

Conservação e Melhoramento Genético da pimenteira-do-reino

Oriel Filgueira de Lemos¹
Marli Costa Poltronieri²
Simone de Miranda Rodrigues³
Ilmarina Campos de Menezes⁴
Mateus Mondin⁵

1. Introdução
2. Conservação de germoplasma
3. Principais Cultivares
4. Programa de Melhoramento genético
5. Estudos citogenéticos
6. Aplicação das técnicas de cultura de tecidos
7. Microenxertia
8. Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites
9. Identificação de genes
10. Perspectivas futuras

Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta originária da Índia que foi introduzida no Brasil no século XVII, mas seu cultivo somente foi difundido a partir de 1933 e intensificado no Estado do Pará por imigrantes japoneses. Em nível de produção mundial, o Brasil chegou a se destacar como o maior país produtor, chegando a produzir 50.000 t em 1991. Ao longo dos anos subseqüentes, no entanto, a produção brasileira foi decrescendo, registrando 13.000 t em 1995 (Okajima, 1997), e nos últimos anos, cerca de 30.000 t anuais, dos quais quase 90% produzido no Estado do Pará.

Essa especiaria, produto tipicamente de exportação, apresenta grande oscilação de preço no mercado internacional, às vezes estimulando e outras desestimulando o cultivo. Entretanto, o que tem ocasionado sérios prejuízos, na produção e ciclo econômico no Brasil, é a ocorrência da doença fusariose a nível epidêmico nas áreas de produção. Como conseqüência, o ciclo produtivo da cultura foi

¹ Pesquisador Dr. Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental, oriel@cpatu.embrapa.br

² Pesquisadora MSc. Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental, marli@cpatu.embrapa.br

³ Pesquisadora Dra. Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Amazônia Oriental, simone@cpatu.embrapa.br

⁴ Analista MSc. Biologia Tropicada Pesquisadora, Embrapa Amazônia Oriental, ilmarina@cpatu.embrapa.br

⁵ Professor, Dr. Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP

alterado, tornando-se mais curto, com uma média de cinco a seis anos de sobrevivência em área de ocorrência da doença.

A vulnerabilidade das cultivares ao ataque do patógeno, e a rápida disseminação devido à homogeneidade genética das plantas têm contribuído para o agravamento do quadro produtivo. Isto se deve, principalmente, pela forma de propagação vegetativa utilizada, que favorece a disseminação da doença (estaquias provenientes de material original de má qualidade) e as cultivares comerciais serem susceptíveis à doença. A ocorrência de viroses do tipo PYMoV e CMV são outras doenças que vem limitando a expansão da cultura.

Embora, haja disponibilidade de vários materiais de diferentes origens no banco de germoplasma de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, a variação genética entre esses materiais é muito estreita e todos os acessos têm apresentado susceptibilidade à doença fusariose. A dificuldade de introduzir material genético do centro de origem dificulta a obtenção de fontes de resistência, apesar de ainda não ter sido documentado a doença no centro de origem da cultura. Desta forma, alguns métodos, convencionais ou não, devem ser utilizados visando ampliar essa estreita variabilidade genética.

Outras espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, têm apresentado resistência à doença fusariose, tais como as espécies de *Piper aduncum* Linn., *Piper colubrinum* Link., *Piper tuberculatum* Jacq., *P. hispidinervium* C. D. C. e *P. hispidum* Sw, que podem ser utilizadas como fonte de resistência à fusariose (Poltronieri et. al., 1999).

O uso dessa fonte de resistência necessitam estar associado a ferramentas modernas de biologia celular e molecular. Dentre essas, as técnicas *in vitro* se constituem em ferramentas valiosas para a solução deste problema, seja através da propagação rápida de plantas livres de patógenos e clonagem de material elite, resgate de embrião de cruzamentos intra e interespecíficos, geração de variabilidade genética por mutações induzidas, seleção *in vitro*, produção de plantas transgênicas e análises genético-moleculares.

Os trabalhos de pesquisas têm sido direcionados para o estabelecimento de um programa de melhoramento que associe métodos convencionais com o desenvolvimento dessas ferramentas de biologia celular e molecular. Neste caso, polinizações controladas estão sendo adotadas para a geração de híbridos intra e interespecíficos e, paralelamente, estão sendo desenvolvidos estudos citogenéticos tanto de cultivares de *Piper nigrum* quanto de espécies do gênero *Piper* visando dar suporte às estratégias de melhoramento genético.

Ademais, há pesquisas em andamento para desenvolvimento de método de microenxertia, micropropagação e regeneração de plantas *in vitro*, desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélite e identificação de genes relacionados ao processo de infecção do fungo *Fusarium solani* f sp *piperis*.

2. Conservação de germoplasma

O processo dinâmico em programas de melhoramento genético vegetal dependem da variabilidade existente dentro de cada espécie. Quando trabalhamos com espécies nativas cuja origem e dispersão encontram-se em nosso território é mais fácil dispormos de variações que nos permitam a manipulação conforme a necessidade, e quando trabalhamos com espécies exóticas, tem-se a necessidade de introduzir material genético, cujo centro de origem e dispersão estão localizados fora do nosso país, sendo mais difícil dispormos de variação desejável. Como a pimenta-do-reino é uma espécie exótica com estreita variabilidade, existe a dificuldade para introduzir material genético para estudo.

Assim, a atividade de melhoramento genético da pimenta-do-reino é dependente da disponibilidade de variabilidade mantida em Banco Ativo de Germoplasma, que quando caracterizado e avaliado contribui para a geração de novas cultivares. Segundo Duarte (2000), a introdução de germoplasma na Embrapa Amazônia Oriental iniciou depois de 1987 vindo de Mayaguez, Porto Rico, intermediado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, e outras introduções ocorreram por meio de consultores indianos. O Brasil, a partir da década de 90, vem tentando controlar a entrada e a saída de material genético, obedecendo normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que implantou o programa de quarentena coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos (Cenargen) que visa evitar a introdução de organismos exóticos no país, portanto todo material vegetal importado deve a rigor passar por esse processo.

Até 2000, o banco de germoplasma de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental era composta de 33 acessos de *P. nigrum*. Entretanto, após o aparecimento do vírus PYMV houve perda significativa desse material, quando a maioria dos acessos foram infectados. Na época para estabelecer o controle da infecção foram efetuadas medidas de erradicação de plantas infectadas. Hoje a coleção é constituída pelos seguintes acessos de *Piper nigrum*: Guajarina, Cingapura, Bragantina, APRA, Kottanadan, Kuthiravally, laçara, Balankotta, Bento, Carneiro, e Perumkodi. Paralelamente a manutenção do BAG, está sendo estabelecida a coleção

de piperáceas nativas, visando preservar algumas espécies identificadas como resistentes ao *F. solani* f sp *piperis*, composta pelas seguintes espécies: *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. attenuatum*, *P. colubrinum* e *P. hispidinervium*.

A conservação do germoplasma de pimenteira-do-reino está sendo realizada na forma de cultivo em campo e em telado, no cultivo em vaso. Pesquisas de limpeza clonal para revitalização do material genético estão em andamento no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental através da aplicação das técnicas de cultura de tecidos por cultivo de meristemas.

3. Principais Cultivares

Como resultado da introdução e avaliação de material genético de *P. nigrum* nas condições edafoclimáticas do estado do Pará, atualmente, o sistema de produção conta com as seguintes cultivares:

CINGAPURA

Foi introduzida em 1933 por imigrantes japoneses, sendo que o material original tinha o nome de Kuching, e no Brasil recebeu o nome de Cingapura, em alusão ao local de origem. É conhecida também pelo nome de pretinha, em alguns municípios do Estado do Pará.

Principais características: plantas com formato cilíndrico, folhas pequenas e estreitas, espigas curtas com comprimento médio em torno de 7,0 cm e frutos de tamanho médio (Fig 1). Não apresenta resistência às principais doenças (fusariose, podridão do pé e viroses), porém apresenta resistência à murcha amarela

Época da Colheita: A colheita das espigas ocorre no período de agosto à outubro.



Fiura 1. Cultivar Cingapura

Recomendação: É recomendada para pequenos, médios e grandes produtores, para condições de solos de textura média com boa drenagem.

GUAJARINA

Descende da cultivar Arkulam Munda e foi introduzida da Índia por volta de 1970.

Principais características: A planta apresenta formato cilíndrico quando adulta, com folhas alongadas e de tamanho médio; espigas longas, com comprimento médio de 12,0 cm, com mais de 90% de flores hermafroditas; os frutos apresentam bom enchimento nas espigas, sendo esféricos e graúdos. É suscetível a fusariose, podridão do pé, murcha amarela e viroses (Fig 2).

Época da Colheita: A colheita ocorre entre os meses de agosto à outubro.



Figura 2. Cultivar Guajarina

Recomendação: Para ambientes com período de estiagem definidos e solos bem drenados, em áreas sem ocorrência de murcha amarela.

BRAGANTINA

Introduzida no Brasil na década de 80, é um híbrido, obtido no sul da Índia, na Estação Experimental de Panniyur, no Estado de Kerala, também conhecida como Panniyur ou verdinha no Pará.

Principais características: As plantas possuem folhas largas e cordiformes; espigas longas, com comprimento médio de 14,0 cm; flores 100% hermafroditas favorecendo o bom enchimento das espigas e frutos graúdos; apresenta como

característica discriminante, a coloração verde claro dos brotos novos dos ramos de crescimento. Não apresenta resistência a fusariose, podridão do pé e viroses, porém é resistente a murcha amarela (Fig 3).

Época da Colheita: A colheita dos frutos ocorre no período de agosto à outubro.



Figura 3. Cultivar Bragantina

Recomendação: Ambientes com maior precipitação pluviométrica e solos ricos com maior retenção de umidade.

APRA

Proveniente do Estado de Kerala, sul da Índia, foi introduzida no Brasil na década de 80.

Principais características: Apresenta folhas largas com 8,88 cm de largura e comprimento médio de 13,8 cm; espigas longas apresentando comprimento médio de 12,0 cm, contendo várias fileiras de frutos graúdos (0,53 cm de diâmetro) de maturação mais tardia. Apresenta alta resistência à murcha amarela causada por *Fusarium oxysporum*, sendo suscetível à podridão das raízes e secamento dos ramos (*F. solani* f.sp. *piperis*) (Fig 4).

Época da Colheita: Considerada tardia, ocorre no período de setembro à novembro.



Figura 4. Cultivar APRA

Recomendação: Para cultivo em solo de textura média, bem drenados, melhor em consorciamento principalmente com fruteiras e espécies arbóreas.

KUTHIRAVALLY

Proveniente do Estado de Kerala, sul da Índia, foi introduzida no Brasil na década de 80.

Principais características: Apresenta folhas largas apresentando largura média de 10,12 cm e comprimento médio de 15,75 cm; espigas longas com comprimento médio de 12,04 cm, e extremidade recurvada repleta de frutos graúdos (0,49 cm de diâmetro) de maturação mais tardia. É resistente à murcha amarela causada por *F. oxysporum*, mais é suscetível à podridão das raízes e secamento dos ramos (*F. solani* f.sp. *piperis*) havendo necessidade de medidas de controle (Fig 5).

Época da Colheita: Ocorre no período de setembro à novembro, considerada também uma cultivar tardia.



Figura 5. Cultivar Kuthiravally

Recomendação: Deve ser cultivada em solos de textura média e bem drenados. Pode ser utilizada em consorcio principalmente com espécies arbórea e algumas essências florestais.

KOTTANADAN

Material proveniente da Índia (Kerala), foi introduzida no estado do Pará no período de 1988 a 1990, tendo sido avaliada primeiramente nos Municípios de Tomé Açu e Capitão Poço.

Principais características: Apresenta bom desempenho produtivo em cultivo a pleno sol. A planta adquire formato cilíndrico, ramos vigorosos, apresentando folhas largas de tamanho médio. As espigas apresentam comprimento médio de 10-13 cm, com boa formação de frutos. Não apresenta resistência a doenças de importância econômica como a fusariose, podridão do pé e viroses, tornando-se adequado medidas de controle (Fig6).

Época da Colheita: A colheita das espigas ocorre no período de agosto à outubro.



Figura 6. Cultivar Kottanadan

Recomendação: Cultivar para áreas de solo com textura média e boa drenagem. Pode ser usada em consórcio com culturas definitivas.

IAÇARÁ

Material proveniente da Índia (Kerala), foi introduzida no estado do Pará em 1981, tendo sido avaliada nos Municípios de Tomé Açu e Capitão Poço, entre 1988 e 1990. Principais características: Produção em pleno sol, planta com formato cilíndrico apresentando folhas do tipo estreita de tamanho médio. As espigas apresentam comprimento médio de 9 cm, repletos de frutos esféricos. Não apresenta resistência a doenças de importância econômica como a fusariose, podridão do pé e viroses, tornando-se adequado medidas de controle (Fig. 7).

Época da Colheita: A colheita ocorre no período de agosto a outubro.



Figura 7. Cultivar Iaçará

Recomendação: Cultivar para áreas de textura média de boa drenagem. A utilização de sistemas de consórcio cultura definitiva, estabelece equilíbrio.

As cultivares descritas acima serão utilizadas no programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental, buscando a recombinação gênica por meio de polinizações controladas no processo de hibridação intraespecífica, visando a agregação das características mais importantes de cada uma das cultivares utilizada, como a obtenção de espigas longas, grãos graúdos e pesados, precocidade e resistência à murcha amarela, dentre outras desejáveis pelos pipericultores (Quadro 1).

Quadro 1. Principais características das cultivares utilizadas no programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino na Embrapa Amazônia Oriental.

Cultivares	Espigas (média cm)	Peso de espigas (média g)	Nº de frutos/espiga	Rendimento médio pimenta preta Kg/ha	Ciclo maturação	Resistência a murcha amarela
Cingapura	8	6	27	2300	Junho/Out	Alta
Bragantina	14	14	77	2700	Junho/Out	Média
Guajarina	12	12	68	2900	Junho/Out	Nenhuma
laçara	10	8	40	2500	Setembro/Nov	Alta
Kottanadan	11	12	54	2800	Setembro/Nov	Alta
APRA	12	14	78	3100	Setembro/Nov	Alta
Kuthiravally	12	13	75	2700	Setembro/Nov	Alta

Programa de Melhoramento genético

Os programas de melhoramento, tanto convencional como não convencional, consistem na produção de variabilidade genética na população seguida pela seleção dos genótipos desejáveis (Wenzel, 1985). A maioria da variabilidade genética disponível utilizada tem ocorrido naturalmente e bancos de germoplasma existem para preservar esta variabilidade. Os cruzamentos permitem a produção de novas e desejáveis recombinações de genes. Portanto, a variabilidade genética é essencial ao melhorista por permitir o desenvolvimento de cultivares de plantas, as quais são, por exemplo:

- a) mais adaptadas às mudanças ambientais;
- b) mais eficientes na utilização de nutrientes;
- c) mais tolerantes a pragas e doenças; e
- d) mais produtivas e de melhor qualidade.

A seleção é a força direcional dos melhoristas de plantas para identificar, dentro de uma população variável, os melhores genótipos que respondem às

demandas de produtores agrícolas, agroindústrias e consumidores. A hibridação, a recombinação e a mutação, tanto espontânea quanto induzida, se constituem os fatores mais importantes na geração de variabilidade em plantas (Donini & Sonnino, 1998). Portanto, um programa de melhoramento genético convencional tem três estágios: a criação da variação, a seleção de variantes benéficos e ensaios em campo para confirmar os variantes selecionados (Cassels, 1998).

As pesquisas para o melhoramento genético de pimenta-do-reino foram iniciadas em 1952 e são concentradas principalmente na Índia, com o objetivo de obter novas cultivares. Em Porto Rico, alguns ensaios foram iniciados em 1953, na Indonésia em 1960, na Malásia 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. No Brasil, as atividades de pesquisa voltadas para o melhoramento genético de pimenta-do-reino foram iniciadas na década de 80, utilizando-se a estratégia de introdução e avaliação de genótipos, com o intuito de selecionar genótipos superiores para resistência à fusariose e alta produtividade para indicação a produtores (Poltronieri et al. 2000).

O programa atual de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental, visa a obtenção de híbridos intraespecíficos provenientes de polinizações controladas entre genótipos da espécie *P. nigrum*, para detecção de combinações que expressem caracteres produtivos superiores aos pais (vigor híbrido), ou seja, produção de espiga/planta, comprimento das espigas, tamanho dos frutos, espessura da casca dos frutos, tamanho das sementes seca, peso das sementes seca, percentual de flores hermafroditas, arquitetura da planta, nº de ramos ortotróficos e plagiotróficos, capacidade de aderir ao tutor (raízes adventícias), tolerância à seca, tolerância à poda, adaptação a cultivos consorciados e adaptação ao cultivo em tutor vivo. As combinações de plantas que estão sendo utilizadas pela Embrapa são Bragantina X Cingapura, Bragantina X Guajarina, Bragantina X APRA, Bragantina X Kottanadan, Bragantina X Kuthiravally, Bragantina X Iaçará (Figura 8). Nessas combinações, o progenitor feminino será unicamente a cultivar Bragantina, sendo que simultaneamente a essas combinações serão utilizados todos os recíprocos (a cultivar Bragantina passa a ser o progenitor masculino nas combinações). A utilização de híbridos com bom desempenho produtivo é altamente desejável, embora nesse caso não tenhamos plantas resistentes à fusariose, pois nas cultivares de *P. nigrum* disponível no Brasil não há fonte de resistência para essa doença.

Nos programas de melhoramento convencional, geralmente há preferência na utilização de pais que sejam da mesma espécie biológica, isto porque, representantes

da mesma espécie cruzam-se facilmente produzindo híbridos férteis e apresentam pouco ou nenhum impedimento para recombinação gênica. Alguns casos, entretanto, há necessidade de lançarmos mão de cruzamentos amplos envolvendo representantes de diferentes espécies e gêneros, devido a baixa variabilidade genética intraespecífica. Nesse caso, a hibridação interespecífica pode ser adotada como método não só no sentido de criar ou aumentar a variabilidade genética, mas principalmente, devido a possibilidade de introduzir características desejáveis, tais como resistência a doenças e pragas; precocidade, tolerância ambientais drásticas. Para a pimenta-do-reino também estão sendo realizados trabalhos visando a obtenção de híbridos interespecífico, considerando que algumas espécies de *Piper* nativas apresentam resistência ao fungo causador da fusariose (Poltronieri et al., 2000).

Neste sentido estão sendo testadas as seguintes combinações para avaliar a compatibilidade e a viabilidade de produção de híbridos férteis: Bragantina X *P. aduncum*, Bragantina X *P. hispidinervium*, Bragantina X *P. attenuatum*, Bragantina X *P. arboreum*, Bragantina X *P. columbrinum*. Após a obtenção dos híbridos, serão necessárias algumas gerações de retrocruzamento com o progenitor de *P. nigrum* (Bragantina) para a obtenção de uma cultivar com características de produção de *P. nigrum* e apresentando resistência ao fusarium (Figura 9).

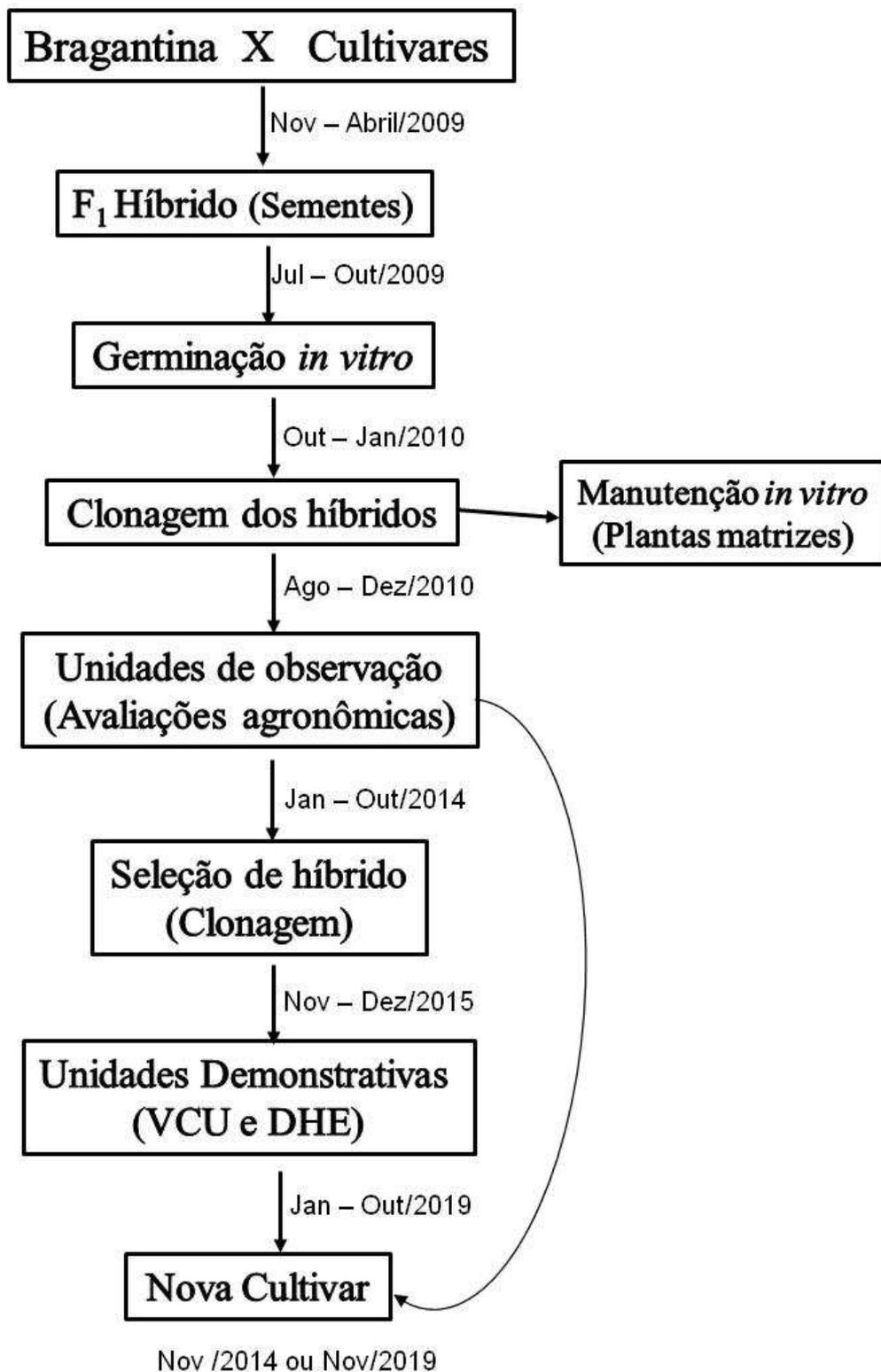


Figura 8. Estratégia usada para a geração de novas cultivares por meio do método de hibridação intraespecífica.

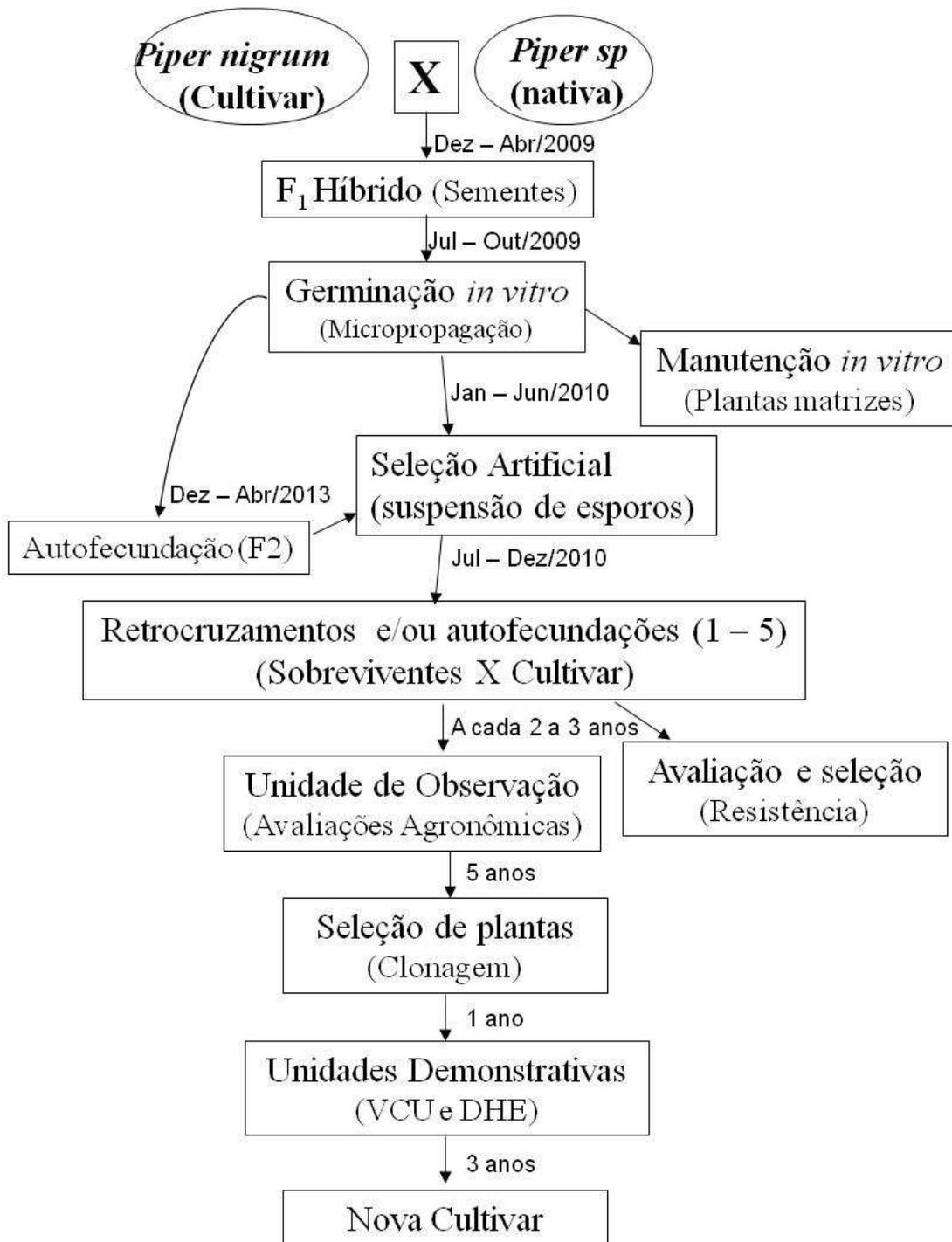


Figura 9. Estratégia usada para a introgressão de genes de resistência à doença fusariose e geração de novas cultivares por meio do método de hibridação interespecífica.

Um programa de hibridação de sucesso com pimenteira-do-reino foi conduzido na Índia entre quatro parentais e deu origem ao primeiro híbrido cultivado comercialmente. A combinação entre as cultivares “Uthirankotta” x “Taliparamba-1” (“Cheriyakaniayakkadan”) produziu 69 sementes, das quais 14 plantas F₁

sobreviveram e uma delas apresentou comprimento de espiga médio de 10 cm com 82 flores por espiga e 82% de frutificação. Este híbrido foi multiplicado e apresentou performance superior em todas as características quando comparado às cultivares locais. Do início das hibridações ao lançamento do híbrido denominado Panniyur-I, decorreram 13 anos (Nambiar et al., 1978).

A propagação de pimenta-do-reino é realizada tanto por sementes quanto através de estacas vegetativas. Costuma-se adotar o primeiro quando o objetivo é basicamente os programas de melhoramento, enquanto que a propagação realizada por estacas é a forma tradicional de produção de mudas para plantios comerciais. A viabilidade da semente de *P. nigrum* é perdida rapidamente após 40-50 dias de armazenamento, enquanto a germinação ocorre entre 15 a 90 dias após semeadura, dependendo da cultivar e das condições ambientais (Nambiar et al., 1978).

Estudos citogenéticos

As pesquisas em citogenética tem como objetivo central a caracterização citogenética de acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa-CPATU. Entende-se como caracterização citogenética a descrição dos cromossomos de uma espécie a partir da contagem do número em células somática e montagem de cariótipos e idiogramas a partir de análises morfométricas e da obtenção de marcadores cromossômicos mapeados por hibridação molecular *in situ* fluorescente (FISH) de seqüências de DNA, principalmente os repetitivos em *tandem* e os dispersos.

Buscar-se-á atingir esta meta pela Coleta de raízes e pré-tratamentos das mesmas visando a construção e organização dos cariótipos e idiogramas, de acordo com Levan et al. (1964), realizando a determinação do número de cromossomos, análise morfométrica, e determinação do conteúdo de DNA (valor-C), cujas informações servirão de base para o programa de melhoramento e de introgressão de genes via cruzamentos interespecíficos. Ademais, buscar-se-á a obtenção de marcadores cromossômicos específicos e construção de mapas cromossômicos, pois a determinação dos alinhamentos das seqüências de diferentes espécies permitirão inferir sobre a possibilidade de pareamentos meióticos corretos nos híbridos e prever o comportamento dos cromossomos nestes híbridos.

Estes procedimentos permitem a obtenção de mapas cromossômicos (citogenéticos) que podem ser comparados intra- ou interespecificamente, sendo possível inferir sobre a organização e evolução dos genoma, e fornecendo subsídios para o direcionamento dos programas de melhoramento quanto a elaboração de planos de cruzamentos dirigidos para obtenção de linhagens, variedades ou híbridos e híbridos interespecíficos, para introgressão genética. Diretamente estes estudos

permitem um melhor entendimento sobre a taxonomia, biodiversidade e processos evolutivos nos trópicos.

Aplicação das técnicas de cultura de tecidos

Nas últimas décadas, as técnicas de cultura de tecidos e de biologia molecular passaram a ter grande significância em todas as áreas da biologia pura e aplicada. Suas aplicações na área vegetal têm sido na micropropagação em massa, multiplicação rápida de genótipos superiores, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma, clonagem de genes e obtenção de plantas transgênicas de espécies de importância na agricultura e indústria (Nitzsch, 1983; Krikorian, 1990).

A conservação de germoplasma tem sido reconhecida como uma forma vital para o melhoramento de plantas, pois assegura a disponibilidade de germoplasma proveitoso em qualquer tempo e evita o processo de erosão genética (Roca, 1984). A conservação *in vitro* é, particularmente, importante para espécies de propagação vegetativa e espécies que apresentam sementes recalcitrantes. As plantas conservadas em campo, além dos elevados custos, correm riscos de perdas de genótipos valiosos devido à ocorrência de pragas, doenças e outros fatores de estresses ambientais (Ng & Ng, 1991). A conservação *in vitro* por cultivo mínimo oferece uma solução imediata para manutenção a curto e médio prazo, enquanto a criopreservação é uma solução para conservação a longo prazo (Stanwood, 1985).

Também, a cultura de embrião, uma outra aplicação das técnicas de cultura de tecidos, permite recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis, superar dormência e esterilidade de sementes, estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião, desenvolver métodos de micropropagação, e testar viabilidade de sementes (Hu & Ferreira, 1990).

As técnicas de cultura de células e tecidos permitem a regeneração de plantas tanto através da formação de gemas caulinares (organogênese) quanto de embriões somáticos (embriogênese). Essas duas vias de regeneração de plantas podem ser de origem uni ou multicelular, diretamente a partir de células do tecido original ou indiretamente via formação de calos. As diferenças entre ambas são anatômicas, sendo a gema uma estrutura monopolar com ampla conexão vascular com o tecido do explante, enquanto o embrião somático é uma estrutura bipolar sem conexão com o explante através da vascularização (Vieira e Apezato-da-Glória, 2001).

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em pimenta-do-reino tem sido realizada por Mathews & Rao (1984), que verificaram a formação de calos na maioria

dos explantes usados no estudo (segmentos de hipocótilo, gemas axilares, ápice caulinar), em meio de cultura contendo uma larga combinação de auxina-citocinina, com exceção de segmentos de folha e tecido de antera. Além disso, observaram que ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* diferenciaram em múltiplas brotações quando cultivado em meio MS contendo IAA e BA (1 mg.L⁻¹ de cada) e enraizados em meio contendo a metade da concentração dos sais MS, suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de NAA.

Khoon & Talib (1985) estudando o enraizamento *in vitro* de brotos de pimenta-do-reino, verificaram que NAA (0,1 mg.L⁻¹) induz maior número e tamanho de raízes em comparação com meio de cultura sem esse fitorregulador. Philip et al. (1992) induziram uma média de 25 novos brotos por meristema caulinar após 3-4 subcultivos, com intervalo de 30 dias por subcultivo, o que, segundo o protocolo sugerido pelos autores, permitiria uma produção estimada de 15.000 plantas a partir de um explante por ano, quando comparado com apenas 50 estacas enraizadas por planta por ano, convencionalmente obtidas por propagação vegetativa. Ressalte-se que, um ponto limitante foi o problema de contaminação por bactérias endógenas apresentado pelos explantes provenientes de plantas adultas.

A regeneração de plantas via embriogênese somática foi obtida por Joseph et al. (1996) a partir de calos provenientes de embriões zigóticos cultivados em meio básico SH sólido ou líquido desprovido de fitorregulador ou na presença de 2,4-D (0,5 a 5,0 mg.L⁻¹). Os embriões somáticos originados a partir dos calos germinaram em meio líquido ou sólido com metade da concentração de sais de SH, sem reguladores de crescimento e nível de sacarose reduzido de 3% para 1,5%. A germinação dos embriões somáticos ocorreu após oito meses de cultivo em meio de cultura estático e oito semanas em cultura de suspensão, sendo as plantas estabelecidas em solo.

Na Embrapa Amazônia Oriental, o processo de micropropagação é iniciado desde a obtenção de fontes doadoras de explantes, assepsia, proliferação de novas gemas, enraizamento, aclimatação e formação de mudas. A obtenção de fontes doadoras de explantes é fundamental para iniciar o processo de aplicação das técnicas *in vitro*. Tais fontes se constituem de plantas obtidas a partir de estacas ou germinação de sementes.

Para a produção de plântulas *in vitro*, as sementes apresentaram melhores respostas quanto a conversão em plântulas em meio de cultura com a metade da concentração de sais de MS acrescido de 0,17 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ (Figura 10). O processo de micropropagação é estabelecido através da utilização de explantes assépticos (gemas axilares e apicais) a partir de plântulas obtidas *in vitro*, em meios de multiplicação de gemas, seguindo as etapas de enraizamento, aclimatação e

formação de mudas em casa-de-vegetação. Além disso, meristemas e gemas provenientes de plantas propagadas via estacas, foram submetidas a tratamentos de assepsia, e estão sendo usados para o estabelecimento do método de limpeza clonal e clonagem de plantas das cultivares em uso no sistema de produção.

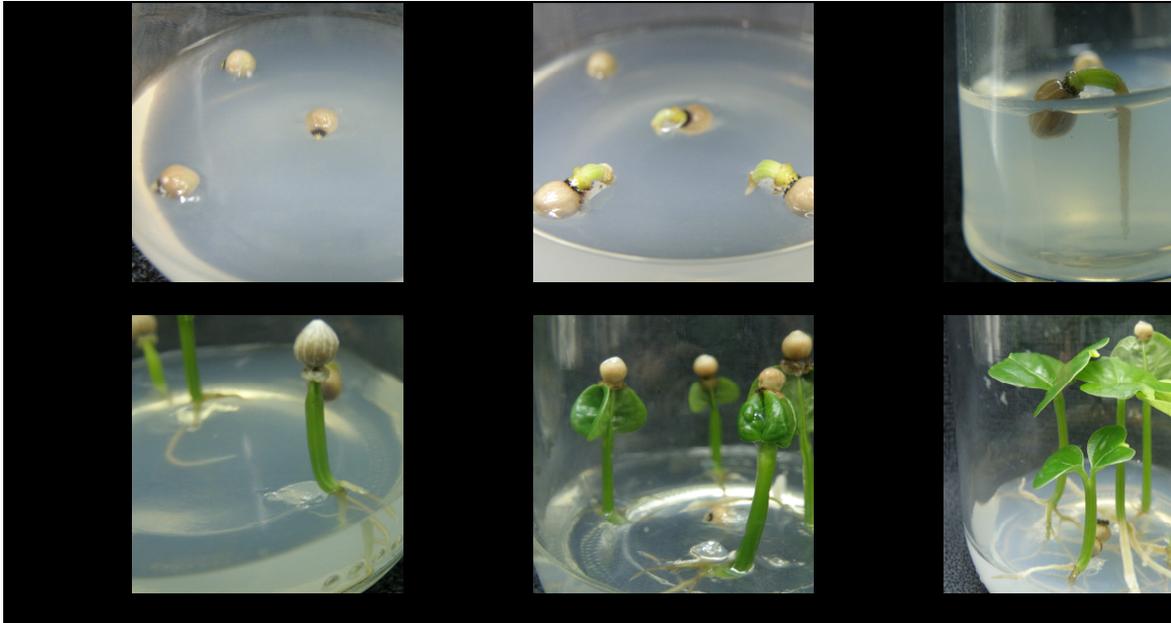


Figura 10. Etapas da germinação de pimenteira-do-reino: aos 30 dias (a), aos 37 dias (b), aos 50 dias (c), aos 60 dias (d), aos 67 dias (e), e aos 80 dias (f).

As gemas fornecidas pelas plântulas *in vitro* após duas semanas de cultivo, em meio básico de cultura MS suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ com BAP e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de IAA, com aspecto verde, mas não diferenciadas, foram estabelecidas em cultura. A proliferação de brotos ocorreu após oito semanas (média de 3,4 a 5,2 gemas/tratamento), desenvolvendo melhor performance na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, sendo a média de 5,6 novas gemas por explante (Figura 11). O melhor resultado de enraizamento dos brotos ocorreu em meio básico MS contendo $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA, seguido de aclimatização em substrato do tipo vermiculita e formação de mudas em substrato de terra preta e esterco na proporção de 3:1 (Figura 12).



Figura 11. Indução e multiplicação de brotos de pimenteira-do-reino.

Ademais, a cultura de tecidos pode ser usada para gerar variação genética, denominada de variação somaclonal, similar àquelas originadas por mutagênicos químicos e físicos. Tais materiais podem ser incorporados em programas de melhoramento genético. Através da seleção *in vitro*, mutantes com tolerância a fatores abióticos e resistência a doenças podem ser isolados em curto período de tempo e serem inseridos nas seleções de campo. O uso de marcadores moleculares tais como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e microsátélites são ideais para estudos de diversidade genética e genotipagem (Jain, 2001).



Figura 12 – Enraizamento, aclimação e formação de mudas a partir de plantas produzidas *in vitro*.

Microenxertia

A enxertia surgiu como uma alternativa de controle da doença fusariose em pimenteira-do-reino e foi desenvolvida utilizando três espécies nativas da Amazônia, *Piper colubrinum*; *P. aduncum* e *P. hispidinervium*, como porta-enxerto para a espécie exótica. Essas combinações de enxerto e porta-enxerto apresentaram reações de incompatibilidade tardia entre os sistemas vasculares das espécies (Albuquerque et al., 1998; Duarte e Albuquerque, 1999).

Ainda, visando reduzir os danos provocados pela fusariose, a Embrapa Amazônia Oriental, em parceria com universidades estaduais e federais, propôs uma série de pesquisas. Dentre esses estudos, a obtenção de microenxertos de pimenta-do-reino usando espécies de *Piper* nativas e cultivares de pimenta-do-reino como porta-enxertos de *Piper nigrum* cultivar Bragantina.

A idéia de enxertia para essa espécie surgiu pela primeira vez após Albuquerque e colaboradores (2001) apresentarem um estudo de interação entre espécies do gênero *Piper* e o fungo *F. solani* f. sp *piperis*, em que relataram a resistência de nove dessas espécies a dois isolados patogênico do fungo. Assim, a técnica de enxertia foi realizada utilizando três espécies de *Piper*, *P. colubrinum*, *P. aduncum* e *P. hispidinervium*, como porta-enxerto para *P. nigrum*. Entretanto, essas combinações de enxerto e porta-enxerto apresentaram reações de incompatibilidade tardia entre os sistemas vasculares das espécies (Albuquerque et al., 1998; Duarte e Albuquerque, 1999).

Nesse sentido, recentemente, foi proposto obter microenxertos de pimenta-do-reino na tentativa de evitar incompatibilidade entre tecidos vegetais e/ou entre espécies, precocemente, considerados nesse estudo, visando produzir materiais genéticos superiores para a resistência a fusariose. Assim, frutos de pimenta-do-reino e de espécies nativas foram coletados do Banco Ativo de Germoplasma da pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, desinfestados e introduzidos *in vitro*. Atualmente, os materiais encontram-se em fase de germinação para serem utilizados para a obtenção dos microenxertos, os quais serão avaliados quando a eficiência de pegamento, morfologia e resistência ao patógeno.

Desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites

O conhecimento da variabilidade existente no banco de germoplasma é etapa básica para a correta caracterização e conservação do germoplasma, e ao uso adequado em programas de melhoramento genético. Para tanto, o desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares, é de extrema importância para quantificação da variabilidade e organização dos genótipos presentes em bancos de germoplasma (Souza 2001).



Figura 12. A- Planta de pimenta-do-reino *Piper nigrum* L. B- Detalhe dos frutos de pimenta

Trabalho de caracterização de *Piper nigrum* L. tem sido feito utilizando isoenzimas e RAPD (Costa & Poltronieri 2001), por meio de padrão eletroforético isoenzimático apontam a existência de heterozigosidade no material conservado na

coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental sem, no entanto, quantificar essa variabilidade. Pradeepkumar et al. 2001, utilizando 24 primers de RAPD obtiveram uma média de 15,3 bandas polimórficas por primer, e um desses, foi eficiente para diferenciar três cultivares de pimenteira cultivadas na Índia, Panniyur 4, Panniyur 5 e Panchami.

Dentre os marcadores moleculares atualmente mais difundidos, o microsatélite ou SSR (Simple Sequence Repeats) se destaca por ter características extremamente úteis no que se refere a sua utilização e aplicação. Esse marcador tem um alto nível de polimorfismo, herança codominante, com alto grau de repetibilidade e uma taxa de mutação em torno de 10^{-4} tornando-o mais indicado para caracterização de cultivares ou híbridos/clones dentro de uma espécie mesmo com estreita base genética (Powell et al. 1996; Goldstein & Scholterer, 2001).

Estudos utilizando microsatélites tem sido amplamente utilizado para caracterização de germoplasma e auxílio em trabalhos de melhoramento de diversas espécies tais como banana *Musa* sp. (Amorim et al. 2008) feijão *Phaseolus vulgaris* (Campos et al. 2005), forrageira *Stylosanthes capitata* (Santos et al, 2009.) e manga *Mangifera indica* L (Marie-France et al, 2006). Devido a importância da cultura da pimenta-do-reino para o Estado do Pará a Embrapa Amazônia Oriental desenvolveu e caracterizou marcadores microsatélite para *Piper nigrum* L. Assim, o DNA genômico foi isolado a partir de folhas de um único indivíduo da cultivar Cingapura utilizando o método CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) desenvolvido por Doyle & Doyle, 1990 e uma biblioteca genômica enriquecida com microsatélites foi construída utilizando a metodologia descrita por Bilotte et al. (1999).

As regiões repetitivas foram identificadas usando o Simple Sequence Repeat Identification Tool (Temnykh et al, 2001) e 57 clones foram positivos apresentando microsatélites. Trinta e seis desses clones contendo microsatélites, foram utilizados para desenho de primers nas regiões que flanqueiam as repetições utilizando o programa Primer Select (DNASar) e Primer3 Plus (Rozen, S.; Skaletsky, H. J. 2000). Para o teste de análise genética dos microsatélites, foram utilizados 20 acessos de *Piper nigrum* L. conservados na coleção de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental).

Os resultados mostram que o rendimento da biblioteca foi de 30 % para fragmentos contendo microsatélites e 19 % para fragmentos adequados para desenho de primers (Figura 13), o que mostra a eficiência do enriquecimento da biblioteca. Maiores percentagens de microsatélites foram do tipo simples perfeitos, e os motivos dinucleotídicos AC/TG e CA/GT foram os mais abundantes, podendo ser

atribuído ao motivo do enriquecimento da biblioteca e pelo último ser mais abundante entre os vegetais.

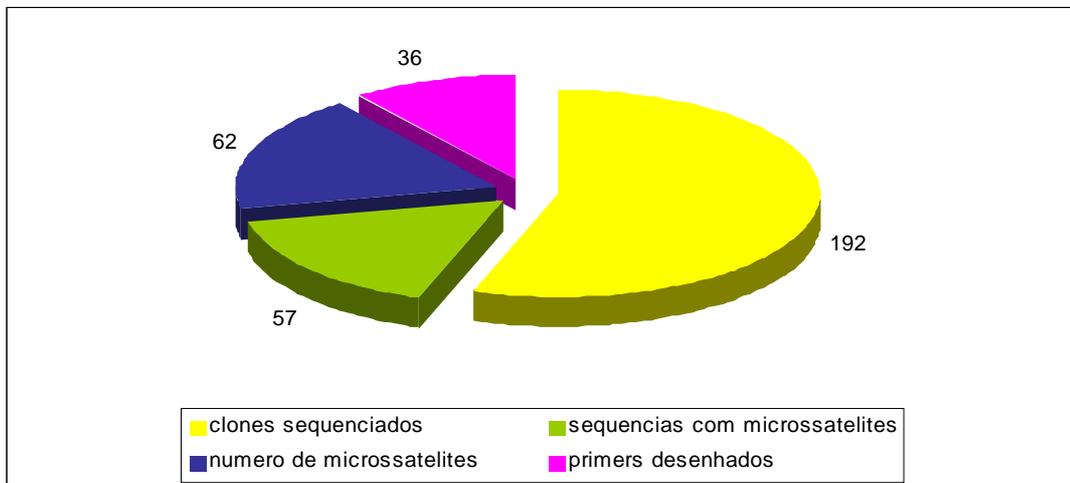


Figura 13. Rendimento da biblioteca enriquecida com microssatélites

O número de alelos variou de 3 a 10, com média de 5.8 alelos por loco. O intervalo da heterozigosidade observada foi de 0,11 a 1,00 e da heterozigosidade esperada foi de 0,477 a 0,877 com média de 0.624 e 0.721 respectivamente (Tabela 1). Os acessos avaliados conservam um nível de heterose compatível com a formação desse material, ou seja, hibridação seguida de fixação do genótipo por meio de propagação vegetativa (Anjani, 2005).

Table 1 Característica dos locos de SSRs em *Piper nigrum* L., incluindo nome dos locos, número de acesso no GenBank , sequência do primer, motivo repetido, número de alelos (Na), variação do tamanho em pares de base, heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) e valor de P (HWE)

Locus	Nº de acesso no GenBank	Sequence do Primer (5'-3')	Motivo repetido	Na	Variação do tamanho(bp)	Ho	He	P(EHW)
PN A5	FJ 172205	F 5' CTTCCAGACCAATAATCAACTT 3' R 5' ATCCCAAATAACACAACAATTC 3'	(AC)19	6	164-194	0,684	0.678	0,498
PN B5	FJ 172206	F 5' GTTTTGAATGGGTCGGTGAT 3' R 5' ATTGTTCTGATTTCTTCGTTATTG 3'	(TG)14	4	258-268	0,550	0.477	0,394
PN B9	FJ 172207	F 5' AGTATTGGTTGTTTCTCTC 3' R 5' ATGTAAAATCGATAGTCCTCA 3'	(AT)6(AC)9 GC (AC)11	5	258-304	0,350	0.586	0,078 **
PN E3	FJ 172208	F 5' TTTGTGTCCTCTCCCTCTCC 3' R 5' AAGACTAAATAGGCAAGGCAAA 3'	(CA)13	4	260-298	0,111	0.716	0,001 # **
PN F1	FJ 172209	F 5' ACTTCAGTGCTATTTTTATCTTCC 3' R 5' CCAACGCCCACTCTCAT 3'	(TG)11	10	110-152	1,000	0.877	0,263
PN G11	FJ 172210	5' TTACTAGTGTCCACCCCACT 3' 5' TCGATGGAAAGTCACCCTCT 3'	(AC)5	7	210-238	0,950	0.841	0,565
PN H4	FJ 172211	F 5' CTTTTCCCACAATTCAGTCTCG 3' R 5' ACCCATGCGTGTATCTTCTCAG 3'	(AC)9	3	258-264	0,412	0.661	0,000 #
PN H8a	FJ 172212	F 5' TGTGTCTTTTATTTTTGATG 3' R 5' TATTAGTAGTTCTCCCTTTGA 3'	(TG)16	6	266-288	0,706	0.806	0,000 #
PN D10	FJ 374758	F 5' GTGTTACCTTTGGGGCATTCA 3' R 5'TGTGTCAGGGCATCAAACC 3'	(GT)13	8	216-296	0,850	0.852	0,201

Desequilíbrio de HW $p < 0,05$ com correção de Bonferroni

** Presença de alelos Nulos (Microchecker)

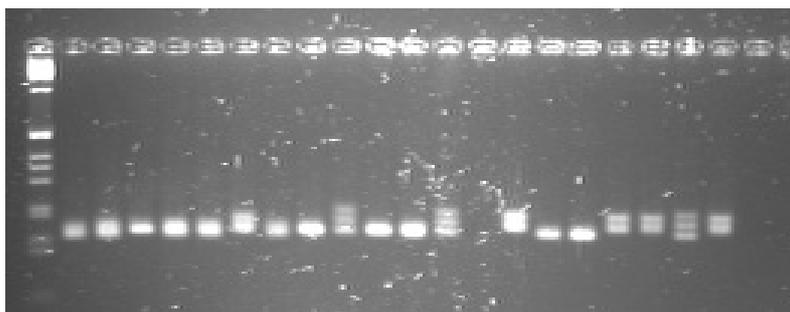


Figura 14 - Amplificação de locus microssatelite em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo

Os dados de genotipagem mostraram um padrão de bandas nitidamente diplóide em todos os microssatélites para todos os indivíduos avaliados, sem exceção, o que leva a inferir ainda que a espécie em questão é um alotetraploide, $2n = 4x = 52$.

1



Figura 14. Genotipagem de locus microssatelite em gel desnaturante de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata, mostrando marcador (1) e vinte indivíduos.

Os microssatélites desenvolvidos e identificados nesse trabalho darão suporte para caracterização do germoplasma de *Piper nigrum* L. existente no Brasil e conduzir trabalhos de melhoramento com essa espécie.

Identificação de genes

Apesar de terem sido propostas muitas pesquisas para contornar o problema da fusariose, nenhuma estratégia ofereceu solução definitiva para a fusariose. Como poucos estudos foram desenvolvidos a nível molecular, a Embrapa Amazônia Oriental e a Universidade Federal do Pará, recentemente, aprovaram um projeto para identificar sequências gênicas putativas do fungo envolvidas no mecanismo de interação entre uma espécie de *Piper* sp., nativa da Amazônia, e o patógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

As informações serão obtidas via plataforma Solid de sequenciamento, e serão analisadas via bioinformática. Essa proposta de pesquisa está incluída no projeto da Rede Paraense de Genômica e Proteômica liderado pela UFPA e financiado pela FAPESPA, o qual visa oferecer informações genéticas para apoiar o programa de melhoramento da pimenteira-do-reino na Embrapa Amazônia Oriental. A identificação de sequências gênicas do fungo, envolvidas no processo de interação planta-patógeno, por meio da construção de bibliotecas de fragmentos da planta e do patógeno, nas condições controles e obtidas durante o processo de interação, permitirá a criação de um banco de dados curado, contendo sequências genéticas de alto nível de informação e com mínimo de redundância de seqüências de proteínas, expressão gênica, função celular, famílias de proteínas e dados taxonômicos.

Ainda, essa pesquisa possibilitará compreender o processo de interação entre a planta e o fungo, assim como também, identificar potenciais sequências-alvos do fungo, envolvidos na capacidade de causar infecção, além de serem sugeridas quais proteínas da planta podem ser ativadas para conferir a fenótipo de resistência a esse patógeno. Também, será possível cruzar informações genéticas com o genoma de outros fungos desse gênero já sequenciados, o que permitirá inferir a respeito da funcionalidade de sequências gênicas, e suas relações em diferentes estágios de infecção. Ainda, essa estratégia poderá indicar aqueles com maior potencial de controle do patógeno. Secundariamente, sabendo quais são os genes responsáveis pelo processo de infecção, poderão ser produzidos "kits" para a detecção mais precoce do fungo e eliminação das plantas doentes no início do processo de infecção.

O desvendamento do transcriptoma permitirá encontrar os fatores genéticos responsáveis por tornar o microorganismo agressivo, facilitando assim a descoberta de novos medicamentos para combatê-lo. Abrirá caminho também para, no futuro, termos idéia se o fungo é sensível ou não às drogas que estarão sendo usadas. Nesse sentido, a etapa atual desse projeto está focada no processo de clonagem *in vitro* de plantas de *P. colubrinum* visando a obtenção de plântulas aclimatizadas em casa-de-vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, as quais serão usadas nos ensaios de infecção. A partir dessa etapa serão construídas bibliotecas de fragmento de cDNA para serem sequenciadas, e utilizadas nas montagens dos beads, anotação gênica e análises de informática.

Está sendo criado pela UFPA em associação com outras instituições de pesquisa do País, uma estrutura de bioinformática capaz de agrupar seqüências em clusters, realizar comparações automáticas e disponibilizar estas informações para os

anotadores durante o processo de análise dos resultados do seqüenciamento, juntamente com ferramentas que facilitam a anotação dos genes a medida que forem sendo desenvolvidas novas ferramentas de análises.

Perspectivas futuras

O desenvolvimento de ferramentas de biologia celular e molecular abre grandes possibilidades de geração de novas cultivares dentro do programa de melhoramento estabelecido pela Embrapa. A aplicação das técnicas de cultura de tecidos e o estabelecimento das ferramentas de micropropagação e regeneração de plantas *in vitro* oferece a possibilidade de limpeza clonal das cultivares que apresentam problemas de viroses, clonagem das plantas que forem selecionadas e aceleração do programa. Ademais, os estudos de citogenética dotará o programa de informações básicas para a escolha de parentais e os métodos mais adequados de polinização tanto intra quanto interespecífica. O uso de marcadores moleculares do tipo microssatélite além de possibilitar a avaliação da diversidade genética entre as cultivares disponíveis, promoverá a genotipagem para auxiliar o programa de melhoramento. Ademais, a identificação de genes que expressem características importantes podem ser incorporadas nas cultivares em uso, a partir de métodos eficientes de transgenia e regeneração de plantas. O melhoramento genético associada às técnicas *in vitro* será um grande passo na solução do principal problema da cultura, a fusariose em pimenteira-do-reino, limpeza clonal e multiplicação rápida do material genético de interesse, de modo a ser adotado mais rapidamente pelos pipericultores.

Referência Bibliográfica

- ALBUQUERQUE, F.C; DUARTE, M.L.R.; BENCHIMOL, R.L.; ENDO, T. Resistência de piperáceas nativas da Amazônica à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônia**, v. 31, n.3, p.341-348, 2001.
- ALBUQUERQUE, F.C; DUARTE, M.L.R.; STEIN, R.L.B.; ENDO, T. Reação de espécies de *Piper* a dois isolados de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. **Comunicado Técnico**, 1998.
- Amorim EP, Reis RV, Santos-Serejo JÁ, Amorim VBO and Silva SO (2008) Variabilidade genética estimada entre diploides de banana por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43: 1045-1052 p.
- Anjani K (2005) Identification of hybrids in black pepper (*Piper nigrum* L.) using male parent-specific RAPD markers. *Current Science* 88(2): 216-218.

Campos T Benchimol LL Carbonell Moraes AS Colombo CA Chioratto AF Risterucci AM and Souza AP (2005) Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CASSELLS, A.C. In vitro-induced mutation for disease resistance. In: JAIN, S.M.; BRAR, D.S.; AHLOOWALIA, B.S. (Ed.). **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement**. London: Kluwer Academic Publishers, 1998. cap.18, p.367-378.

Costa MR and Poltronieri MC (2001) Caracterização genética da pimenta-do-reino e cupuaçu através de isoenzimas. *Revista de Ciências Agrárias* 36: 9-17p.

CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botânica Brasilica* 17: 363-370, 2003.

CUCO, S. M.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. *Caryologia* 58: 220-228, 2005.

Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh leaf tissue. *Focus*, 12: 13-15.

DUARTE, M. de L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. Doenças da cultura da pimenta-do-reino. In: DUARTE, M. de L.R. (Ed.). *Doenças de plantas no trópico úmido*. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, p.159-208, 1999.

Estatística de exportação da pimenta-do-reino. Belém: [s.n.], 2009. Não paginado. Dados fornecidos pela associação brasileira dos exportadores e produtores de pimenta-do-reino (ABEP)

Goldstein BD & Schlotterer C (2001) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, pp352.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CHPH, 1990. p.71-85.

JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.

JOSEPH, B.; JOSEPH, D.; PHILIP, V.J. Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.48, p.87-90, 1996.

KHOON, C.B.; TALIB, S.S. Effects of naphthalene acetic acid and two phenolic substances on rooting of pepper shoots cultures *in vitro*. **MARDI Research Bulletin**, v.13, n.1, p.108-110, 1985.

KRIKORIAN, A.D. Baseline and cell studies for use in banana improvement schemes. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Fusarium wilt of banana**. St. Paul: APS Press, 1990. p.127-133.

LEMOS, O.F. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese de doutorado. Piracicaba-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. USP-São Paulo, p. 191, 2003.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

Marie-France D Bunel J Sitbon C Risterucci AM Calabre C and Le Bellec F. (2006) Genetic diversity of Caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite. 8 th international Mango Symposium, February 5-10, 2006, Sun City, South Africa.

MATHEWS, M.H.; RAO, P.S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum*). Current Science, **v.53, n.4, p.183-186, 1984**.

MONDIN, M.; NETO, A. D. Citogenética vegetal com enfatizando à família Orchidaceae. Orchidstudium – International Journal of Orchid Study 1: 26-54, 2006.

MONDIN, M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype characterization of *Crotalaria juncea* (L) by chromosome banding and physical mapping of 18S-5.8S-26S and 5S rRNA gene sites. Genetics and Molecular Biology 30: 65-72, 2007

Nambiar PKV, Pillay VS, Sasikumaram S and Chandy KC (1978) Pepper Research at Panniyur-A Resume Journal of Plantation Crops 1: 4-11p.

NAMBIAR, P.K.V.; PILLAY, V.S.; SASIKUMARAN, S.; CHANDY, K.C. Pepper research at panniyur: a resume. **Journal of Plantation Crops**, v.6, n.1, p.4-11, 1978.

NG, S.Y.C.; NG, N.O. Reduced-growth storage of germoplasm. In: DODS, J.H. (Ed.). ***In vitro* methods for conservation of plant genetic resources**. New York: Chapman and Hall, 1991. p.11-40.

NITZSCH, W. Germoplasm preservation. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.782-805.

NUNES, J.D. **CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE PIMENTALONGA (*Piper spp.*)**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal de Lavras 2004.

OKAJIMA, H. Colheita, produção, beneficiamento e mercado externo da pimenta-do-reino. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DO-REINO E CUPUAÇU, 1., Belém, 1996. Anais. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental / JICA, 1997. p.237-243. (Documentos, 89)

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**, v.12, p.42-44, 1992

POLTRONIERI, M.C.; LEMOS, O.F. de; ALBUQUERQUE, F.C. Pimenta-do-reino. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Programa de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia oriental. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. p.127-137. (Documentos, 16)

POLTRONIERI, M.C; ALBUQUERQUE, F.C.; OLIVEIRA, M.R.C. Retrospectivas, avanços e perspectivas no melhoramento genético de pimenta-do-reino visando resistência à fusariose. **Fitopatologia Brasileira**, 25 Suplemento: p. 246-248, 2000.

Powell W, Marcnray GC and Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*. 7: 215-222p.

REEVES, A. and TEAR, J. 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/MicroMeasure>.

ROCA, W.M. Cassava. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). Handbook of plant cell culture. New York: Macmillan, 1984. v.2, p.269-301.

Rozen S and Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the www for general users and for biologist programmer: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Santos MO, Kariam CT, Resende RMS, Chiari L, Jungmann, Zucchi, Souza AP. (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. 9: 192-194p.

Souza AP (2001) Biologia Molecular Aplicada ao Melhoramento. In Nass LL, Valois ACC de, Melo IS, Valadares-Ingles MS (eds). Recursos Genéticos & Melhoramento – Plantas, 549-602p Fundação MT.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germoplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K.K. (Ed.). Cryopreservation of plant cells and organs. Boca Raton: CRC Press, 1985. p.199-226.

VIEIRA, M.L.C.; APEZATO-DA-GLÓRIA, B. **Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento.** In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento:** plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. cap.28, p.911-938.

WENZEL, G. Strategies in unconventional breeding for disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.23, p.149-172, 1985.