns casos levou à morte do tecido. Este processo foi mais intenso em explantes submetidos a meios sem regulador de crescimento, com alta concentração de BAP (4,0 mg.l⁻¹) em relação a AIA (0,5 mg.l⁻¹) e menos intenso quando ocorreu na concentração de BAP (1,0 mg.l⁻¹) e AIA (0,5 mg.l⁻¹). A formação de calos na base do explante foi comum em todos os tratamentos, porém mais freqüente quando em meio com um nível de auxina maior que citocinina (2,0 e 1,0 mg.l⁻¹, respectivamente) ou com um nível de citocinina quatro vezes maior que auxina (4,0 e 1,0 ou 0,5 e 2,0 mg.l⁻¹, respectivamente) ou então em igual concentração de cada regulador de crescimento. Ademais quanto maior o tempo de estabelecimento dos explantes em meio contendo auxina menor a formação de calos. Observações

semelhantes quanto ao escurecimento dos explantes e formação de calos foram realizadas por Mathews & Rao (1984), particularmente para indução de calos quando usaram BAP (1,0 mg.l⁻¹) combinado com qualquer tipo de auxina (Tabela 1).

TABELA 1. Respostas de ápices caulinares quanto à oxidação e à formação de calos estabelecidos em meio básico MS, contendo diferentes combinações de AIA e BAP por 10 e 20 dias de cultura, avaliados aos 30 dias quando em meio sem AIA, mas com as mesmas concentrações de BAP e 0,3 mg.l⁻¹ de GA₃.

AIA (mg.l ⁻¹)	Dias	BAP (mg.l ⁻¹)					
		1,0		2,0		4,0	
		Oxidação ¹	Calos ²	Oxidação	Calos	Oxidação	Calos
0,5	10	O ⁺	C ⁺	O ⁺	C ⁺⁺⁺	O ⁺⁺	C ⁺⁺
	20	O ⁺	C ⁺	O ⁺	C ⁺⁺	O ⁺⁺	C ⁺
1,0	10	O ⁺⁺	C ⁺⁺⁺⁺	O ⁺	C ⁺	O ⁺	C ⁺⁺⁺
	20	O ⁺	C	O ⁺⁺	C ⁺⁺	O ⁺⁺	C ⁺⁺
2,0	10	O ⁻	C ⁺⁺⁺	O ⁺⁺	C	O ⁺⁺	C ⁺
	20	O ⁺	C ⁺⁺	O ⁻	C ⁺	O ⁺	C ⁺
Testemunha ³		O ⁻	C ⁺⁺				

¹ Escurecimento do explante: O não oxidado; O⁺ baixa; O⁺⁺ média; e O⁺⁺⁺ alta oxidação.

² Formação de calos: C não calos; C⁺ rara; C⁺⁺ baixa; C⁺⁺⁺ moderada; e C⁺⁺⁺⁺ alta.

³ Tratamento livre de regulador de crescimento no meio de cultura.

Os ápices caulinares em todos os tratamentos com BAP (1,0; 2,0; e 4,0 mg.l⁻¹), combinados com GA₃, desenvolveram-se e aos 30 dias de cultura alcançaram crescimento que variaram de 10 a 30 mm. Além do mais, os ápices caulinares ao serem transferidos para os mesmos meios de cultura contendo somente BAP em iguais concentrações emitiram de 1-10 brotos por explante (Fig.1). Apresentaram melhores performances (média superior a 6,0 brotos/explante) na concentração de 4,0 mg.l⁻¹ de BAP para explantes provenientes de estabelecimento por 20 dias em meio de cultura contendo AIA (0,5 e 1,0 mg.l⁻¹). Em contraste, explantes estabelecidos por dez dias nas mesmas condições de cultura tiveram uma resposta inferior (média inferior a 4,0 brotos/explante), o que demonstrou haver um efeito positivo da auxina para a melhor ação de BAP na indução de brotos em ápices caulinares de pimenta-do-reino. Philip et al. (1992) obtiveram o estabelecimento e a indução de brotos a partir de ápices caulinares em meio de cultura MS contendo 1,5 mg.l⁻¹ BAP e subsequente brotos laterais quando em meio de cultura com BAP e AIB (1,0 e 3,0 mg.l⁻¹, respectivamente), enquanto que neste trabalho, ao se usar BAP a 1,5 mg.l⁻¹ obteve-se uma resposta média de brotos por explante inicial superior a cinco, independente do estabelecimento durante 10 ou 20 dias em auxina (Tabela 2).

Os dados da Tabela 2 indicam ainda, que o pré-cultivo durante 20 dias dos explantes em meio de cultura contendo AIA à concentração de 1,0 mg.l⁻¹, favorece a indução de múltiplas brotações em qualquer concentração de BAP (1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹).



FIG. 1. Indução de múltiplas brotações a partir de ápices caulinares após a transferência para meio básico MS com BAP após 30 dias de cultura.

TABELA 2. Proliferação de brotos a partir de ápices caulinares em meio MS, contendo BAP e GA₃, pré-cultivados em AIA e BAP por 10 ou 20 dias após 30 dias de cultura.

AIA (mg.l ⁻¹)	Dias	BAP (mg.l ⁻¹)		
		¹ Média ± desvio padrão de brotos/explante		
		1,0	2,0	4,0
0,5	10	2,20 ± 1,32	4,38 ± 3,11	3,50 ± 2,12
	20	1,75 ± 0,96	3,12 ± 1,36	6,20 ± 3,27
1,0	10	3,0 ± 1,41	5,00 ± 0,00	3,33 ± 1,03
	20	5,50 ± 2,07	5,67 ± 1,53	6,00 ± 2,38
2,0	10	3,75 ± 0,50	4,17 ± 1,47	4,00 ± 1,30
	20	3,67 ± 2,08	3,00 ± 1,15	2,00 ²
Testemunha ³	10	1,50 ± 0,58		
	20	1,00 ²		

¹ Média de cinco repetições.

² Dados referente a uma repetição devido à contaminação dos outros materiais.

³ Tratamento sem regulador de crescimento mas que foram transferidos para novos meios de cultura no mesmo período.

O enraizamento dos brotos (Fig. 2) foi possível tanto em AIB quanto em ANA, em todas as concentrações testadas (0,5; 1,5 ou 2,5 mg.l⁻¹), porém, foi observada maior formação de número de raízes quando os brotos foram transferidos para meios de cultura contendo ANA. Matews & Rao (1984) e Khoon & Talib (1985) promoveram o enraizamento de brotos quando usaram ANA como auxina, porém em concentrações inferiores às usadas neste trabalho (0,2 e 0,1 mg.l⁻¹). Isto demonstra o papel relevante desta auxina na indução de raízes. A aclimação desses brotos enraizados ("plantlets") foi obtida com sucesso em condições de elevada umidade relativa do ar e em substrato com terra preta, serragem e matéria orgânica (Fig. 3). As plantas desenvolveram-se normalmente, com morfologia similar a das plantas propagadas por método convencional e podem ser testadas para a implantação de novos campos de produção de pimenta-do-reino (Fig. 4).



FIG. 2. Enraizamento "in vitro" de brotos de pimenta-do-reino em meio básico MS com ANA ou AIB após 30 dias de cultura.



FIG. 3. Aclimação de "plantlets" de pimenta-do-reino em substrato composto de terra preta, serragem e matéria orgânica na proporção de 2:1:1.



FIG. 4. Plantas de pimenta-do-reino provenientes de propagação "in vitro" com desenvolvimento normal.

CONCLUSÕES

- Plantas de pimenta-do-reino foram propagadas "in vitro" através das técnicas de cultura de tecidos;
- O pré-cultivo de explantes em meio de cultura MS contendo AIA e BAP por período de 20 dias favoreceu a proliferação de múltiplas brotações em ápices caulinares quando o BAP foi usado, posteriormente, às concentrações de 1,0; 2,0 ou 4,0 mg.l⁻¹;
- O enraizamento dos brotos foi facilmente induzido em meio de cultura MS contendo como auxina ANA ou AIB; e,
- Os "plantlets" foram aclimatados sem problemas sob condições de elevada umidade relativa do ar em substrato composto de terra preta, serragem e matéria orgânica na proporção de 2:1:1 e desenvolveram-se com morfologia semelhante a das plantas propagadas pelo método convencional.

AGRADECIMENTOS

Ao governo japonês, através da Japan International Cooperation Agency (JICA), pelo financiamento de equipamentos, drogas e vidrarias para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F. C. de; DUARTE, M. de L. R. *Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência da fusariose no Estado do Pará*. Belém: Embrapa-CPATU, 1991. 40p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 59).
- ALBUQUERQUE, F. C. de; DUARTE, M. de L. R. *Comportamento de cultivares de pimenta-do-reino em áreas de ocorrência da fusariose*. *Fitopatologia Brasileira*, v.11, n.2, p.346, 1986. Resumos.
- ALBUQUERQUE, F. C. de; DUARTE, M. de L. R. *Pimenta-do-reino e suas doenças na região amazônica*. *Correio Agrícola*, v.2, n.3, p. 114-119, 1977.
- ALBUQUERQUE, F. C. de. *Piper colubrinum* Link. porta-enxerto para *Piper nigrum* L. resistente às enfermidades causadas por *Phytophthora palmivora* Butl. e *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.3, p.141-145, 1968.
- CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. *Rapid multiplication of musa of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture*. *Hort Science*, Alexandria, v. 19, p.324-325, 1984.
- EMONS, A. M. C.; SAMELLO-DROPPERS, A.; VAN DER TOOR, C. *The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of zea mays L. from suspension cultures*. *Journal Plant Physiology*, v.142, p.597-604, 1993.

- FITCHET, M. Establishment of *Piper nigrum* in vitro. *Acta Horticulturae*, v.272, p.285-291, 1990.
- KHOON, C. B.; TALIB, S. S. Effects of naphthalene acetic acid and phenolic substances on rooting of pepper shoots cultures in vitro. *MARDI Research Bulletin*, v.13, n.1, p.108-110, 1985.
- INTERNATIONAL PEPPER NEWS BULLETIN. Jakarta, v. 17, n.4, p.1-48, 1995.
- MATHEWS, M.H.; RAO, P.S. In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum*). *Current Science*, v. 53 n.4, p.183-186, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p. 473-497, 1962.
- MILANEZ, D.; VENTURA, J.A.; FANTON, C. J. *Cultura da pimenta-do-reino*. Vitória: EMCAPA, 1987. 94p. (EMCAPA. Documentos,33).
- MILANEZ, D.; VENTURA, J. A. *Métodos de produção de mudas de pimenta-do-reino*. Vitória, ES: EMCAPA, 1987. p.10-20. (EMCAPA. Documentos, 42).
- PHILIP, V.J.; JOSEPH, D.; TRIGGS, G.S.; DICKINSON, N.M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. *Plant Cell Reports*, Heidelberg, v.12, p.42-44, 1992.