

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



19º Seminário de  
Iniciação Científica e  
3º Seminário de Pós-graduação  
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2015

19 a 20 de agosto

**Embrapa Amazônia Oriental**  
Belém, PA  
2015



## CULTIVO *in vitro* DE EXPLANTES DE PIMENTEIRA-DO-REINO EM MEIO CONTENDO CANAMICINA

Nayara Camelo de Souza<sup>1</sup>, Simone de Miranda Rodrigues<sup>2</sup>, Oriel Filgueira de Lemos<sup>3</sup>, Ayane  
Fernanda Ferreira Quadros<sup>4</sup>

<sup>1,4</sup> Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Fapespa. E-mail: nay\_gondim@hotmail.com; ayanefernanda@hotmail.com

<sup>2,3</sup> Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br; oriel.lemos@embrapa.br

**Resumo:** A pimenteira-do-reino, originária do oriente, é extremamente utilizada na indústria alimentícia. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, e a produção é afetada, principalmente, pela doença fusariose, não existindo cultivares resistentes no país. Visando o estabelecimento de um protocolo de transformação genética para a espécie, esse trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento de brotos *in vitro* da cultivar Iaçará em meio MS com BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em diferentes concentrações do antibiótico canamicina. As avaliações ocorreram quanto à oxidação, o surgimento de folhas e gemas, e o comprimento dos brotos. Observou-se que o aumento na concentração do antibiótico, influenciou negativamente o desenvolvimento dos brotos.

**Palavras-chave:** antibiótico, oxidação, *Piper nigrum* L.

### Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira originária da Índia, sendo a mais importante especiaria comercializada mundialmente, sendo usada em larga escala como condimento e nas indústrias de carnes e conservas. Em termos de produção, o Brasil se destacou como um dos maiores países produtores em 1991, produzindo 50.000 t. No entanto, a produção brasileira foi decrescendo, registrando 13.000 t em 1995 (OKAJIMA, 1997). Porém, a produção diminuiu nos últimos anos, e em 2013 o rendimento médio do Brasil foi de 2.291kg/ha, onde o Pará apresentou



2.214 kg/ha (IBGE, 2013). Essa redução se deve principalmente à doença fusariose, e as cultivares comercializadas atualmente que são suscetíveis ao fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

A cultura de tecidos obteve protocolos para micropropagação da pimenteira-do-reino (LEMOS, 2003), os quais poderão ser associados a pesquisas de identificação de genes de resistência ao patógeno, e que poderão ser usados como estratégias visando reduzir os danos do patógeno no campo.

O estabelecimento de protocolos de regeneração *in vitro* utilizando antibióticos é fundamental, já que protocolos para obtenção de plantas transgênicas requerem o uso de antibióticos durante as fases de seleção e obtenção dos tecidos transformados.

Deste modo, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de explantes da pimenteira-do-reino, cultivar Iaçará, em diferentes concentrações do antibiótico canamicina, já que este antibiótico é comumente usado para seleção de bactérias e tecidos transformados em plantas.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foram utilizados tecidos vegetais da cultivar Iaçará, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da pimenteira-do-reino dessa instituição.

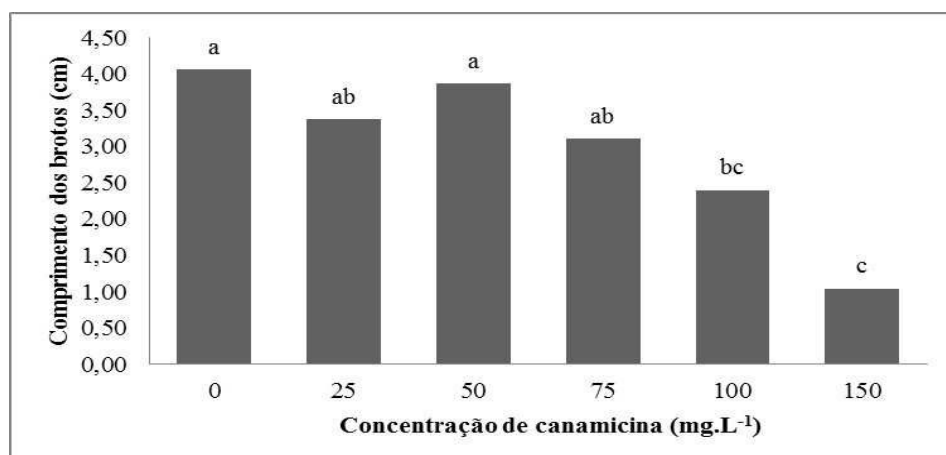
O experimento consistiu no preparo dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com BAP (6-benzilaminopurina) ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), e suplementado com diferentes concentrações de canamicina (0; 25; 50; 75; 100 e  $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Foram introduzidos 3 explantes/frascos, em um total de 4 frascos/tratamento. Os explantes da pimenta-do-reino permaneceram em sala de crescimento, em condições controladas de temperatura ( $25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), e fotoperíodo de 16 h por um período de 8 semanas. Os materiais foram avaliados quanto o nível de oxidação, número de folhas e de gemas e o comprimento (cm) dos brotos. Os resultados foram analisados considerando um Delineamento Inteiramente Casualizado, e a análise de variância foi feita utilizando o programa ASSISTAT, seguido de teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



## Resultados e Discussão

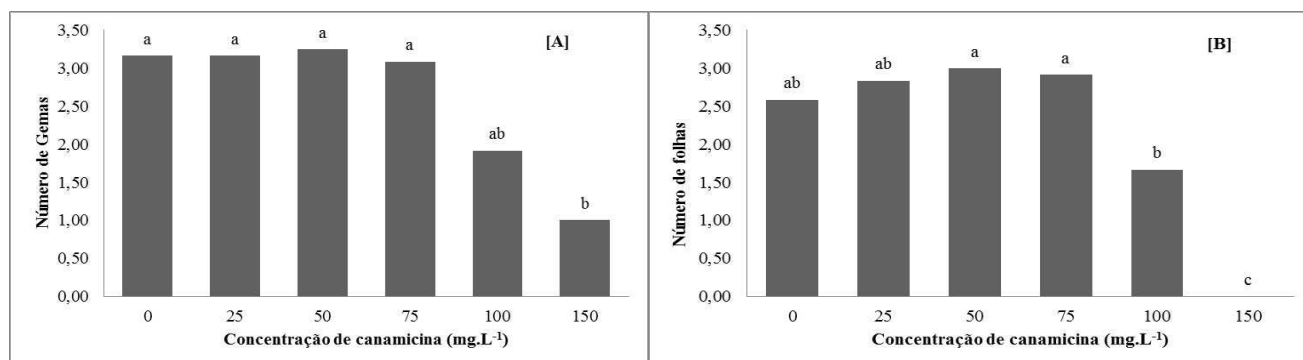
Após 13 dias de avaliação foi evidenciado o aparecimento de mais de uma folha por explante em todos os meios contendo o antibiótico. Porém, os explantes cultivados em meio sem a canamicina, o aparecimento de folhas foi mais tardio, ao 17º dia após a inoculação.

O aumento da concentração do antibiótico provocou a diminuição do desenvolvimento dos brotos. Observou-se que as concentrações de 0 mg.L<sup>-1</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram as maiores médias de crescimento de brotos, variando de 4,06 cm e 3,87 cm, respectivamente. Enquanto que as concentrações em que os brotos foram mais afetados foram 100 mg.L<sup>-1</sup> e 150 mg.L<sup>-1</sup>, apresentando as menores médias, variando de 2,40 cm e 1,04 cm, respectivamente (Figura 1)



**Figura 1:** Influência da canamicina no desenvolvimento dos brotos de pimenta-do-reino. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de significância.

Com relação ao número médio de gemas, as concentrações de 0 mg.L<sup>-1</sup>, 25 mg.L<sup>-1</sup>, 50 mg.L<sup>-1</sup> e 75 mg.L<sup>-1</sup> não apresentaram diferença significativa (Figura 2A). Nas concentrações de 100 mg.L<sup>-1</sup> e 150 mg.L<sup>-1</sup>, verificou-se média de 2,5 e 1 gema/explante, respectivamente, demonstrando que o aumento da concentração do antibiótico inibiu o desenvolvimento de brotos.



**Figura 2:** Influência da canamicina no desenvolvimento de gema e folha de pimenta-do-reino. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Turkey a 5% de significância.

O antibiótico canamicina não impediu o desenvolvimento das folhas, exceto na concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup>, onde ocorreu a oxidação dos explantes, impedindo seu desenvolvimento (Figura 2B, Tabela 2).

**Tabela 2** - Oxidação dos tecidos de pimenta-do-reino cultivados em meio com 150 mg.L<sup>-1</sup> de canamicina

Dias após introdução no meio de cultura	Oxidação (%)
1°	0
13°	8,33
27°	50
43°	75

Segundo Maju e Soniya (2012), foi estabelecido um protocolo de transformação genética para *P. nigrum* cultivada na Índia usando meio MS com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina. De modo semelhante, Sinoj et al. (2014) desenvolveram um protocolo de transformação genética para a pimenta-do-reino usando meio WPM com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina. Esses resultados diferiram do presente trabalho, sugerindo que diferentes meios de cultura e diferentes cultivares de pimenta-do-reino necessitam de concentrações específicas desse antibiótico para seleção de plantas transformadas dessa espécie.



## Conclusões

O aumento na concentração de canamicina no meio afeta o desenvolvimento de brotos de pimenta-do-reino. A concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup> desse antibiótico provoca oxidação de brotos de cultivados in vitro, prejudicando o seu desenvolvimento, podendo esta concentração ser usada em protocolos de transformação genética da espécie.

## Referências Bibliográficas

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=106&z=t&o=11&i=P>. Acesso em: 02 jun. 2015.

LE MOS, O. F. **Mutagênese e tecnologia in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (Piper nigrum L.)**. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MAJU, T. T.; SONIYA, E. V. In vitro regeneration system for multiplication and transformation in *Piper nigrum* L. **International Journal for medicinal and aromatic plants**, v. 2, n. 1, p. 178-184, 2012.

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

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

SINOJ, J.; SHEEJA, T. E.; BHAI, R. S.; SURABY, E. J.; MINOO, D.; SOJI, J.; JAYAKUMAR, V. N.; ANANDARAJ, M.; BANSAL, K. C. Somatic embryogenesis and transgenic development in black pepper for delayed infection and decreased spread of foot rot caused by *Phytophthora capsici*. **Journal of Plantation Crops**, v. 42, n. 1, p. 20-28, 2014.