

Fitorreguladores e fonte de explantes na organogênese *in vitro* de pimenta longa.

Rodrigo da Silva Guedes¹; Jonny Everson Scherwinski Pereira²

¹Mestrando do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, UFAC, Rio Branco, AC; ²Embrapa Acre, C.P. 321, 69.908-970, Rio Branco, AC. E-mail: jonny@cpafac.embrapa.br

RESUMO

Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem uma etapa básica a ser abordada, visto que a resposta das plantas a organogênese é dependente da interação auxinas:citocininas e do tipo de tecido utilizado. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade organogênica de segmentos internodais e foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum*), empregando-se as citocininas BAP e cinetina (KIN). Segmentos internodais (0,5 cm) e foliares (0,5 cm²) foram excisados de plantas mantidas *in vitro* e cultivados em meio de MS com diferentes concentrações de BAP e KIN (0, 7, 14, 21 e 28 µM), acrescido de 0,05 mg.L⁻¹ de ANA. Aos 30 e 70 dias, avaliaram-se o percentual de explantes responsivos e o número de explante regenerados. Observou-se que explantes internodais responderam mais eficientemente ao processo organogênico quando comparados aos explantes foliares, que apresentaram altas taxas de oxidação. Quando se avaliou a resposta dos fitorreguladores utilizados, notou-se que em meio com BAP, as respostas regenerativas (formação de gemas) alcançaram percentagens superiores a 95% dos explantes na concentração de 28 µM. No entanto, o número de explantes apresentando brotos regenerados, maiores que 0,3mm, não alcançaram valores superiores a 6%. Isso indica que apesar de proporcionar a formação de gemas potencialmente regenerativas já aos 30 dias de cultivo, a conversão destas gemas em brotações ainda é baixo, numa clara evidencia de que após a indução, novos meios e fatores do meio devam ser testados visando aumentar essa eficiência de conversão de gemas em brotações.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper hispidinervum*, citocininas; propagação *in vitro*.

ABSTRACT – Phytoregulators and explants types in the organogenesis of long Pepper *in vitro*.

In the *in vitro* propagation, the growth regulators constitute a basic stage to be approached, because the answer of the plants to organogenesis is dependent of the auxine:cytokinine interactions and of the type of tissue utilized. This work objectived to evaluate the organogenic capacity of internodal and foliar segments of long pepper (*Piper hispidinervum*), when cultivated with BAP and KIN cytokinins. Internodal and foliar

segments (0,5 cm and 0,5 cm²) were excised of plants maintained *in vitro* and cultivated on MS medium with different concentrations of BAP and KIN (0, 7, 14, 21 and 28 µM), added of 0,05 mg.L⁻¹ of NAA. After 30 and 70 days, the percentage of responsive explants and number of regenerate explants were evaluated. It was observed that internodal explants answered more efficiently to the organogenic process when compared to foliar explants, which presented high oxidation rates. When the answer of the cytokinins was evaluated, it was observed that medium with BAP, the regenerative answers (formation of buds) reached 95% of the explantes in the concentration of 28 µM. However, the number of explants presenting regenerate shoots, larger than 0,3mm, did not reach superior values that 6%. This indicates that in spite of providing the formation of potentially regenerative buds already to the 30 days of cultivation, the conversion of these buds in shoots is still low, in a evidence that after the induction, new treatments and factors should be tested to increase the efficiency of conversion of buds in shoots.

Keywords: *Piper hispidinervum* C. DC.; cytokinins; *in vitro* propagation.

INTRODUÇÃO

Dentre as mais de 1.200 espécies do gênero *Piper*, destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), um recurso natural encontrado no estado do Acre, que tem despertado o interesse da indústria química em virtude do alto teor de safrol em seu óleo essencial. No entanto, o sistema de cultivo ou manejo desta espécie ainda não está bem definido e, devido ao grande interesse econômico, percebe-se a importância de estudos básicos para domesticação e manejo racional dessa espécie (Wadt, 2001). Além disso, pesquisas em nível celular, tanto para multiplicação e diferenciação de células e tecidos, ainda são escassas e não conclusivas (Santiago, 2003).

Na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem uma etapa básica a ser abordada, visto que a resposta das plantas a organogênese é dependente da interação auxinas:citocininas e do tipo de tecido utilizado (Pierik, 1997). Além disso, fatores como o genótipo utilizado, tipos e concentrações de reguladores vegetais, tipos e tamanhos de explantes, meios de cultura e condições de cultivo podem influenciar decisivamente no potencial regenerativo de determinada espécie (Bered et al., 1998).

Neste contexto e devido à falta de estudos básicos com a pimenta longa, objetivou-se com este trabalho avaliar a capacidade organogênica de segmentos internodais e foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), empregando-se para isso as citocininas N⁶benzilaminopurina (BAP) e cinetina (KIN).

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 segmentos foliares e internodais de plântulas de pimenta longa estabelecidas *in vitro*. Plantas axênicas de pimenta longa foram obtidas a partir da desinfestação de sementes em álcool etílico 70% (v/v), durante 1 min, seguido de solução de hipoclorito de sódio (50% da solução comercial) por 20 min. Posteriormente, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e esterilizada e, então transferidas para meio básico de MS, tendo permanecido neste por aproximadamente 30 dias. De posse das plantas, segmentos internodais (aproximadamente 0,5 cm) e foliares (aproximadamente 0,5 cm²) foram excisados e utilizados como explantes. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de BAP e KIN (0, 7, 14, 21 e 28 µM) associados a dois tipos de explantes (internodais e foliares), acrescido de 0,05 mg.L⁻¹ de ANA. Explantes internodais foram dispostos na posição horizontal, enquanto que os foliares tiveram a superfície da face abaxial em contato com o meio de cultura.

O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e seis explantes por parcela. Para o cultivo, utilizaram-se frascos com capacidade para 250 ml, contendo 30 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 µmol.m⁻².s⁻¹. Aos 30 e 70 dias, avaliaram-se o percentual de explantes responsivos e o número de explante regenerados. 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

De modo geral, neste trabalho as respostas organogênicas dos explantes internodais foram superiores quando comparados aos explantes foliares (Figura 1). Para este último, as taxas de oxidação foram elevadas, tanto na presença de BAP ou KIN. Em meio desprovido de BAP ou KIN, não se observou desenvolvimento organogênico dos explantes, sugerindo que a suplementação do meio de cultura com estas substâncias se faz necessária para a obtenção de respostas regenerativas em pimenta longa. Quando se avaliou a resposta dos fitorreguladores utilizados, notou-se nítida superioridade do BAP, no qual respostas regenerativas (formação de gemas) alcançaram percentagens superiores a 95% dos explantes na concentração de 28 µM.

Mas apesar desta alta resposta, número de explantes apresentando brotos regenerados, maiores que 0,3mm não alcançaram valores superiores a 6%. Isso indica que apesar de proporcionar a formação de gemas potencialmente regenerativas já aos 30 dias de cultivo, a conversão destas gemas em brotações ainda é baixo, numa clara evidencia de que após a indução, novos meios e fatores do meio devam ser testados visando aumentar essa eficiência de conversão de gemas em brotações.

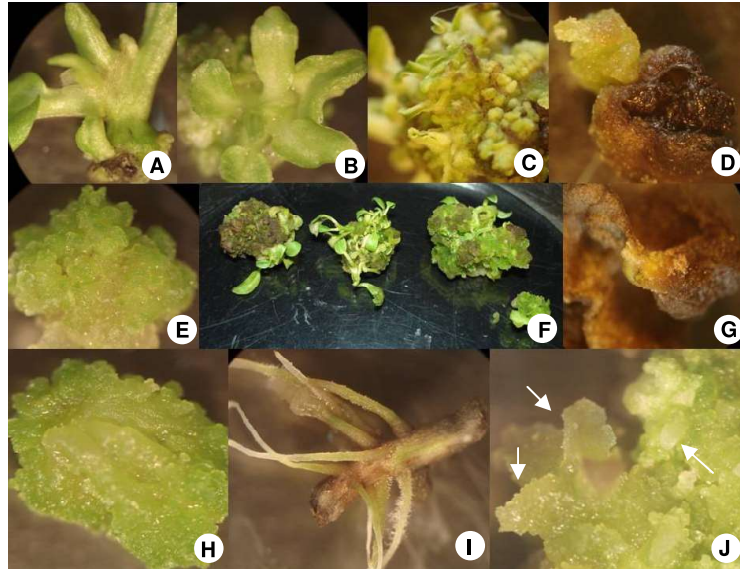


Figura 1: Aspecto geral dos explantes foliares e internodais de pimenta longa cultivados com BAP e KIN: explantes internodais regenerados na presença de BAP aos 30 dias (A, B); intensa formação de gemas regenerativas em entrenós aos 70 dias de cultivo com BAP (C); oxidação de explantes foliares aos 70 dias com BAP e KIN (D, G); calogênese regenerativa aos 30 dias na presença de BAP em explantes internodais (E); regeneração de explantes internodais na presença de KIN aos 70 dias (F); enraizamento de explantes internodais em meio desprovido de BAP e KIN (I); explantes internodais com respostas regenerativas na presença de KIN (H, J).

LITERATURA CITADA

- BERED, F.; SERENO, M.J.C.M.; CARVALHO, F.I.F. de; LANGE, C.E.; HANDEL, C.L.; PERES, L. E. P. & KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). *Plant Cell Rep.*, 18:1002-1006, 1999.
- PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.
- SANTIAGO, E.J.A. de. *Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa* (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle). 2003. 162p. Tese, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- WADT, L.H. DE O. *Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa* (*Piper hispidinervium* C. DC.), *visando seu uso e conservação*. 2001. 95 p. Tese, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.