



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

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE CULTURA DE MERISTEMA DE
CULTIVARES DE PIMENTA-DO-REINO**

Ariane Souza da Silva¹, Oriel Filgueira de Lemos², Leozina de Carvalho da Costa³,
Simone de Miranda Rodrigues⁴

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia. ariane.agronomia@hotmail.com

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

³ Universidade Federal do Pará. leozinacosta@yahoo.com.br

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

Resumo: A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta de grande valor econômico no mundo das especiarias, sendo o Brasil um dos principais países produtores e exportadores. Com o surgimento da fusariose, houve grandes perdas na piteicultura, mais precisamente no estado do Pará, que se disseminou rapidamente devido a forma de propagação vegetativa e a dificuldades de matrizes livres de doenças. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o estabelecimento de cultura de meristemas de diversas cultivares de pimenteira-do-reino para limpeza clonal. Explantes do tipo ápice caulinar foram submetidos à desinfestação com fungicida (Derosal 0,1%), cloreto de mercúrio (0,1%), posteriormente com antibiótico sulfato de estreptomicina e antioxidante mercaptoetanol (5mM). Os meristemas (<1,0mm) das cultivares Apra, Bragantina e Kottanadan foram excisados e transferidos para o meio de cultura 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, Phytigel a 0,2% e PVP a 100 mg.L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 previamente a autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. O experimento foi avaliado quanto às taxas de oxidação, contaminação e o estabelecimento em cultura. O índice de oxidação variou de 12,9% a 18,18% entre as cultivares. A Bragantina foi a cultivar que apresentou menor taxa de oxidação. A taxa de contaminação por bactéria variou de 9,09% a 90%, sendo a menor taxa de contaminação observada em explantes da cultivar Kottanadan. O percentual de estabelecimento variou de 63,64% a 67,74%. A cultivar que apresentou melhor resposta com maior taxa de estabelecimento foi a cultivar Apra.

Palavras-chave: Contaminação, limpeza clonal, oxidação, *Piper nigrum* L.

Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira perene, pertencente à família Piperácea e tem sua origem no Sudeste Asiático, principalmente na Índia. Desde a década de 1930,



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

quando foi introduzida no Brasil, por imigrantes japoneses, tem sido o suporte econômico de pequenos e grandes produtores do estado do Pará. A pimenta-do-reino é uma especiaria, mundialmente, de grande valor econômico. O Brasil é o quarto maior produtor e exportador no mercado internacional, com estimativa de produção de 33.000 t em 2008 e o Pará detêm cerca de 90% da produção nacional. Porém, doenças fúngicas e viroses como o *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) têm contribuído para a redução da produção afetando diretamente na economia do país. Dentre as doenças fúngicas, a mais preocupante é a fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani*, e estima-se que mais de 20 milhões de plantas morreram devido a essa doença. Segundo Lemos (2003), a forma de propagação vegetativa, a vulnerabilidade genética das cultivares a patógenos e a rápida disseminação devido às plantas apresentar grande homogeneidade, favoreceu a dispersão da doença. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o estabelecimento de meristema *in vitro*, considerando a taxa de oxidação e a contaminação por fungo e bactéria nos meristemas de três cultivares diferentes de pimenteira-do-reino.

Material e Métodos

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Em casa de vegetação, os ápices caulinares foram coletados a partir de mudas originadas de estacas da coleção da Embrapa Oriental, as quais foram nutridas quinzenalmente com solução nutritiva contendo a metade da concentração dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) e tratadas com fungicida Derosal a 0,2%. Após a coleta, os ramos contendo gemas apicais foram cortados em pequenas estacas e imersos em solução de ácido cítrico (50mM) a fim de evitar a oxidação e encaminhadas para o laboratório onde realizou-se lavagens das estacas em água corrente e detergente neutro sendo, em seguida, imersas em solução de Derosal (0,1%) durante 20 minutos. Na seqüência, sob câmara de fluxo laminar, as estacas foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida em solução de cloreto de mercúrio (0,1%) por 10 minutos, seguidas de cinco lavagens com água destilada autoclavada. Antes dos meristemas serem excisados para inoculação, as estacas ficaram imersas em solução de sulfato de estreptomicina (antibiótico) durante 20 minutos e por fim em solução de mercaptoetanol a 5 mM (antioxidante).

Após esse processo de assepsia, os meristemas foram excisados com bisturi sob o auxílio de estereomicroscópio. Os meristemas retirados ($\leq 1\text{mm}$) foram inoculados em meio de cultura sob papel filtro em frascos contendo 5ml de meio básico de cultura MS o qual foi suplementado com



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

BAP (benzilaminopurina) a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, AIA a $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, sulfato de estreptomicina a 100 mg.L^{-1} , PVP (polivinilpirrolidona) a 100 mg.L^{-1} , solidificado com phytigel a 0,2%, e pH ajustado para 5,8 sendo submetidos a posterior autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os meristemas foram mantidos em ambiente controlado, sala de crescimento, com intensidade de luz de $25 \text{ } \mu\text{mol. s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ e temperatura $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Avaliou-se a taxa de oxidação e contaminação por fungos e/ou bactéria e a quantidade de meristemas estabelecidos.

Resultados e discussão

Foram inoculados 31, 20 e 11 meristemas das cultivares Apra, Bragantina e Kottanadan, respectivamente. Aos cinco dias após a inoculação foi observado que os meristemas da cultivar Bragantina e Kottanadan apresentaram início de desenvolvimento (Figura 1). Para a cultivar Apra o desenvolvimento dos meristemas iniciou com sete dias após inoculação (Figura 1).

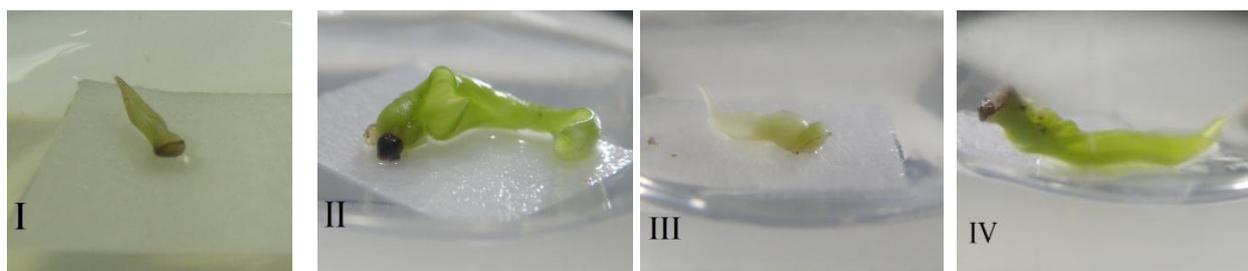


Figura 1. Cultivo de meristemas. I e II: cultivar Bragantina aos 3 e 10 dias; III: cultivar Kottanadan aos 5 dias; e IV: cultivar Apra aos 8 dias.

Durante a fase de estabelecimento um fator limitante foi o problema de contaminação por bactérias endógenas apresentado pelos meristemas provenientes de plantas adultas. Aos sete dias de inoculação, 12,9% dos meristemas da cultivar Apra oxidaram. Ao analisar a taxa de contaminação desta cultivar, 54,84% contaminaram por bactéria não sendo observada contaminação por fungo. Do total dos meristemas inoculados, 19,35% oxidaram e contaminaram (Figura 2). Quanto ao estabelecimento, o maior percentual de meristemas estabelecidos foi de 67,74% (Figura 3).

A cultivar Bragantina apresentou 90% dos meristemas contaminados por bactéria, sendo que 20% destes apresentaram também contaminação por fungo. Para taxa de oxidação não foi observado meristemas apenas oxidados, pois os meristemas que apresentaram oxidação também foram contaminados por bactéria em uma taxa de 25%. A taxa de meristemas estabelecidos e em desenvolvimento foi de 65%. Nos meristemas que apresentam contaminação por bactéria são realizadas periódicas transferências a cada dois dias para um novo meio de cultura, com a finalidade de promover a limpeza dos meristemas para que possam desenvolver sem contaminação. Apesar



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

das consecutivas transferências de meio, os meristemas ainda apresentam contaminação, porém continuam em fase de desenvolvimento.

Dos meristemas inoculados da cultivar Kottanadan, 9,09% destes contaminaram por bactéria, por outro lado não houve contaminação por fungo. Os resultados obtidos para oxidação e para taxa de oxidação e contaminação foram de 18,18%. A taxa de meristemas estabelecidos foi de 63,64% do total dos inoculados.

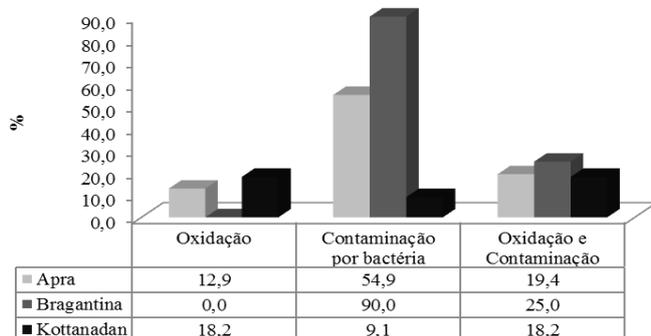


Figura 2. Percentagem de oxidação e contaminação por bactéria.

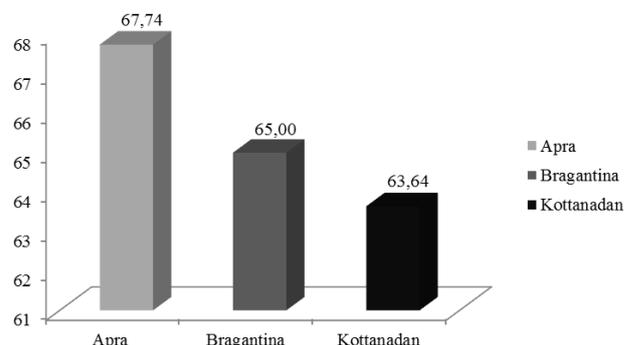


Figura 3. Meristemas estabelecidos aos 7, 5 e 5 dias após inoculação para as cultivares Apra, Bragantina e Kottanadan, respectivamente.

Conclusões

No método empregado no cultivo de meristemas das cultivares Apra, Bragantina e Kottanadan de pimenta-do-reino a oxidação é menor para a cultivar Bragantina;

Foi confirmada a taxa de contaminação por bactéria sendo menor na cultivar Kottanadan e a contaminação por fungo ocorre somente na cultivar Bragantina;

A cultivar Apra apresenta características favoráveis ao estabelecimento de meristema *in vitro*.

Referências Bibliográficas

CARVALHO, S.P.; FELIPE, M.P., **Cultura da pimenta-do-reino (*piper nigrum L.*)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2002.

LEMONS, O. F. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da Pimenta do Reino (*Piper nigrum L.*)**. Tese de (Doutorado) Piracicaba - Escola Superior de Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2003.