

Multiplicação *in vitro* da Pimenta longa.

Tatiane Loureiro da Silva¹; Rodrigo da Silva Guedes²; Frederico Henrique da Silva Costa³; Jonny Everson Scherwinski Pereira⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa Acre; ²Mestrando do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFAC, Rio Branco, AC; ³Mestrando em Fitotecnia, UFLA, Lavras, MG, Bolsista CNPq; ⁴Embrapa Acre, C. Postal 321, 69908-970 Rio Branco-AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br;

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso potencial da técnica de micropropagação como ferramenta alternativa à produção *in vitro* de propágulos de pimenta longa (*Piper hispidinervum*). Para isso, a influência de meios de cultivo (MS e WPM) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg.L⁻¹) na multiplicação e desenvolvimento de microestacas foram avaliados. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 µmol.m⁻²s⁻¹, onde a altura (cm), número de brotações, taxa de multiplicação, número de folhas e vigor das plântulas foram avaliados após 60 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e cinco microestacas por parcela. Maior altura média e vigor de brotações foram verificados em meio desprovido de BAP, independentemente do meio de cultura utilizado, enquanto que maior número de brotações foi obtido em meio WPM suplementado com 1 mg.L⁻¹ de BAP. No entanto, o uso de BAP proporcionou desenvolvimento anormal de brotações sugerindo que nas concentrações testadas, este regulador é indesejável para promover uma eficiente multiplicação da pimenta longa *in vitro*.

Palavras-chave: *Piper hispidinervum*; regulador de crescimento; micropropagação.

ABSTRACT – *In vitro* multiplication of long pepper

The objective of this work was to evaluate the potential use of the micropropagation technique as alternative tool to the production *in vitro* of long pepper vegetative material (*Piper hispidinervum*). The influence of culture medium (MS and WPM) and concentrations of BAP (0, 1, 2 and 3 mg.L⁻¹) in the multiplication and microcuttings development were evaluated. The experiment was keep in a growth room at 25±2°C temperature, 16 hours photoperiod and 30 mol.m⁻²s⁻¹ radiation, where the height (cm), shoots number, multiplication rate, number of leaves and vigor of the shoots were evaluated by 8 weeks. A completely randomized design was used with five replications with five explants each one. Larger shoots height and vigor were verified in medium without BAP, independently of the medium used, while larger shoots number was obtained in medium WPM with 1 mg.L⁻¹ of BAP. However, BAP provided abnormal shoot development suggesting that in the

concentrations tested, this regulator is undesirable to promote an efficient multiplication of long pepper *in vitro*.

Keywords: *Piper hispidinervum*; plant growth regulator; micropropagation.

INTRODUÇÃO

A importância da pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) deve-se, principalmente, à presença em suas folhas e ramos finos de elevado teor de safrol, importante metabólito secundário usado pela indústria química para industrialização de fragrâncias e inseticidas biodegradáveis (Wadt, 2001). No entanto, apesar de sua relevância, poucos são os estudos acerca do uso de métodos biotecnológicos, haja vista que ainda se trata de uma espécie em fase de domesticação e praticamente desconhecida cientificamente (Sousa et al., 2001). Nesse contexto, as técnicas de cultura de tecidos podem representar uma alternativa à obtenção de material propagativo de alta qualidade genética e fitossanitária em curto período e qualquer época do ano. Para tanto, é necessário otimizar as condições de cultura, como as concentrações dos fitorreguladores e sais do meio a ser empregado (Pérez-Tornero et al., 2000). As pesquisas existentes se restringem a calogênese, cultivo de células em meio líquido e aspectos anatômicos (Santiago, 1999; Pescador et al., 2000; Valle, 2003; Costa et al., 2005), havendo, portanto, a necessidades por mais estudos.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a possibilidade de uso da técnica de micropropagação como ferramenta alternativa à produção *in vitro* de propágulos de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). Para tanto, a influência de meios de cultivo e concentrações de BAP foram avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Acre, Rio Branco, AC. Como material vegetal, utilizou-se de microestacas de pimenta longa com aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo uma gema axilar, obtidas de plântulas germinadas *in vitro* em meio básico de MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ anteriormente a adição do agente geleificante, sendo em seguida autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos para esterilização. Os tratamentos consistiram da influência do tipo de meio de cultura (MS e WPM), associado a concentrações de benzilaminopurina (BAP) (0, 1, 2 e 3 mg.L⁻¹). O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, em fatorial 2x4, sendo cada tratamento representado por cinco repetições com cinco microestacas por parcela.

Utilizaram-se frascos com capacidade para 250 ml, contendo 30 ml de meio de cultura. As condições de cultivo fornecidas foram: fotoperíodo de 16 horas, radiação luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após oito semanas de cultivo avaliaram-se as seguintes variáveis respostas: altura (cm), número de brotações, taxa de multiplicação, número de folhas e vigor das plântulas.

Os dados obtidos foram analisados com o emprego do programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados expressos em percentagem (x) foram transformados segundo arco seno $(x/100)^{0,5}$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microestacas cultivadas em meio desprovido de BAP apresentaram maior altura média e vigor de brotações. Por outro lado, o acréscimo das concentrações de BAP em ambos os meios de cultivo reduziu significativamente estas variáveis. Estes resultados são atribuídos à quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares promovidos pelas citocininas (Grattapaglia & Machado, 1990). Erig et al. (2002) observaram que, de modo geral, com o aumento dos níveis de BAP, houve redução na altura média das brotações, concordando com Leshem et al. (1988), que mencionam ser tóxico o uso de citocinina em níveis elevados, caracterizando-se principalmente, pelo demasiado enrosetamento e falta de alongamento das culturas. Para a variável número de brotações, os melhores resultados foram observados no meio WPM suplementado de 1 mg.L^{-1} de BAP. No entanto, o uso de BAP proporcionou desenvolvimento anormal de brotações sugerindo que nas concentrações testadas, este regulador é indesejável para promover uma eficiente multiplicação da pimenta longa *in vitro*, devendo-se realizar novos testes para melhor adequar uma citocinina capaz de promover aumentos significativos de material vegetal *in vitro*. De acordo com Gübbük & Pekmezci (2004), além da influência do genótipo a taxa de proliferação, a elongação de brotos são afetados pelos tipos de citocininas e suas concentrações.

Tabela 1. Influência do meio de cultura (MS e WPM) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg.L^{-1}) sobre a altura (cm) e número de brotações, taxa de multiplicação, número de folhas e vigor das plântulas formadas em pimenta longa, após oito semanas de cultivo.

BAP (mg.L^{-1})	Altura de brotação (cm)			N° de brotações			Taxa de multiplicação			Vigor*		
	MS	WPM	Média	MS	WPM	Média	MS	WPM	Média	MS	WPM	Média
0,0	5,1	4,4	4,7a	1,1	1,7	1,4b	3,8	3,2	3,5a	1,2	1,1	1,1b
1,0	1,1	1,4	2,2b	2,6	3,3	2,9a	3,7	5,3	4,5a	2,8	2,7	2,7a
2,0	1,0	1,3	2,1b	2,3	2,1	2,2ab	3,9	4,8	4,3a	2,8	2,9	2,8a
3,0	1,4	1,1	2,2b	1,3	3,4	2,3ab	3,5	4,0	3,7a	2,9	3,0	2,9a
Média	2,1A	2,0A		1,8B	2,6A		3,7A	4,3A		2,4A	2,4A	

Letras distintas, maiúsculas na horizontal e minúscula na vertical, dentro de cada variável, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * notas atribuídas: 1- bem desenvolvidos/vigorosos; 2- medianamente desenvolvidos/vigorosos; 3- pouco desenvolvidos/vigorosos.

LITERATURA CITADA

- COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S. Seleção de auxinas para a indução de calos friáveis em *Piper hispidinervium* visando o estabelecimento de cultivo de células em suspensão. *Horticultura Brasileira*, v.23, n.2, p.656, 2005.
- ERIG, A.C.; ROSSI, A. de; FORTES, G.R. de L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *In vitro* da Amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy, *Ciência Rural*, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990, p. 99-169.
- GÜBBÜK, H.; PEKMEZCI, M. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). *Turk J Agric For*, v.28, p. 355-361, 2004.
- LASZLOFFY, K.; KADER, A.M.A.; MATHE, A. In vitro propagation of 'Julryd' apple. *Acta Horticulturae*, n.300, p. 149-154, 1992.
- LESHEN, B., WERKER, E., SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, London, v.62, p.271-276, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-97, 1962.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LOPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal medium and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Ashford, v.57, p. 283-286, 2000.
- PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. e TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 15, p. 18-23, 2000.
- SANTIAGO, E.J.A. de. *Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa* (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle) em condições "in vitro" e "in vivo". 1999. 118 p. Dissertação, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SOUSA, M. DE M. M.; LÊDO, F. J. DA S.; PIMENTEL, F. A. Efeito da adubação e do calcário na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta longa. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 3, p. 405-409, 2001.
- VALLE, R. de C.S.C. *Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa* (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos. 2003. 165 p. Tese, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- WADT, L.H. DE O. *Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa* (*Piper hispidinervium* C. DC.), visando seu uso e conservação. Piracicaba: ESALQ. Tese Doutorado, 2001. 95p.