

CLONAGEM *IN VITRO* VIA CULTIVO DE MERISTEMA DE PIMENTEIRA-DO-REINO: ASSEPSIA E ESTABELECIMENTO DE CULTURA

Joyce Vieira da Silva PINHO Oriel Filgueira de LEMOS, Hérica Santos de
Oliveira

Resumo

A cultura da pimenteira-do-reino tem grande importância econômica no Brasil, mas há restrição de cultivo devido a vulnerabilidade genética da mesma à doença fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. piperis. A forma de propagação vegetativa é disseminadora da doença e métodos de controle da doença são pouco exitosos. Programas de melhoramento em execução visam gerar híbridos resistentes à doença em questão, além de agregar características agrônomicas competitivas. Doenças viróticas ocorrem em todas as cultivares e há necessidades de limpeza clonal dessas cultivares via cultura de tecidos. Há dificuldades de obtenção de explantes assépticos devido a problemas de bactérias e fungos endógenos. Este trabalho teve por objetivo o estabelecimento de meristema (<1,0 mm) *in vitro* para a limpeza clonal via micropropagação. A partir de plantas originadas de estacas, meristemas (apicais e laterais) foram excisados a partir segmentos nodais e apicais, previamente submetidos a diferentes tratamentos de assepsia. Os meristemas foram inoculados em meio básico de cultura MS suplementado com BAP 0,5 mg.L⁻¹ e AIA 0,2 mg.L⁻¹. As respostas dos meristemas das diferentes cultivares foram avaliadas quanto a oxidação e contaminação,

e os explantes verdes foram transferidos para meios frescos visando a diferenciação de brotos. Dos meristemas de nove cultivares utilizadas, apenas alguns das cultivares IAÇARÁ e genótipo 239 apresentaram desenvolvimento satisfatório. As demais não desenvolveram, oxidaram e/ ou sofreram contaminação por fungos e/ ou bactérias.

Palavras-chave: limpeza clonal, *Piper nigrum* L.; micropropagação .

Área do conhecimento: Ciências Agrárias; Sub Área: Agronomia; Linha de pesquisa: cultura de tecidos.

Introdução

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de pimenta-do-reino, com produção estimada de 33.000 t em 2008, o que confere grande importância econômica da cultura para o país.

A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani*, assola as plantações de pimenta-do-reino principalmente pela predisposição genética dos vegetais propagados de forma vegetativa para os plantios comerciais. Ademais, as doenças viróticas (PYMoV e CMV) estão colocando em riscos todas as cultivares, uma vez que todas são susceptíveis.

¹ Acadêmica do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Bolsista Pibic – CNPq/ Embrapa. Email: joycepinho.bio@gmail.com;

¹ Dr. Pesquisador A da Embrapa Amazônia Oriental. Tv. Enéas Pinheiro, s/n, Marco. CEP: 66095-100 - Belem, PA. Email: oriel@cpatu.embrapa.br

^{1 3} Mestranda do curso de agronomia da UFRA; hericaeng@yahoo.com.br;

Assim, o melhoramento genético vegetal, que tem como principal objetivo desenvolver novas cultivares resistentes às doenças e com características agronômicas desejáveis pelos produtores tem contemplado novas técnicas e tecnologias para o avanço na obtenção de resultados, sendo desenvolvidas e aplicadas à pimenteira-do-reino. As técnicas de cultura de tecidos têm sido aplicadas para a clonagem de plantas, desenvolvimento de protocolos para regeneração de plantas visando a transgenia, e o desenvolvimento de marcadores moleculares do tipo microssatélites para os estudos da diversidade genética e auxílio aos programas de melhoramento genético. Considerando os avanços das viroses em pimenteira-do-reino e susceptibilidades ao PYMoV e CMV, estudos de limpeza clonal estão sendo desenvolvidos em laboratório para a clonagem e limpeza de plantas das cultivares via cultura de meristemas. O objetivo deste trabalho foi definir as condições adequadas para o estabelecimento da cultura *in vitro* de meristemas a partir de gemas e ápices caulinares de plantas originadas de estacas.

Materiais e Metodos

A pesquisa visou o desenvolvimento de novas plantas a partir de meristemas apicais e laterais. O processo experimental foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Os meristemas utilizados foram obtidos através de corte de gemas laterais e apicais de *Piper nigrum*

com auxílio de bisturi cirúrgico, todos provenientes de oito cultivares: IAÇARÁ, APRA, KOTANADAN, PERUNKÓIDI, BRAGANTINA, 239, GUAJARINA, CINGAPURA e KUTHIRAVALLY. O meio de cultura utilizado foi o meio MS, BAP 0,5 mg.L⁻¹ e AIA 0,2 mg.L⁻¹, com adição de sulfato de streptomicina 100 mg.L⁻¹, carvão ativado 0,2% e phytigel 0,2%, e pH ajustado para 5,8 previamente à autoclavagem a 121 °C por 20 minutos..

Para evitar a contaminação do material, algumas soluções foram necessárias na assepsia: fungicida Derosal 0,1%, Cloreto de Mercúrio 0,1%, sulfato de streptomicina 100 mg.L⁻¹ e Mercaptoetanol 50 mM. A assepsia foi dividida em três partes:

Campo:

Corte da planta em casa de vegetação, em pequenos segmentos nodais e apicais e imersão em ácido cítrico (50mM).

Laboratório:

Lavagem em água corrente e sabão neutro;
Imersão em fungicida derosal 0,2% por 20 minutos;

Câmara de Fluxo Laminar:

Os meristemas ficaram em álcool 70% por 1 min e em seguida foram imersos em solução de Cloreto de Mercúrio 0,1% por mais 10 min; Após isto, foram aplicadas cinco lavagens com água destilada autoclavada, imersos em solução de Sulfato de Streptomicina por mais 20 min. Por fim, os meristemas foram colocados em solução de Mercaptoetanol 50 mM (antioxidante).

À medida que os cortes foram feitos, gotas de Mercaptoetanol e Sulfato Streptomicina foram

aplicados nos tecidos. Os meristema com auxílio de lupa esteriomiscrópio foram excisados e inoculados em meio de cultura de estabelecimento e mantidos em sala de cultivo, sob fotoperíodo de 16 h luz. dia⁻¹, com intensidade de luz de 25 μmol. s⁻¹.cm⁻² e temperatura de 25 ± 3° C.

Resultados e Discursão

Segundo (Kerbaui, 2008), o cultivo de meristemas é uma das maneiras mais eficientes para livrar plantas de microorganismos patogênicos endógenos como vírus, micoplasmas, fungos e bactérias, causadores da degenerescência das cultivares. Diante desse contexto, foram inoculados

meristemas de nove cultivares de *Piper nigrum* L, todavia, apresentaram elevadas taxas de contaminação, inicialmente dominadas por fungos (Tabela 1).

Diante disto, temos que, Moino Junior 2000, encontrou altas taxas de contaminação por fungo na cultura de abacaxizeiro, através de micropropagação de tecidos via meristema.

Após a primeira transferência, a partir dos meristemas sobreviventes da primeira etapa de estabelecimento, as contaminações por fungos intensificaram-se (Tabela 2). Contudo, alguns meristemas observados com início de contaminação continuaram desenvolvimento.

Tabela 01. Ocorrência de contaminação e oxidação de meristemas cultivados em meio MS, suplementado com BAP 0,5 mg.L⁻¹ e AIA 0,2mg.L⁻¹, após duas semanas de cultivo.

Cultivar	Nº de meristemas	Meristemas contaminados	Contaminação por fungos	Contaminação por bactérias	Meristemas oxidados
Iaçará	30	07	06	01	30
Bragantina	30	04	04	-	30
Apra	30	04	03	01	30
239	30	02	02	-	30
Kottanadan	30	09	08	01	30
Perunkóidi	20	03	03	-	20
Kuthiravally	20	09	08	03	20
Guajarina	20	-	-	-	20
Cingapura	20	03	03	-	20

Dentre os meristemas sobreviventes foi observado o desenvolvimento meristemático de meristemas de duas cultivares, IAÇARÁ e 239, após dois meses de cultivo. Ressalte-se que a presença do carvão ativado foi mantida no meio de acultura até a segunda transferência com o propósito de tornar mais efetiva a ação dos reguladores de crescimento, BAP e AIA, no desenvolvimento dos meristemas. As novas tentativas de cultivo de meristemas não foram

exitosas devido à contínua e alta taxa de contaminação, principalmente por bactérias, e em poucos casos por fungos. Na cultivar APRA, aparentemente, os tratamentos de assepsia foram mais efetivos, mas ocorreu alta índice de oxidação, o que dificultou o desenvolvimento do meristema (Tabela 3).

Apesar dos explantes apresentarem oxidação, a mesma não limitou o desenvolvimento das plântulas, quando ocorreu.

A cultivar 239 apresentou bom desempenho na primeira avaliação, por isso foi inoculada em maior número posteriormente. Contudo, os meristemas apresentaram tanto contaminação por bactérias quanto por fungos. Há grande ocorrência de fungos e bactérias endógenas em tecidos de pimenteira-do-reino, principalmente da primeira. Como o desenvolvimento do fungo é mais rápido, nos primeiros dias de cultivo, observou-se baixa ocorrência dos dois agentes simultaneamente, mas

as bactérias foram mais difíceis de serem controladas e portanto, houve predominância como agente contaminante. A fim de evitar a ocorrência das bactérias, os meristemas foram imersos em solução de sulfato de streptomina por 20 minutos, o que, aparentemente, tem apresentado eficácia no controle das contaminações causadas por bactérias.

Tabela 02. Comportamento de meristemas in vitro em meio de cultura MS, suplementado com BAP $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e AIA $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, após 30 a 45 dias de cultivo.

Cultivar	Nº de meristemas	Meristemas contaminados	Tipo de contaminação	Meristemas oxidados
Iaçará	07	04	Fungo	07
	14	07	Fungo	14
Bragantina	08	01	Fungo	08
	18	03	Fungo	18
Apra	06	01	Fungo	06
	20	09	Fungo	20
239	10	-	-	10
	18	01	Fungo	18
Kottanadan	08	-	-	08
	13	01	Fungo	13
Perunkóidi	17	05	Fungo	17
Kuthiravally	11	05	Fungo	11
Guajarina	20	03	Fungo	20
Cingapura	17	05	Fungo	17



Figura 1. Cultivo de meristema em meio básico MS, BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e AIA ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), carvão ativado 0,2% sob ponte de papel: **a)** meristema oxidado; **b)** meristema estabelecido e em desenvolvimento; **c)** meristema em desenvolvimento e com a base oxidada; e **d)** meristema com diferenciação de folíolos e com a base oxidado.

Tabela 3. As cultivares inoculadas de *Piper nigrum* e suas contaminações por tipo de agente durante as atividades.

Cultivar	Meristemas	Contaminação				Oxidação
		Total	Bactéria	Fungo	Bactéria / Fungo	
Kottanadan	20	15	13	2	0	20
laçará	20	14	14	0	0	20
Apra	20	9	7	1	1	20
239	30	30	14	13	3	30
Kuthiravally	20	19	3	14	3	20
Bragantina	10	10	8	0	2	10
Perunkóidi	20	20	16	0	4	20

Observações:

1. A contaminação por Fungos foi observada, em média, entre um e cinco dias após a inoculação.
2. As contaminações por Bactérias ocorreram após uma semana da inoculação.
3. A oxidação ocorre, geralmente, no mesmo dia, mas também pode ocorrer após dois dias da inoculação.

Houve evidências de que é necessário o uso de bacteriostático para o controle de bactérias e que fungos puderam ser controlados mais eficiente, mas houve tendência de oxidação dos tecidos dos explantes. Foi observado que se controlado a contaminação e a oxidação for reduzida há grandes possibilidade de sucesso de clonagem de plantas via meristemas de plantas de pimenteira-do-reino.

Conclusão

Com o controle da contaminação e a redução da oxidação há desenvolvimento dos meristemas *in vitro* de pimenteira-do-reino *in vitro* em meio básico MS suplementado com AIA 0,2 e BAP a 0,5 mg.L⁻¹. Os meristemas das cultivares IAÇARÁ e 239 são mais responsivos; e o uso de antibiótico, sulfato de estreptomicina e fungicida do tipo derosal são promissores no controle de fungos e

bactérias no cultivo de meristema a partir de plantas de propagação vegetativa.

Referências Bibliográficas

KERBAUY, G. B.; **Fisiologia Vegetal** - 2ª Ed. 2008.

MOINO JUNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: Bueno, V.H.P. (Ed.) Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade. Lavras: UFLA, 2000. p.175-186.

OLIVEIRA, H. S. de; LEMOS, O. F. de. **Ajustes, adaptação e desenvolvimento do processo de micropropagação em espécies de pimenta nativas da Amazônia e cultivares de Piper nigrum L.** In: III Seminário de Iniciação Científica da Ufra e IX Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental. 2005