

SISTEMA DUPLA FASE NO CULTIVO *IN VITRO* DE PIMENTA LONGA

Alana Fernandes¹; Paulo Junior²; Andréa Raposo³; Renata Beltrão⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/UFAC, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, email: alanacfernandes@yahoo.com.br.

²Professor orientador da Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza.

³Pesquisador da Embrapa Acre, e co-orientadora, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular, Rio Branco, Acre, Brasil

⁴Analista da Embrapa Acre, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular, Rio Branco, Acre, Brasil

Resumo

A pimenta longa (*Piper hispidinervum*) é rica em safrol, óleo essencial importante economicamente, como fixador de fragrâncias, inseticidas naturais. O cultivo *in vitro* fornece plantas de forma massal e o uso do sistema dupla fase pode aumentar a produtividade, bem como, reduzir custos de produção de mudas. Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência do cultivo dupla fase nesta espécie. Foram coletadas sementes de plantas adultas localizadas no BAG da Embrapa Acre, estas foram submetidas à desinfestação e posteriormente foram inoculadas em frascos, contendo meio de cultura WPM e mantidas em sala de crescimento. Após 60 dias foram retirados segmentos nodais dessas plântulas e inoculados em formulação salina WPM 50% em meio sólido contendo 6 g.L⁻¹ de Agar, 30 g.L⁻¹ de sacarose e suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); após 30 dias foram adicionados 10 mL de meio líquido WPM 50% isento de reguladores. O sistema semi-sólido (convencional) foi organizado com as mesmas concentrações, porém não recebeu acréscimo de meio líquido. Após 60 dias, os maiores percentuais de crescimento foram observados no sistema semi-sólido, com 0,62 cm de parte aérea no tratamento com 0,0 mg.L⁻¹ de BAP, o número de nós por broto também foi superior com 1,54 nós por broto. Pelos resultados apresentados verificamos que o sistema dupla fase não foi superior ao convencional. O uso de regulador de crescimento induziu a formação de calos e gerou baixo desenvolvimento em todas as características analisadas.

Palavras-chave: Sistema semi-sólido; *in vitro* regeneração; regulador de crescimento

Abstract

Long pepper (*Piper hispidinervum*) is rich in the essential oil, safrole, which is economically-important as fixer of fragrances and natural insecticides. *In vitro* culture can mass-produce plants and the use of a 'double-phase' system can increase the productivity, as well as reduce costs of seedling production. The aim of this work is to test the efficiency the 'double-phase' culture system in this species. Seeds of adult plants located in the BAG of Embrapa Acre were collected, disinfected, and inoculated in an assay tube with a WPM medium, and kept in a grow room. After 60 days the nodal segments of these plantlets were removed and inoculated in a semisolid WPM medium with a 50% saline formularization with 6 g.L⁻¹ of Agar, 30 g.L⁻¹ of sucrose and supplemented with 0.0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg. L⁻¹ of 6-benzilaminopurina (BAP). After 30 days, 10 mL of liquid WPM medium, 50% free of regulators, was added. The semisolid system (conventional) was organized with the same concentrations, but did not receive the additional liquid medium. After 60 days, the highest growth percentiles were observed in the semisolid system, with 0.62 cm of the aerial part in a treatment with 0.0 mg. L⁻¹ of BAP, the number of nodes per shoot was also superior with 1.54 nodes per shoot. Through these results, we verified that 'double-phase' system was not superior to the conventional system. The use of growth regulator induced the formation of callus and generated low development in all analyzed characteristics.

Keywords: semisolid system; *in vitro* regeneration; growth regulator

Introdução

A Floresta Amazônica é considerada a última grande área de floresta tropical úmida relativamente intacta do mundo, quando comparada com o grau de degradação e fragmentação das florestas tropicais

úmidas asiáticas e africanas (WHITMORE, 1997). Entretanto, o tipo de ocupação que atualmente se desenvolve na Amazônia não indica um futuro promissor em termos de conservação da biodiversidade.

A crescente demanda por produtos naturais, assim como sua importância no contexto econômico, tem despertado grande interesse de pesquisadores e produtores, dentre as quais se destacam as plantas medicinais e as aromáticas. A utilização de óleos essenciais de plantas tropicais como matéria-prima para a indústria abre perspectivas de crescimento, tanto no mercado nacional quanto no internacional, possibilitando, assim, o aproveitamento destes produtos em prol do desenvolvimento da região (SILVA, 2000). A pimenta longa (*Piper hispidinervum*), dentre esses produtos, tem uma grande importância estratégica e econômica, devido à presença do óleo essencial rico em safrol. Esta pode ser explorada de forma não-destrutiva, haja vista que o óleo concentra-se nas folhas. Esta espécie pode ser uma alternativa para o aproveitamento de áreas desmatadas ou antropizadas, devido sua rusticidade e facilidade do manejo cultural. Possui alta capacidade de rebrota após os cortes, fazendo do seu cultivo uma atividade perene e ecologicamente correta, tendo a vantagem em relação às outras culturas de dispensar a necessidade de novos plantios a cada ano (FIGUEIRÉDO et al., 2004a; BERGO et al., 2005).

A pimenta longa é uma espécie nativa da Amazônia Ocidental brasileira encontrada somente no Vale do rio Acre (LOPES et al., 2001). Esta espécie apresenta altos teores de safrol contido no óleo essencial, (cerca de 85 a 97%), com rendimento de óleo na biomassa seca de 3 a 4%, em média. No Estado do Acre, esta espécie surgiu como alternativa promissora para as comunidades tradicionais, no que se refere à melhoria de renda, qualidade de vida e conservação do ambiente, através da diminuição da pressão sobre as áreas de floresta.

Diversos estudos coordenados pela Embrapa Acre foram realizados na década de 90 com a pimenta longa, por ser uma espécie nativa não domesticada. Entre os resultados obtidos, está a definição de um sistema de produção para esta cultura, o qual vem sendo empregado com algumas adaptações até os dias atuais, porém por um número muito reduzido de produtores que a cultivam.

A área atual com o cultivo da pimenta longa no Estado do Acre está em torno de 20 hectares, distribuídos nos municípios de Rio Branco, Senador Guiomard e Brasiléia. Mas a crescente demanda e procura por informações, sementes de qualidade, assistência técnica e outras questões relacionadas com o cultivo da pimenta longa, junto a Embrapa Acre nos dias atuais, demonstram que essa cultura pode alcançar lugar de destaque no cenário agrícola do Estado. Entretanto, como é uma planta em fase de domesticação, torna-se necessário o aperfeiçoamento do sistema de produção desta cultura.

Dentro do contexto do sistema de produção da pimenta longa, o corte da biomassa, a produção de mudas por propagação vegetativa e o consórcio com outras culturas não estão bem definidos. A propagação por sementes, devido à polinização cruzada e a falta de variedades melhoradas desta espécie, causa uma grande segregação entre as plantas, ocasionando a formação de plantios heterogêneos, com plantas excelentes, entremeadas por aquelas de baixa produtividade e improdutivas. A propagação vegetativa apresenta vantagens na manutenção de material com boas características agrônômicas, favorecendo a multiplicação de plantas produtivas e tolerantes a pragas e a doenças, podendo haver uma constância também de produção de óleo no caso da pimenta longa.

As técnicas da propagação *in vitro*, ou micropropagação, permitem a produção massal de indivíduos com características genéticas desejáveis, com alto padrão de sanidade das mudas (GEORGE, 1993). Segundo Merkle & Nairn (2005), a biotecnologia florestal empregada para espécies tropicais poderá aumentar a disponibilidade de biomassa nas áreas manejadas, reduzindo a pressão de degradação nas florestas nativas.

O sistema de multiplicação dupla-fase ainda é pouco utilizado, mas já apresentou aumento na eficiência da multiplicação de pereira japonesa 'Hosui', promovendo maior número de brotações por explante e maior massa fresca das brotações que o cultivo em meio semi-sólido (KADOTA *et al.*, 2001). Em estudos com porta-enxerto de pereira, Moraes et al. (2004) obtiveram elevadas taxas de multiplicação de brotos (16,8 brotos/explantes) em sistema dupla-fase com meio MS suplementado com BAP (6,7µM) e AIB (0,5µM). De modo semelhante, Machado et al. (2004) estudando a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira obtiveram melhores resultados em meio dupla-fase do que em meio semi-sólido.

Os estudos sobre micropropagação de pimenta longa ainda são incipientes, e o uso de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* pode aumentar a produtividade, bem como, reduzir custos de produção de

mudas. Este trabalho teve como objetivo principal testar o sistema dupla-fase na propagação *in vitro* de *Piper hispidinervum* C. DC.

Material e Métodos

Foram utilizadas para esse experimento sementes de plantas adultas de *Piper hispidinervum* C.DC. localizadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre, Rio Branco, Acre. Estas foram armazenadas em refrigerador em frascos vedados após a coleta. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre.

Para assepsia das sementes, estas foram lavadas com detergente e água corrente. Posteriormente, foram submersas por um minuto em álcool 70% e desinfestadas em câmara de fluxo laminar com hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos. Após a desinfestação realizou-se a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Em seguida, as mesmas foram inoculadas em frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura Wood Plant Medium – WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981), submetidas à concentração salinas de 50%.

As sementes desinfestadas foram para a germinação e crescimento inicial *in vitro*. Os experimentos de multiplicação de brotos em sistema dupla-fase (líquido - geleificado) foram realizados com segmentos nodais oriundos destas de plântulas germinadas.

Para o sistema dupla-fase, os segmentos nodais foram cultivados por 30 dias em meio de cultura sólido com formulação salina de WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981), com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de Agar, suplementado com 0; 0,5; 1,0; e 2,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). Após 30 dias em cultivo sólido, os mesmos tratamentos receberam adição de 10 mL de meio de cultura líquido WPM isento de regulador de crescimento. O sistema semi-sólido (convencional) foi organizado com o uso de meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1981) em meio sólido, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de Agar, suplementado com 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, sendo que este não recebeu acréscimo de meio de cultura líquido.

Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições, sendo cada repetição composta por um frasco contendo cinco explantes. As avaliações foram realizadas aos 60 dias, consistindo nos seguintes dados: número de brotos regenerados (NB), número de nós por broto (NN) e comprimento da parte aérea (CPA).

O meio de cultura WPM utilizado nos experimentos foi preparado no laboratório e suplementado com ágar (6 g.L⁻¹) e sacarose (30 g.L⁻¹), com uso de reguladores de crescimento em diferentes concentrações. Os reguladores de crescimento foram dissolvidos em NaOH 0,1M e solubilizados em água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, pela adição de NaOH 0,1M ou HCl 0,1M.

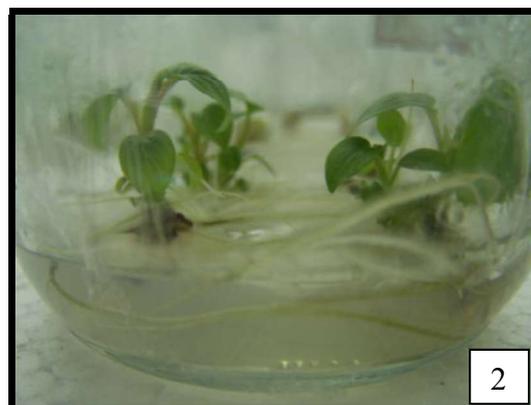
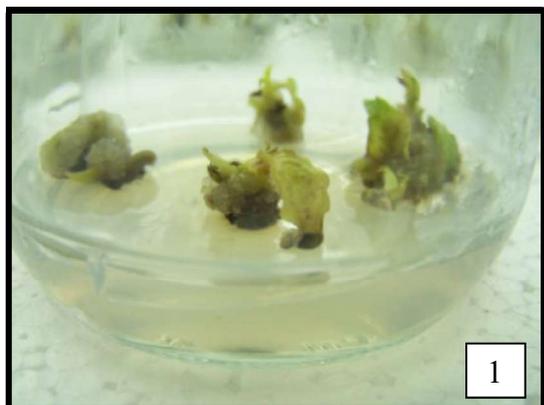
Após serem preparados, os meios de cultura foram distribuídos em frascos de 250 mL, fechados com tampa de polipropileno e autoclavados por 15 minutos a 1,1Kg/cm², em temperatura de 120 °C.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 25±2° C, dispendo de lâmpadas fluorescentes Philips TDL (38µmol.m⁻².s⁻¹) expostas ao fotoperíodo de 16h de luz.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, em esquemas fatoriais e avaliados utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA), com a separação de médias pelo teste SNK com p<0,05 (SOKAL e ROHLF, 1995) utilizando-se o programa computacional SISVAR.

Resultados e Discussão

Os experimentos de multiplicação de brotos em sistema dupla-fase (líquido-geleificado) foram realizados com segmentos nodais de plântulas germinadas *in vitro*. A multiplicação de brotos ocorreu em ambos os tratamentos avaliados (dupla-fase e semi-sólido). Os resultados para o estabelecimento *in vitro* são apresentados na Tabela 01. Verificou-se que para todos os parâmetros fitotécnicos avaliados os melhores valores foram observados na ausência de BAP. Além disso, o uso do regulador ocasionou a formação de deformação nos explantes (Figuras 1) quando comparado ao tratamento com 0,0 mg.L⁻¹ de BAP (Figura 2).



Figuras 1 e 2: Cultivo *in vitro* de *Piper hispidinervum* C.DC. 1. Segmentos nodais cultivados em sistema semi-sólido com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, note a formação de plântulas anormais com a presença de calos e folhas reduzidas. 2. Segmentos nodais cultivados em sistema semi-sólido com 0,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Moraes et al. (2004) em seu estudo com porta-enxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) em sistema de cultivo dupla-fase afirmam que não ocorre proliferação das gemas axilares desta espécie em meio de cultura isento de reguladores de crescimento (BAP, AIB e AG³), indicando portanto, a necessidade destes reguladores para a multiplicação *in vitro* nesta espécie. Estes autores verificaram ainda que os tratamentos acrescidos somente de BAP foram inferiores à combinação de BAP e AIB, em relação ao número de brotos.

Lima (2009), em sua dissertação de mestrado, verificou que a suplementação do meio de cultura dupla-fase com BAP foi necessária para a indução de múltiplas brotações *in vitro* das variedades de abacaxizeiro testadas.

Segundo Pereira e Fortes (2003), Giatti e Lima (2007) e Mendes et al. (1996), diferentes efeitos de reguladores de crescimento podem ocorrer para diferentes espécies, inclusive variações entre as cultivares dentro de uma mesma espécie. Assim, o cultivo dupla-fase em pimenta longa deve ainda ser estudado com diferentes reguladores de crescimento, incluindo sua combinação, em diferentes concentrações.

Observando a concentração que melhor apresentou desenvolvimento dos explantes (BAP 0,0 mg.L⁻¹) verifica-se que o número de brotos regenerados e o comprimento da parte aérea não apresentou diferenças estatísticas entre os sistemas de cultivo testados. O parâmetro número de nós por broto, nesta mesma concentração apresentou diferença estatística, sendo que o melhor cultivo foi o semi-sólido (convencional), o que não corrobora com os estudos realizados por Moraes et al. (2004) e Lima (2009), que verificaram que a utilização da metodologia dupla-fase (líquido-geleificado) aumentou significativamente o número de brotos e o comprimento das brotações.

Tabela 1. Multiplicação *in vitro* de brotos de *Piper hispidinervum* C.DC. em sistema de meio semi-sólido (convencional) e dupla-fase.

CR	Número de Brotos		Número de nós/broto		Comprimento da parte aérea	
	SS	DF	SS	DF	SS	DF
0	1,71 aA	1,75aA	1,54 aA	0,83 aB	0,62 aA	0,42 aA
0,5	0,70 dA	0,71 bA	0 dA	0 bA	0,14 dB	0,22 bA
1,0	0,90 bA	0,38 dB	0,04 cA	0 bB	0,21 bA	0,13dB
2,0	0,83 cA	0,67 cA	0,17 bA	0 bB	0,16 cA	0,21cA
Média	1,04	0,88	0,44	0,21	0,28	0,25

CR= Concentrações de BAP (mg.L⁻¹); SS= sistema semi-sólido; DF= sistema dupla-fase.

Nota: Letras minúsculas diferentes comparadas na vertical e letras maiúsculas comparadas na horizontal para cada parâmetro fitotécnico indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de SNK ao nível de 5% de significância.

Comparando-se os dois sistemas de cultivo *in vitro*, observou-se que o sistema dupla-fase apresentou eficiência semelhante ao sistema semi-sólido para a multiplicação *in vitro* de *Piper hispidinervum*. Segundo De la Viña et al. (2001), assim como em meio líquido, o sistema dupla-fase

disponibiliza maior quantidade de nutrientes prontamente utilizável pelos explantes em cultivo, pois nestes sistemas não existe barreira física no meio, o que facilita o contato dos explantes com os nutrientes. Portanto, nos meios de consistência líquida a taxa de multiplicação tende a aumentar em comparação aos sistemas que utilizam meios de consistência semi-sólida pela maior facilidade com que nutrientes e reguladores são absorvidos pelas plantas (PEREIRA e FORTES, 2003), o que não pode ser observado neste trabalho.

De acordo com Kozomara et al. (2008) a utilização do sistema dupla-fase de cultivo *in vitro* consiste numa das estratégias para o aumento das taxas de multiplicação de brotos para espécies lenhosas. Alguns trabalhos destacam o aumento da multiplicação de brotos em sistema dupla-fase para espécies lenhosas arbustivas.

Nesse sentido, as investigações realizadas por Kadota et al. (2001) em *Pyrus pyrifolia* com o sistema dupla-fase demonstraram ainda aumento na fitomassa em relação ao sistema convencional. O uso do sistema dupla-fase também se mostrou mais eficiente na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus prunifolia*), com aumento no número de brotações, no comprimento delas e na massa fresca (MACHADO et al., 2004). Resultados positivos no aumento da taxa de multiplicação *in vitro* de brotações em sistema dupla-fase também foram relatados por Kozomara et al. (2008) estudando *Chimonanthus praecox* L., espécie lenhosa arbustiva. Ao contrário do que se esperava, o referido sistema não demonstrou superioridade no cultivo *in vitro* de *P. hispidinervum*.

Conclusões

1. A desinfestação com álcool 70% e hipoclorito de sódio (2,5%) seguida de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada foi suficiente para manter a sanidade dos explantes;
2. O uso do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) não apresentou superioridade, causando deformação nos explantes;
3. O sistema de cultivo dupla-fase não foi superior ao sistema convencional para a multiplicação *in vitro* de brotos de *P. hispidinervum*.

Agradecimentos

Aos bolsistas do LABMOL da Embrapa Acre pelo apoio e amizade. Aos financiadores do projeto CNPq e EMBRAPA ACRE pela oportunidade. Aos meus familiares pelo amor e estímulo. E a Deus pela oportunidade.

Referências bibliográficas

DE LA VINÃ, G.; BARCELÓ-MUNOEZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, L. C. E BARBOSA, L. K. F. Teca (*Tectona grandis* L.f.): **Principais Perguntas do Futuro Empreendedor Florestal**. Rio Branco: Embrapa Acre, p.10-19. 2005.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. v.1, 555p. 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. [e.d.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, v.1, p.99-169. 1998.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, 89: 207-215, 2001.

KOZOMARA, B.; VINTERHALTER, B. RADOJEVIĆ, LJ.; VINTERHALTER, D. *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* L., a winter flowering ornamental shrub. **In vitro cellular Development Biology-Plant**, 44: 142-147. 2008.

LIMA, E.C.A. **Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros em Sistema dupla-fase e conservação de germoplasma sob regime de crescimento mínimo**. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica - Produção Vegetal) – Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

LOPES, S.C.; LAMEIRA, O.A.; FORTES, G.R.L.; NOGUEIRA, R.C.; PINTO, J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de mogno (*Swietenia Macrophylla* King). **Cerne**, 7 (1): 124-128. 2001.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2.ed São Paulo: Plantarum, v.1, 352p. 1998.

LOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, 30: 421-427. 1981.

MACHADO, M.P.; CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira “Marubakaido” em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, 5 (2): 69-72. 2004.

MERKLE, S.A. & NAIRN, J. Hardwood tree biotechnology. **In vitro cell and Development Biology-Plant**, 41: 602-619. 2005.

MORAES, L.K.A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; LIMA DA SILVA, A. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Pyrus calleryana* D-6 em sistema de cultura “dupla-fase”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26 (3): 403-405. 2004.

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

PEREIRA, J.E.S; FORTES, G.R.L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Hortic. Bras.** vol.22 n°2 Brasília Apr./June 2004.

SILVA, L.M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica**, v.19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVA, Z.A.G.P.G. Mercado de produtos madeireiros do Estado do Acre. In: FUNTAC. **Manejo Florestal Sustentável na Amazônia Brasileira**. P.143-185. 2004.

WHITMORE, T.C; LAURANCE, WILLIAM F, (ED.); BIERREGAARD, R.O., JR, (ed.). **Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities**. The University of Chicago Press, USA. p.3-12. 1997.