



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

EFEITO DE FITORREGULADORES NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS MADUROS DE PIMENTA-DO-REINO

Dayane Nascimento Pena¹, Simone de Miranda Rodrigues², Oriel Filgueira de Lemos³,
Marli Costa Poltronieri³

¹Acadêmica do Curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental; Email: daypena@hotmail.com

²Orientadora/Pesquisadora Dra da Embrapa Amazônia Oriental

³Pesquisador es da Embrapa Amazônia Oriental

Resumo: O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de pimenta-do-reino no mundo, sendo o Pará o maior produtor nacional. A doença fusariose resultou em perdas significativas à pipericultura nacional, levando a realização de muitos estudos na tentativa de minimizar o problema. A cultura de tecidos tem sido considerada promissora, visto possibilitar a propagação de plantas saudáveis para serem inseridas em programas de melhoramento genético. Entretanto, existe a dificuldade de obtenção de plântulas dessa piperácea durante todo o ano, devidas o tempo necessário para floração, frutificação e amadurecimento dos frutos. Portanto, esse trabalho teve objetivo avaliar o efeito de fitorreguladores no cultivo *in vitro* de embriões maduros de duas cultivares de pimenta-do-reino, Bragantina e Guajarina. Após 82 dias de cultivo dos embriões em meio de cultura contendo BAP, AIA ou TDZ obteve-se plântulas de pimenta enraizadas. Os melhores resultados foram obtidos com os explantes cultivados em meio contendo BAP, enquanto que o cultivo em meio contendo TDZ resultou em plantas mal formadas. Os maiores índices de oxidação foram observados para os explantes de Bragantina.

Palavra-chave: cultura de tecidos, organogênese e *Piper nigrum*

Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), originária da Índia, vem sendo cultivada no Brasil por cerca de 6000 anos. Foi introduzida no Brasil pelos portugueses durante o período colonial, desde o século XVII. Supõe-se que as primeiras cultivares introduzidas tenha sido clones das cultivares Balonkotta e Kaluvally, cultivadas em pequena escala para consumo doméstico. A cultura tornou-se mais atraente, do ponto de vista comercial, a partir da introdução da cultivar Kuching pelos imigrantes japoneses em 1933, recebendo o nome de Cingapura (Duarte e Albuquerque, 1999).

A fusariose constitui-se na mais importante das doenças, pois influência de forma significativa a longevidade das plantas, reduzindo o ciclo produtivo e afetando diretamente a produção (Poltronieri et



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

al.,1999). Nesse sentido, a cultura de tecidos tem sido amplamente empregada por resultar na obtenção de plantas saudáveis, entretanto existe a limitação de trabalho devido ao período de fornecimento de material vegetal da pimenteira para ser introduzido *in vitro*. Portanto, esse trabalho tem por objetivo avaliar o desenvolvimento de embriões zigóticos, obtidos a partir das sementes maduras, em meios suplementados com diferentes tipos de fitorreguladores, visando à obtenção de plântulas de pimenta-do-reino *in vitro*.

Material e Métodos

Para realizar esse estudo, embriões zigóticos foram isolados de sementes maduras de duas cultivares de pimenta-do-reino, Bragantina e Guajarina, obtidas do BAG da Embrapa CPATU. Primeiramente os frutos foram desinfetados com água corrente, detergente e hipoclorito de sódio, e em seguida foram despolidos com as mãos. Com o objetivo de intensificar o processo de desinfestação das sementes, foram incubadas com hipoclorito sódio a 0,5% (v/v) a 37°C por 14h. Depois se procedeu com a assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar, adicionando-se etanol 70% (v/v), por 1min, seguido de hipoclorito sódio comercial a 1,25% (v/v), contendo tween 20 a 0,1% (v/v), durante 15 min. Em seguida, a etapa de assepsia foi concluída com 5 lavagens das sementes em água destilada autoclavada por 20 seg.

Para a montagem dos experimentos foram testados três fitorreguladores: BAP (6 benzilaminopurina), TDZ (thidiazuron) ou AIA (ácido 3-indol acético) a 1mg.l^{-1} em cada tratamento. Esses fitorreguladores foram adicionados ao meio MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo sacarose a 3%, solidificado com 0,8% (p/v) de ágar em pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem.

Os embriões zigóticos, foram isolados da região micropilar das sementes, com o auxílio do bisturi, e inoculados em frascos de 250 ml contendo 30 ml do meio de cultivo suplementado com um dos fitorreguladores. Esses explantes foram cultivados em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16h e irradiância de $50 \mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O comportamento dos embriões foi monitorado durante 82 dias, sendo avaliada quanto à oxidação, germinação dos embriões, formação de folhas e enraizamento das plântulas.

Os resultados foram avaliados por meio de um DIC, com quatro repetições. A análise de variância foi feita utilizando o programa ESTAT, seguida de teste de Turkey ao nível de 5% de probabilidade.



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

Resultados e Discussão

Após a inoculação dos embriões zigóticos nos frascos, os primeiros resultados foram obtidos com 22 dias de cultivos. Após 82 dias de cultivo, os embriões colocados para germinar nos meios de cultura com adição de BAP, resultaram na indução de calos na região do tecido do endosperma, seguido da germinação de 50% dos embriões.

Os explantes germinados em meio contendo AIA resultaram na indução de calos nos tecidos do endosperma, seguido do surgimento das raízes e germinação de 18,75% dos embriões; enquanto os embriões introduzidos nos meios contendo TDZ resultaram na indução de calos, seguido da germinação de 48,75% dos embriões zigóticos. Entretanto, para o regulador TDZ foram observadas a germinação dos embriões e a formação de plântulas mal formadas. Os resultados de germinação foram feitos através da média do somatório dos embriões das duas cultivares em estudos.

Os resultados estatísticos mostraram que não houve diferença significativa nas médias do surgimento de folhas entre os dois tratamentos TDZ e BAP, sendo estes tratamentos considerados superiores em relação ao cultivo dos embriões zigóticos em meio suplementado com AIA (Tabela 1).

Tabela 1 Avaliação do surgimento de folhas em plântulas obtidas a partir dos embriões de pimenta-do-reino cultivados em meio contendo diferentes fitorreguladores após 82 dias de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de significância.

Tratamentos	Médias do N°. de folhas
TDZ	5,08 a
BAP	4,43 a
AIA	0,91 b

Devido à má-formação nas folhas das plântulas em meio contendo o fitorregulador TDZ, esse tratamento mostrou-se ineficaz para a obtenção de plântulas, sendo o fitorregulador BAP considerado a melhor condição para a obtenção de plântulas para as duas cultivares em estudo. Observou-se o enraizamento das plântulas após a formação de folhas, com 13% para cultivar Bragantina e 10% para a cultivar Guajarina, em meio contendo BAP, assim como 5% para a cultivar Bragantina e 25% para a cultivar Guajarina nos meios contendo AIA; enquanto as plântulas cultivadas em TDZ resultou em 0% e 18% de enraizamento para as cultivares Bragantina e Guajarina, respectivamente.

A análise estatística da média de formação de folhas entre as cultivares não mostrou diferença significativa para as duas cultivares, entretanto, a cultivar Bragantina apresentou maiores índices de oxidação nos tecidos que a cultivar Guajarina (Tabela 2).



14º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
10 e 11 de agosto de 2010
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

Tabela 2 Avaliação das cultivares de pimenta-do-reino quanto a médias de oxidação dos embriões e o surgimento de folhas após 82 dias de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de significância.

Cultivares	Oxidação	Médias do N°. de folhas
Bragantina	3,31 a	3,02 a
Guajarina	0,47 b	3,93 a

Com relação à oxidação dos embriões zigóticos durante o período de cultivo, não houve diferença significativa entre as médias de oxidação dos mesmos entre as cultivares avaliada. Entretanto, o regulador que resultou em maior média numérica de oxidação foi a AIA quando comparado aos demais fitorreguladores (Tabela 3).

Tabela 3 Avaliação da oxidação dos embriões de pimenta-do-reino em meio contendo diferentes fitorreguladores após 82 dias de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de significância.

Tratamentos	Médias
TDZ	1,39 a
BAP	2,03 a
AIA	2,18 a

Conclusão

O trabalho mostrou a possibilidade de obtenção de plântulas enraizadas a partir de embriões zigóticos isolados de sementes maduras. Dentre os três fitorreguladores utilizados nesse estudo o BAP foi o que apresentou os melhores resultados para obtenção de plântulas para as cultivares Bragantina e Guajarina. A cultivar Guajarina apresentou os melhores resultados para o surgimento de folhas e enraizamento de plântulas quando cultivada em meio contendo AIA, em relação à Bragantina.

Referências Bibliográficas

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.

MURASHIGE, T.SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p 473-497, 1962.