

15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

**ESTABELECIMENTO E INDUÇÃO DE BROTOS A PARTIR DO CULTIVO
DE MERISTEMAS *IN VITRO* DE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO**

Leozina de Carvalho da Costa¹; Oriel Filgueira de Lemos²; Ariane Souza da Silva³; Simone de
Miranda Rodrigues⁴

¹Universidade Federal do Pará. leozinacosta@yahoo.com.br;

²Embrapa Amazônia Oriental. oriel@cpatu.embrapa.br;

³Universidade Federal Rural da Amazônia. ariane.agronomia@hotmail.com;

⁴Embrapa Amazônia Oriental. simone@cpatu.embrapa.br;

Resumo: A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira originária da Índia. É a mais importante especiaria comercializada mundialmente. Com o surgimento da fusariose, ocorreram perdas na produção, devido à redução do ciclo produtivo. Buscando solucionar o problema, optou-se por utilizar a cultura de tecidos como uma maneira de propagação de plantas saudáveis *in vitro*, para dar suporte ao programa de melhoramento genético da espécie. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de oxidação, contaminação e multiplicação de brotos de quatro cultivares de pimenteira-do-reino a partir, da fase de estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de meristemas visando a limpeza clonal. A cultura foi estabelecida em meio básico de cultivo MS completo, suplementado com BAP a 0,5 mg.L⁻¹, AIA a 0,2 mg.L⁻¹, sulfato de estreptomicina a 100 mg.L⁻¹ e phytigel a 0,2%, com adição do antioxidante PVP a 100 mg.L⁻¹. A multiplicação dos brotos foi realizada no mesmo meio de cultura e pH 5,8 antes da autoclavagem. As taxas de oxidação durante o desenvolvimento dos brotos *in vitro* variaram de 0% a 16,7% e as taxas de contaminação por bactéria variaram de 0% a 37,5%. A taxa média de brotos por explante para as cultivares em cada subcultivo demonstraram diferença significativa, segundo o teste usado para a comparação de médias. A cultivar Kuthiravally apresenta melhor performance para indução e multiplicação de brotos no meio utilizado.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais, Multiplicação, *Piper nigrum* L. Limpeza clonal.

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira originária da Índia e a mais importante especiaria comercializada mundialmente. Atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar entre os principais produtores desta piperácea com uma produção anual que varia de 20 a 45 mil toneladas. (Duarte *et al.*, 2005). A produção brasileira de pimenta-do-reino na safra de 2009/2010, foi cerca de 50



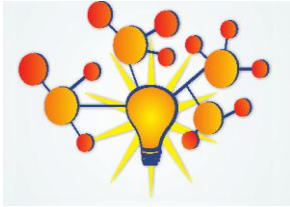
15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

mil toneladas de pimenta seca. O Pará garante cerca de 80% da produção nacional e a pimenta-do-reino é o primeiro produto agrícola na lista de exportações do estado.

No entanto, a doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* presente no solo tem sido a principal causa da redução na produção e elevação do custo da pimenta-do-reino. Não há cultivares comerciais resistentes, nem tratamento químico eficaz contra o *Fusarium*. Com isso, a micropropagação tem sido aplicada em pimenteira visando à multiplicação de materiais superiores e a obtenção de plantas mutantes (Philip *et al.* 1992; Lemos, 2003; Moura *et al.*, 2008; Nair e Gupta, 2003). Busca-se via o melhoramento genético, o desenvolvimento de novas cultivares que sejam resistentes e/ou tolerantes à doença e que possam apresentar elevada produção. Desse modo, este estudo tem por objetivo clonar plantas a partir do estabelecimento da cultura de meristema, considerando a taxa de oxidação, contaminação e multiplicação de brotos de quatro cultivares de pimenteira-do-reino visando a limpeza clonal.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. A partir de meristemas estabelecidos pelo processo de limpeza clonal provenientes de segmentos apicais e nodais das cultivares de pimenteira-do-reino Bragantina, Kottanadan, Kuthiravally e Apra, os meristemas em desenvolvimento foram estabelecidos em meio de cultura básico MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com BAP (Benzilaminopurina) a 0,5 mg.L⁻¹, AIA (Acido Indolacético) a 0,2 mg.L⁻¹, sulfato de estreptomicina a 100 mg.L⁻¹ e phytigel a 0,2%, com adição de PVP (Polivinilpirrolidona) a 100 mg.L⁻¹. Os meristemas em cultura foram mantidos em sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 h luz.dia⁻¹, com intensidade de luz de 25 $\mu\text{mol. s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ e temperatura de 25 \pm 3° C para que pudesse ser avaliado o desenvolvimento dos explantes no período total de 8 meses, desde a inoculação até o primeiro subcultivo. O meio MS, com 100 mg.L⁻¹ de PVP usado na fase de estabelecimento dos meristemas foi mantido durante a fase de multiplicação e desenvolvimento dos brotos. Os explantes foram dispostos em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura. A multiplicação de brotos ocorreu em três subcultivos a cada 60 dias para Bragantina, Kottanadan, Kuthiravally e em dois subcultivos para a cultivar Apra, tendo em vista que esta última cultivar apresentou a fase de estabelecimento de meristema cinco meses mais tarde que as três cultivares anteriores. Dessa forma, foi cultivado um explante por tubo, em condições de fotoperíodo de 16 h luz.dia⁻¹, intensidade de 25 $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ e temperatura de 25 \pm 3° C. Avaliou-se a taxa de oxidação, contaminação por bactérias na fase de desenvolvimento e as taxas médias de brotos/explante



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

durante os subcultivos. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de média pelo teste Tuckey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Houve oxidação suave presente em alguns brotos resultantes apenas do primeiro e terceiro subcultivo durante a fase de diferenciação de novas gemas, enquanto a contaminação por bactéria ocorreu em alguns brotos apenas no primeiro e no segundo subcultivo. A oxidação ocorreu a partir do quinto dia e a contaminação a partir do sétimo dia. Para cada broto contaminado foram realizadas três transferências de meio de cultura em intervalo de três dias uma da outra, o que promoveu a limpeza do explante e o desenvolvimento do mesmo sem a presença de bactéria. Obtiveram-se resultados positivos de desenvolvimento dos brotos, exceto na cultivar Kottanadan na qual a contaminação por bactéria persistiu mesmo após as transferências de meio, o que levou a perda desses explantes resultantes do primeiro subcultivo. Durante a fase de desenvolvimento dos brotos do primeiro subcultivo, a taxa de oxidação foi de 12,5% e 16,7%, respectivamente, para Bragantina e Kottanadan e 0% tanto para Kuthiravally quanto Apra. Os resultados de contaminação por bactéria foram de 37,5%, 33,3%, 75% para Bragantina, Kottanadan e Apra, respectivamente, e de 0% para Kuthiravally. No segundo subcultivo, o resultado para oxidação foi de 0% para as quatro cultivares, enquanto que a contaminação por bactéria ocorreu apenas na cultivar Apra sendo de 27,3%. No terceiro subcultivo obteve-se resultados de oxidação de 5,9%, 5,7% para Bragantina e Kuthiravally respectivamente e 0% para Kottanadan. Não houve contaminação em nenhum dos brotos resultantes do terceiro subcultivo das cultivares (Figura 1 e 2).

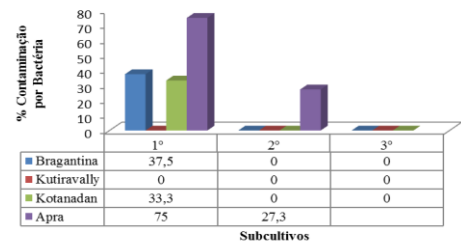
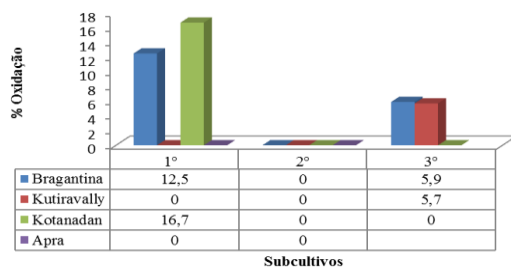


Figura 1. Percentagem de oxidação de cultivares de pimenta-do-reino em três subcultivos de desenvolvimento.

Figura 2. Percentagem de contaminação por bactéria de cultivares de pimenta-do-reino em três subcultivos de desenvolvimento.



15^o Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA
24 e 25 de agosto de 2011
Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA

A multiplicação de brotos variou de um a cinco por explante em cada subcultivo, as taxas de desenvolvimento foram avaliadas e os resultados obtidos em cada subcultivo para as cultivares Bragantina, Kottanadan, Kuthiravally e Apra, respectivamente, foram de 62,5%, 66,7%, 100% e 100%, no primeiro subcultivo, de 100% para todas as cultivares no segundo e no terceiro foi de 94,2 % para a cultivar Bragantina e de 100% para Kottanadan e Kuthiravally. A média de brotos/explante em cada subcultivo e teste de comparação de médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, revelou que houve diferença significativa na multiplicação e desenvolvimento de brotos, demonstrando melhor multiplicação de brotos, a cultivar Kuthiravally (Tabela 1).

Moura *et al.* (2008) observaram que concentrações menores de BAP ($0,5\text{mg L}^{-1}$) são mais eficientes na indução e formação de gemas para a cultivar Bragantina. Entretanto, isso parece ser variável entre os genótipos de pimenteira-do-reino, já que a mesma concentração para diferentes cultivares apresentou um melhor resultado de brotamento para a cultivar Kuthiravally.

Tabela 1. Taxa de multiplicação de brotos por subcultivo de quatro cultivares de pimenteira-do-reino em meio básico de cultura MS completo a cada 60 dias de cultivo.

CULTIVAR	MÉDIA DE BROTO / EXPLANTE		
	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
Bragantina	8a	15 b	34 b
Kutiravally	7 b	16 a	53 a
Kottanadan	6 c	4 d	16 c
Apra	4 d	11 c	0 d

*Médias seguidas da mesma letra dentro das colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Conclusões

O processo de multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de brotos de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino conforme método utilizado, promove resultados de multiplicação com diferença significativa entre as cultivares. A cultivar Kuthiravally é a que melhor responde ao método de indução e multiplicação adotado.

Referências Bibliográficas

- DUARTE, M. de L.R.; ALBUQUERQUE, F.C. ALBUQUERQUE, P.S.B. **Manual de Fitopatologia.** In: Doenças da Pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). Ed Ceres, v.2, p.507-516, 2005.
- LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *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. 191p. 2003.
- MOURA, E.F.; MENEZES, I.C. de; LEMOS, O.F. de. **Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino (*Piper nigrum*L.).** Ciência Rural, v.38, n.1, p.72-76, 2008.