

SIMPÓSIO 1 - Fusariose da pimenta-do-reino: impacto sócio econômico e avanços no controle da doença/ *Piper nigrum fusariose: social and economic impact and new approach for the disease control*

RETROSPECTIVAS, AVANÇOS E PERSPECTIVAS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PIMENTA-DO-REINO VISANDO RESISTÊNCIA À FUSARIOSE. Marli Costa Poltronieri, Fernando Carneiro de Albuquerque & Maria Rosa Costa de Oliveira (Embrapa – Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Cx. Postal 048, 66017-970 – Belém, Pará). *Retrospections, advances, and perspectives for the genetic breeding program with Piper nigrum for Fusarium resistance.*

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma piperácea originária das florestas da Índia, cujo consumo e a produção são antigos, havendo relatos históricos sobre o comércio desta especiaria já no século IV A.C. No transcorrer do século XV, quando Portugal e Espanha concorriam na descoberta de novas terras em busca de especiarias e pedras preciosas, a pimenta-do-reino, pelo seu elevado valor comercial, era um dos produtos mais procurados e valorizados. Com a descoberta da rota marítima para as Índias, Portugal transformou-a em monopólio da coroa, passando assim a usufruir de bons lucros com seu comércio. Desse monopólio real surgiu a designação de pimenta do reino, pela qual esta espécie é conhecida em Portugal e no Brasil.

A introdução da espécie *Piper nigrum* L. no Brasil deu-se por volta do século XVII, pelo estado da Bahia, mas só se estabeleceu como cultivo comercial após 1933, com a introdução da cultivar Kuching, que no Brasil recebeu o nome de Cingapura. Dentre os Estados brasileiros, o Pará ainda é o maior produtor, onde a cultura é significativamente importante por ser um produto de exportação e geradora de divisas para o Estado. Entre os países exportadores o Brasil ocupa o terceiro lugar, tendo atingido em 1991 uma produção de cerca de 50.000 t, decrescendo a partir de então, e chegando em 1996 a 13000 t.

Os trabalhos voltados ao melhoramento genético de pimenta do reino concentraram-se principalmente na Índia, onde as pesquisas para obtenção de cultivares tiveram início em 1952. Em Porto Rico, alguns ensaios foram iniciados em 1953, na Indonésia em 1960, na Malásia (Sarawak) em 1962. Nestes países o programa de melhoramento visa a obtenção de cultivares com resistência a pragas e doenças, principalmente relacionados com a resistência à podridão das raízes, causada pelo fungo *Phytophthora capsici* Leonia.

A redução da produção brasileira de pimenta-do-reino nos últimos anos deveu-se, entre outros fatores, aos problemas de mercado, acentuada baixa nos preços no âmbito internacional, elevado custo de produção (insumos e mão de obra), e, o mais agravante, a elevada incidência de doenças nos cultivos, entre as quais a fusariose (*Nectria haematococca* Berk & Br. f. sp. *piperis*) desponta como a mais importante, pois influencia de forma significativa a longevidade das plantas, reduzindo o ciclo produtivo e afetando diretamente a produção.

No Brasil, as atividades de pesquisa com melhoramento genético de pimenta-do-reino foram iniciadas utilizando-se a estratégia de introdução de genótipos, com o intuito de formar uma coleção, tendo como objetivo caracterizar, avaliar e selecionar genótipos promissores sob o ponto de vista de resistência a doenças e boa produtividade para indicação a produtores.

OBJETIVO DO PROGRAMA DE MELHORAMENTO

O melhoramento genético da pimenta-do-reino visa a obtenção de genótipos com resistência e ou tolerância a fusariose,

com características de produção desejáveis e superiores àquelas prevalentes nos cultivos atuais.

ESTRATÉGIA DE PESQUISA

Introdução de cultivares

Utilizou-se como estratégia inicial, a introdução de genótipos visando ampliar a base genética da pimenta-do-reino, detectar algum genótipo com caráter de resistência e/ou tolerância a fusariose e também selecionar genótipos com características agrônomicas desejáveis. Assim, foi introduzida a cultivar Cingapura em 1933 (Albuquerque & Conduru, 1971), sendo ainda hoje o material mais utilizado em cultivos na região, dada as características de alta produtividade e adaptabilidade. Em 1972 foram introduzidas de Mavaguez, Porto Rico, as cultivares Kudaravalli, Kaluvalli, Balankotta, originárias da Índia, e Trang da Tailândia. Em 1974 foram introduzidas também de Mayagues, as cultivares Kaluvalli Jones, Kaluvalli Kudaravalli (Índia), Kuching (Sarawak), Belantung e Djambi (Indonésia) e diretamente da Índia foi introduzida a cultivar Arkalamunda e o híbrido Panniyur-1. No período 1982 a 1984 foram obtidas da Índia, Estado de Kerala as cultivares exploradas comercialmente ou mantidas em coleção nesse Estado: Karimunda, Kuthiravalli, Kotanadan, laçara, Chumala e Perumkodi. Em 1994 foram introduzidas também da Índia nove cultivares, PMKK; Kottavalli; F1 1558 (considerado híbrido natural de Kalluvally); Karinkotta; Uthirankotta; 239 (híbrido natural de Perumkodi); Panniyur-2; Panniyur-3 e Kaluvally. Assim foi formado um banco de germoplasma que hoje é constituído por trinta e cinco genótipos da espécie *Piper nigrum* L., doze acessos de piper nativas e duas espécies introduzidas (*P. betle* e *P. attenuatum*).

Em testes para avaliação de resistência a fusariose, desenvolvidos em condições de laboratório e casa de vegetação, todas as introduções de *Piper nigrum* L. demonstraram-se suscetíveis a essa doença. Para programas de melhoramento visando resistência à fusariose, é de importância primordial a introdução, conservação, caracterização, avaliação e propagação de novas cultivares. A avaliação de caracteres agrônomicos e industriais são paralelamente considerados, visto que se existem cultivares que superem o germoplasma tradicional em produtividade e qualidade, poderão ser lançados como cultivares opcionais de interesse comercial. A coleção de germoplasma também é importante em relação a fonte de variabilidade genética para trabalhos de hibridação intraespecífica, visando combinações desejáveis para resistência e/ou produtividade.

A conservação de germoplasma de pimenta-do-reino em áreas experimentais tem enfrentado certas dificuldades devido a alta incidência da fusariose no campo experimental de Belém (PA). Assim, vem sendo estudada a possibilidade da conservação dos acessos do banco através da enxertia de *Piper nigrum* utilizando como cavalo espécies de Piper nativas. Plantas enxertadas em *Piper colubrinum* apresentaram incompatibilidade tardia, porém durante dois a três anos produziram brotações vigorosas para utilização na propagação vegetativa. A produtividade decaiu após o terceiro

ano e a maioria das plantas enxertadas morreram ou tornaram-se enfraquecidas após o quarto ano de idade.

Os genótipos Apra, Kottanadam I, Kuthiravalli, Karimunda, Balankotta, laçará 1 e Cingapura quando enxertadas em porta enxertos das espécies *Piper aduncum* e *Piper hispidinervium*, apresentaram aos doze meses de idade um bom desenvolvimento vegetativo com produção média de quinze a dezoito estacas de dois nós por planta, porém evidências de incompatibilidade foram observadas.

Das introduções realizadas foram lançadas duas cultivares, Guajarina e Bragantina, que embora sejam suscetíveis a fusariose, possuem boas características produtivas. Hoje nas áreas cultivadas com pimenta-do-reino há predominância do uso da cultivar Cingapura com aproximadamente 70 %, 29 % com a cultivar Guajarina e 1 % com a cultivar Bragantina.

Caracterização molecular

Uma das etapas do programa de melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a utilização de marcadores moleculares bioquímicos (isoenzimas) e de DNA (RAPD) no processo de caracterização desta espécie, visando dispor de informações mais precisas sobre a variabilidade genética contida nesta coleção. Dentro deste aspecto, as ações vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Genética, da Embrapa Amazônia Oriental. Numa primeira fase foi realizado um screening de sistemas enzimáticos, no qual foram selecionados os doze que apresentaram um bom padrão de amplificação e que poderão ser utilizados nas etapas subsequentes (Diaforase, 6-fosfogluconato desidrogenase, Fosfoglucoase isomerase, Malato desidrogenase, Glutamato oxaloacetato transaminase, Aconitase, Menadiona redutase, Fosfatase ácida, Fumarase, Xiquimato desidrogenase, Enzima málica e Glucose 6-fosfato desidrogenase).

Em relação aos marcadores de DNA, escolheu-se para esta fase dos trabalhos, os marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), pela simplicidade e rapidez e em consonância com a atual infra-estrutura do laboratório. O primeiro passo dado foi a otimização do protocolo de extração de DNA, utilizando folhas médias como material vegetal. Atualmente está sendo realizada a seleção de primers (oligonucleotídeos) visando definir os que serão utilizados nos estudos de divergência genética desta espécie. Para isso estão sendo testados inicialmente quarenta primers. Após esta fase serão realizadas as reações de amplificação no material irradiado e na coleção de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental.

Hibridações Intraespecíficas

Estudos sobre biologia reprodutiva mostraram que a maioria das cultivares introduzidas apresentaram flores hermafroditas e o estágio protogínico é comum a todas as introduções, com variação apenas em número de dias com média de três a sete dias, dependendo das condições climáticas, pois em período mais seco pode chegar a dez dias. Levando-se em consideração o período protogínico e o efeito da geitonogamia com dispersão de pólen em água, foi desenvolvido um método de polinização controlada para obtenção de híbridos.

Na Índia, a maioria das variedades são obtidas através de polinização controlada. Em 1967 foi obtido o híbrido Pannyur-1 que produz quatro vezes mais que as variedades tradicionais, sob as mesmas condições. Este híbrido foi obtido através de cruzamentos sucessivos envolvendo 30 combinações entre várias variedades.

A hibridação intraespecífica tem como objetivo explorar o vigor de híbrido para caracteres desejáveis como precocidade, produção, amadurecimento regular, vigor, espigas abundantes e longas, alta taxa de flores hermafroditas sobre o número total de flores, alta capacidade de formação de frutos, frutos e sementes graúdos, alto teor de óleo essencial e piperina, tolerância a seca, tolerância a outras doenças, embora não exista fonte de resistência

à fusariose em *P. nigrum*. A metodologia é simples e consiste na combinação de vários genótipos, fazendo-se polinizações controladas entre eles e avaliando-se o vigor híbrido. Plantas que apresentarem performance produtiva superior são clonadas e lançadas como nova variedade. Ressalte-se que a germinação da semente é realizada *in vitro*, sendo usado os ápices caulinares para a clonagem via micropropagação e toda planta selecionada é multiplicada através desse processo até a produção em larga escala do material promissor.

Hibridação interespecífica

Em trabalhos de melhoramento através de cruzamentos, geralmente há preferência para que os pais sejam da mesma espécie biológica, isto porque, representantes da mesma espécie cruzam-se facilmente, para produzir híbridos férteis e apresentam pouco ou nenhum impedimento a recombinação gênica. Algumas circunstâncias podem indicar, entretanto, que certo problema de melhoramento de planta pode ser solucionado utilizando amplo cruzamento, envolvendo representantes de diferentes espécies e gêneros.

A hibridação interespecífica pode ser usada como uma alternativa a ser manipulada no melhoramento de plantas, não só no sentido de criar ou aumentar a variabilidade, mas, principalmente no sentido de introduzir características agrônômicas desejáveis tais como: resistência a doenças e pragas; precocidade; eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio; tolerância às condições ambientais drásticas (estiagem longa, baixas ou elevadas temperaturas, acidez do solo e teor elevado de alumínio). Em pimenta-do-reino esta é uma metodologia que está sendo explorada, considerando que algumas espécies nativas apresentam certa resistência ao fungo da fusariose, visa-se principalmente a introdução de genes de resistência ao material de cultivo.

Em 1975, foram iniciados os primeiros cruzamentos interespecíficos utilizando a cultivar Cingapura de *Piper nigrum* L. com a espécie *Piper colubrinum* Link. Sementes viáveis em nível de germinação foram obtidas, mas os trabalhos não tiveram continuidade. Hoje, apesar da obtenção de sementes viáveis entre várias combinações, não se tem idéia do nível de fertilidade das plantas adultas. As sementes obtidas dos cruzamentos são germinadas através do cultivo de embrião, após a obtenção das plantas F1. Estas são micropropagadas para obtenção de uma quantidade suficiente de plantas para testar nível de resistência, através de inoculações artificiais deixando estoque clonal para observações genéticas, caracterização e avaliação do híbrido obtido. Toda planta selecionada é multiplicada via micropropagação.

Seleção de genótipos após indução de mutação através de irradiação gama fonte ⁶⁰Co.

Este é um método não convencional de melhoramento que vem sendo utilizado em pimenta-do-reino como uma alternativa para indução de variabilidade genética. Consiste na irradiação de estacas e sementes de pimenta-do-reino com doses de 2,0 a 2,5 KR de raios gama na fonte de ⁶⁰Co. As plantas obtidas inicialmente (V1) são cultivadas em campo e submetidas a podas para obtenção de V2 e aumento do setor mutado nestas plantas. As plantas V2 são submetidas à primeira seleção para resistência à fusariose através de inoculação artificial. Plantas V2 sobreviventes são multiplicadas e submetidas à segunda seleção em área naturalmente infectada, obtendo-se plantas V3. As plantas V3 são cultivadas em condições de campo, iniciando-se a caracterização e avaliação. Em seguida faz-se a terceira seleção para caracteres como vigor, arquitetura da planta e produção de frutos. As plantas selecionadas são multiplicadas, obtendo-se as plantas V4, que serão plantadas em área de produtor para avaliação final em teste de competição de clones juntamente com as cultivares tradicionais. Segue-se a fase final de multiplicação do novo material, tendo-se uma nova cultivar, conforme o esquema de obtenção da figura 1. Ressalte-se que as

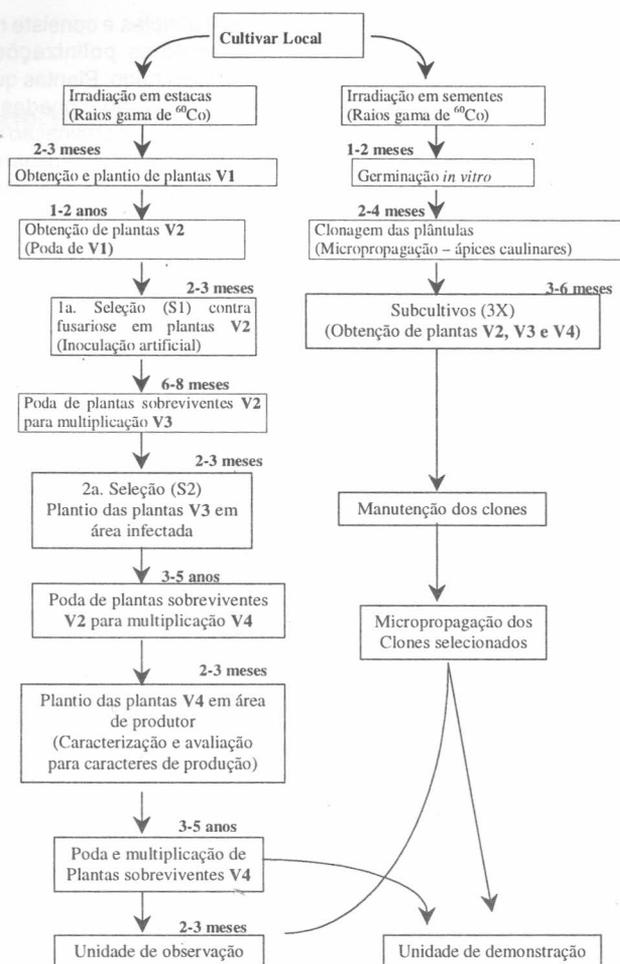


FIG. 1 - Estratégia de melhoramento genético para pimenta-do-reino visando a obtenção de mutantes em pimenta-do-reino através de irradiação gama na fonte de ^{60}Co .

etapas de multiplicação do material proveniente de sementes são realizadas através da cultura de tecidos. As sementes são germinadas *in vitro* e os ápices caulinares usados para a micropropagação. Representantes de cada planta serão mantidos *in vitro* e multiplicados após a seleção.

Esta metodologia foi baseada em ensaios anteriores, iniciados por Ando *et al* (1977) com objetivo de obter mutantes resistentes à fusariose através de irradiação gama. Assim utilizou-se 428 estacas da cultivar Cingapura que foram irradiadas no CENA/USP utilizando as dosagens já descritas acima. Após

inoculações artificial e natural (área infestada), três plantas V2 sobreviventes foram obtidas. Estas plantas foram avaliadas durante oito anos e após propagação vegetativa foram submetidas a vários insaios. Com objetivo de obter mutantes sólidos resistentes à fusariose, com vigor de crescimento e boa produtividade, as seleções foram realizadas nas gerações V3, V4 e V5 no período de 1984 a 1996, sendo selecionadas algumas plantas V5 que foram levadas a campo em área de produtor para caracterização e avaliação. Destas plantas foram selecionados três clones, M-45, M-123 e M-23 que estão sendo submetidos a teste de competição em área de produtor com as cultivares Cingapura, Guajarina, Bragantina, Kottanadan e Uthirankotta para avaliação final de produtividade.

Considerações finais

- O melhoramento genético de pimenta-do-reino, para as condições de cultivo no Brasil, tem como principal objetivo a obtenção de uma cultivar resistente ou tolerante a fusariose. Embora este objetivo seja logrado através das condições de estreita variabilidade genética e dificuldades na introdução de novos genótipos que possam ser utilizados como fonte de resistência tem-se lançado mão de vários recursos metodológicos convencionais e não convencionais que possam auxiliar na obtenção final dessa cultivar. Aqui também ressaltamos a importância e o valor do recurso genético introduzido e conservado em banco ao longo destes anos, assim como a disponibilidade para o setor produtivo de duas cultivares Guajarina e Bragantina com características de boa produtividade e adaptação às diferentes condições ambientais da Amazônia.
- As perspectivas do melhoramento genético de pimenta-do-reino são de trabalhar no sentido de ampliar a variabilidade genética através de recombinações gênicas dentro da espécie *nigrum*, e através da obtenção de mutantes por irradiação.
- A obtenção de híbridos interespecíficos resistentes a fusariose é uma alternativa que deve ser estudada passo a passo pois desconhece-se o comportamento do produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, A., ALBUQUERQUE, F.C de, POLTRONIERI, M.C & TULMANN NETO, A. Obtenção de mutantes resistentes 'a fusariose (*Fusarium solani* f.sp *piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) através de irradiação gama. In: Anais do Seminário Internacional sobre Pimenta-do-reino e Cupuaçu. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, Documentos,89. 1997.440p.
- ALBUQUERQUE, F.C. de & CONDURÚ, J.M.P. Cultura da Pimenta-do-reino na Região Amazônica. Belém: IPEAN, Fitotecnia, v.2, n.3. 1971. 149p.
- ANDO, A., MENTEN, J.O.M., TULMANN NETO, A., ALBUQUERQUE, F.C. & HIRA KATA, K. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: Regional Workshop on nuclear techniques in crop production. Proceeding.São Paulo: OEA/CIEN/CENA,1984.3p.

SELEÇÃO DE MATERIAL RESISTENTE DE PIMENTA-DO-REINO ATRAVÉS DE CULTURA DE TECIDOS. Maria de Lourdes Reis Duarte (Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Eneas Pinheiro, s/n, 66095-000, Belém, Pa. e-mail: mlourdes@cpatu.embrapa.br). *Selection of Piper nigrum resistant material by tissue culture.*

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é afetada por várias doenças, mas é a podridão das raízes e secamento dos ramos, também conhecidas como fusariose a mais importante doença da cultura. É causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* (anamórfico: *Fusarium solani* f. sp. *piperis*). Este patógeno é restrito ao Brasil e tem causado severas perdas de produção desde 1957

quando foi isolado pela primeira vez de raízes de plantas infectadas (Albuquerque, 1961).

A origem desta forma fisiológica de *N. haematococca* especializada em infectar a pimenta-do-reino e espécies afins não estava bem definida até 1997, quando foram encontradas plantas de *P. aduncum*, uma espécie nativa que vegeta próximo de igarapés, infectadas pelo patógeno. Neste hospedeiro, *N. haematococca* f. sp. *piperis* causa a morte do ramos infectados, mas a planta emite