

## **Calogênese de pimenta longa é altamente dependente do tipo de explante e auxina utilizada.**

**Tatiane Loureiro da Silva<sup>1</sup>; Frederico Henrique da Silva Costa<sup>2</sup>; Jonny Everson Scherwinski Pereira<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa Acre; <sup>2</sup>Mestrando em Fitotecnia, UFLA, Bolsista do CNPq, Lavras-MG; <sup>3</sup>Embrapa Acre, C.P. 321, 69.908-970, Rio Branco, AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br

### **Resumo**

O trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes auxinas e tipos de explantes na calogênese de *Piper hispidinervum*, visando o estabelecimento de cultivos de células em suspensão. Como fonte de explantes utilizou-se segmentos foliares e internodais provenientes de plântulas germinadas *in vitro*. O meio de cultura básico foi constituído pelos sais e vitaminas de MS. Como auxinas foram testadas ANA, AIB, AIA e 2,4-D nas concentrações de 0; 2,5 e 5 mg.L<sup>-1</sup>. Os explantes foram dispostos em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio, sendo os segmentos foliares inoculados com a face abaxial em contato com o meio. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto com cinco repetições e seis explantes por parcela. As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C por três semanas, quando se procedeu a avaliação referente à formação de calo. Verificou-se que o tipo de explante influenciou significativamente a formação de calos. Explantes foliares foram mais responsivos aos internodais e para ambos os tipos de explantes a formação de calos foi maior quando cultivados em meio adicionado de ANA. Calos formados apresentaram elevada sensibilidade à degeneração e senescência a partir de 40 dias de cultivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Piper hispidinervum*, cultura de tecidos, reguladores de crescimento.

### **ABSTRACT - Callogenesis of long pepper is highly dependent of the explant and auxin types used**

The objective of this work was to evaluate the influence of auxins and explants types in the callogenesis of *Piper hispidinervum* to cultivation of cells suspension. As explant source was used leaf and internode segments obtained from plantlets germinated *in vitro*. The basal medium was constituted by salts and vitamins of MS. As auxins was tested NAA, IBA, IAA and 2,4-D in concentrations of 0; 2,5 and 5 mg.L<sup>-1</sup>. The explants were disposed in 250 mL flasks with 30 mL medium, being the leaf segments inoculated with the abaxial side in contact with the medium. Six explants per treatment were arranged in a completely randomized design with five replicates. Cultures were maintained in darkness in a growth

room at  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  for three weeks, when the callus formation was evaluated. It was verified that the explant type significantly influenced the callogenesis. Foliar explants were more responsive than internodes and for both explants the callus formation was larger when cultivated medium added of NAA. After 40 days, callus present great sensibility to degrade and degenerate.

**KEYWORDS:** *Piper hispidinervum* C. DC.; tissue culture; plant growth regulators.

## INTRODUÇÃO

Dentre as várias espécies aromáticas pertencentes à família Piperaceae, destaca-se a importância da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), planta cujas folhas e ramos finos têm sido utilizados como fonte alternativa e natural para extração do safrol, um metabólito que apresenta elevado interesse comercial por parte das empresas de cosméticos e inseticidas (Sá & Pimentel; Wadt, 2001). Contudo, por ainda se tratar de uma espécie em fase de domesticação (Sousa et al., 2001) e praticamente desconhecida do ponto de vista científico (Sá & Pimentel, 2001), pesquisas envolvendo métodos mais eficientes de propagação e, que possibilitem avanços ao melhoramento vegetal desta espécie ou ainda favoreça a síntese deste metabólito, se fazem necessários.

A formação de calos a partir de um explante, denominada calogênese, representa uma etapa básica ao desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas através de organogênese ou embriogênese somática, (Venturieri & Venturieri, 2004), além de ser uma das principais formas de se estudar e produzir metabólitos secundários *in vitro*.

Este trabalho teve por objetivo verificar a influência de diferentes auxinas e tipos de explantes sobre a indução de calos friáveis de *Piper hispidinervum* C. D.C, visando o cultivo de células em suspensão.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Acre, Rio Branco, AC. Plântulas de pimenta longa que já estabelecidas *in vitro* foram utilizadas para a obtenção de segmentos foliares e internodais, fontes de explantes deste experimento. O meio de cultura básico foi constituído pelos sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de  $30\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $5\text{ g.L}^{-1}$  de ágar. Os tratamentos consistiram das auxinas ANA, AIB, AIA e 2,4-D nas concentrações de 0; 2,5 e  $5\text{ mg.L}^{-1}$  associado a dois tipos de explantes (segmentos foliares e internodais). O pH dos meios foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da adição do agente solidificante.

Os explantes foram cultivados em frascos de 250 mL de capacidade contendo cada um 30 mL, tendo sido os segmentos foliares inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, em que cada tratamento foi representado por cinco repetições e seis explantes por parcela. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C em condições de escuro, por três semanas, quando se procedeu a avaliação referente às variáveis percentual de formação de calo e explantes enraizados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dentro de cada regulador de crescimento comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os dados expressos em porcentagem (X) foram transformados em arco seno  $(X/100)^{0,5}$ . Utilizou-se, nas análises, o programa de Análise Estatística SANEST (Zonta & Machado, 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de ANA nas concentrações 2,5 e 5 mg.L<sup>-1</sup> promoveu os maiores percentuais de formação de calos friáveis. Além disso, os segmentos foliares apresentaram uma forte influência sobre esta variável, havendo formação de calos friáveis de maior tamanho na concentração de 5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Em relação à auxina AIB, houve formação de calos apenas nos segmentos internodais.

Alta mortalidade dos explantes foliares foi observada quando se empregou o 2,4-D nas 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, assim como também em explantes internodais, porém em menor percentual. Maior emissão de raízes foi verificado na extremidade dos explantes internodais no tratamento desprovido de auxinas. Entre as auxinas empregadas, o AIB possibilitou o maior desenvolvimento de raízes, principalmente na concentração de 2,5 mg.L<sup>-1</sup> (75,1%), havendo tendência à regeneração direta de plântulas em explantes internodais.

Constatou-se ainda rápida degeneração e morte dos calos formados, independente da auxina, concentração e explante utilizado, após 40 dias de cultivo, fato este caracterizado pelo elevado grau de oxidação dos mesmos. Resultados semelhantes foram obtidos por Valle (2003), em que a adição de 5 e 7,5 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D associado a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina promoveu total necrose dos tecidos.

Assim, conclui-se que o maior percentual de calos friáveis em pimenta longa é obtido com explantes foliares cultivados em meio acrescido de ANA a 5 mg.L<sup>-1</sup>; a adição de 2,4-D ao meio causa fitototoxicidade aos explantes, principalmente nos foliares, e; calos formados possuem elevada sensibilidade à degeneração e senescência a partir de 40 dias de cultivo.

**Tabela 1.** Efeito de tipos de explantes e auxinas sobre o percentual de calos friáveis e explantes com raízes em *Piper hispidinervum* C. DC. Embrapa Acre, 2005.

Auxinas (mg.L <sup>-1</sup> )	Formação de calo friável		Explantes com raízes	
	Folha	Entrenó	Folha	Entrenó
<b>ANA</b>				
0	0,0bA	0,0bA	0,0aB	65,5aA
2,5	83,2aA	43,1aB	0,0aA	0,0bA
5,0	91,6aA	49,6aB	0,0aA	0,0bA
<b>AIA</b>				
0	0,0bA	0,0aA	4,1bB	79,9aA
2,5	4,1abA	0,7aA	30,6aA	8,0bB
5,0	6,0aA	0,7aA	10,3abA	28,1bA
<b>AIB</b>				
0	0,0aA	0,0bA	0,7aB	95,7aA
2,5	0,0aA	2,7bA	0,0aB	71,5bA
5,0	0,0aB	31,8aA	0,0aB	49,8bA
<b>2,4-D</b>				
0	0,0aA	0,0aA	0,0aB	60,2aA
2,5	0,0aA	0,0aA	0,0aB	2,3bA
5,0	0,0aA	0,0aA	0,0aB	13,0bA

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, dentro de cada concentração e auxina testada, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

## LITERATURA CITADA

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- SÁ, C.P. de & PIMENTEL, F.A. *Viabilidade financeira da exploração da Pimenta longa em sistemas de cultivo racional e extrativismo no Acre*. Rio Branco: Embrapa Acre, 2p. (Comunicado Técnico, n. 136). Dez./2001.
- SOUSA, M. DE M. M.; LÊDO, F. J. DA S.; PIMENTEL, F. A. Efeito da adubação e do calcário no 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.
- VENTURIERI, G.A.; VENTURIERI, G.C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). *Acta Amazônica*, v.34, n.4, p. 507-511, 2004.
- WADT, L.H. DE O. *Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (Piper hispidinervum C. DC.)*, visando seu uso e conservação. 2001. 95 p. Tese, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. *Sanest - Sistema de Análise Estatística para microcomputadores*. Pelotas: UFPel, SEI, 1984. 138 p.