



ONTOGÊNESE *IN VITRO* DE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaH₂PO₄

• **Resumo:** O melhoramento genético é uma alternativa para solucionar os entraves de incidência de doença nas áreas de produção de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), mas depende da caracterização dos acessos do BAG e tecnologias que dêem suporte ao programa, dentre as quais a propagação de plantas a partir de sementes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ontogênese *in vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino testando concentrações dos sais de MS e de NaH₂PO₄. Após o processo de assepsia, sementes das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally foram semeadas em básico MS completo ou com metade da concentração de sais em combinação com NaH₂PO₄ (0; 0,10; 0,17; e 0,25 g.L⁻¹) com 3% de sacarose, vitamina de MS e 0,2 % de phytigel. Avaliaram-se as percentagens aos 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 dias de cultivo dos estádios de desenvolvimento: sementes sem respostas (SSR); intumescimento ao nível do embrião (INE); emissão de radícula (ERD); emissão de caulículo (ECL); emissão do hipocótilo (EHP); emissão de cotilédones (ECT) e emissão do epicótilo (EEP). Os tratamentos influenciaram nos estádios de desenvolvimentos apresentando períodos de culminância para cada fase da germinação *in vitro*. A concentração de 0,10 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ adicionada a ½ MS é indicada para germinação *in vitro* de pimenteira-do-reino.

Palavras-chave: Germinação *in vitro*, *Piper nigrum* L., propagação

Introdução

O gênero *Piper*, o maior da família *Piperaceae*, agrega cerca de 2000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo 300 na região Amazônica e 150 na região sudeste do Brasil (Jaramillo & Manos, 2001; Quijano-Abril et al., 2006). Uma das mais importantes espécies do gênero *Piper* é a pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sendo a mais importante especiaria comercializada mundialmente, utilizada na indústria de alimentos e como condimento, e apresenta aroma intenso e picante proporcionado pelo alcalóide piperina (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005). Produto com grande oscilação de preço no mercado internacional e devido à incidência de doenças, como a fusariose, o ciclo produtivo da cultura e tornou-se mais curto (LEMOS, 2003). O melhoramento genético está sendo empregado para encontrar soluções, mas depende da variabilidade genética



disponível por meio da caracterização e avaliação dos acessos do banco ativo de germoplasma (BAG) associado às tecnologias que dão suporte, dentre as quais métodos eficientes de propagação e clonagem das plantas selecionadas. Por isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a ontogênese *in vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino, tendo como meio básico de cultura MS e adição de diferentes concentrações de NaH_2PO_4 visando a propagação de plantas a partir de sementes.

Material e Métodos

Frutos das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino em estágio maduro, coletados no BAG da Embrapa Amazônia Oriental – Belém/Pará, foram submetidos à pré-asepsia no laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos a qual constou de: despoldamento manual das sementes, lavagem em água corrente com detergente líquido, imersão em solução de fungicida derosal a 0,2% por 20 minutos e imersão em a hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por cerca de 12 horas em estufa a 37°C. Sob câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em solução de álcool a 70% (v/v) por um minuto e em solução de NaClO a 1,5% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada. O semeio foi em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com 3% de sacarose, vitamina de MS, 0,2 % de phytigel, adição de NaH_2PO_4 (0; 0,10; 0,17; e 0,25 g.L^{-1}) e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. Os tratamentos foram: T1 ($\frac{1}{2}$ MS + 0 g.L^{-1} de NaH_2PO_4), T2 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,10 g.L^{-1} de NaH_2PO_4), T3 ((testemunha) $\frac{1}{2}$ MS + 0,17 g.L^{-1} de NaH_2PO_4), T4 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,25 g.L^{-1} de NaH_2PO_4) e T5 (MS + 0 g.L^{-1} de NaH_2PO_4). As sementes foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ \text{C}$) e iluminação (fotoperíodo de 16 h.luz.dia⁻¹) com intensidade de luz de cerca de 3.000 lux. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três repetições representas por cada frasco contendo cinco sementes. Aos 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 dias de cultivo foram obtidos os percentuais dos estádios da germinação *in vitro*, quais sejam: sementes sem respostas (SSR); intumescidas ao nível do embrião (INE); emissão de radícula (ERD); emissão de caulículo (ECL); emissão do hipocótilo (EHP); emissão de cotilédones (ECT) e plântula formada a partir da emissão do epicótilo (EEP).

Resultados e Discussão



Os tratamentos influenciaram nos estádios de desenvolvimentos os quais apresentaram períodos de culminância durante o processo de germinação. De maneira geral, observou-se que os estádios iniciais de INE e ERD, respectivamente, apresentaram percentuais maiores aos 30 e 40 dias após inoculação em T1. Neste tratamento a percentagem para INE foi de 60,0% para as cultivares Bento e Guajarina e 53,3% para Cingapura e Kuthiravally, enquanto que para o estádio de ERD, os percentuais foram 53,3% para Bento, 46,7% para Cingapura e Kuthiravally, porém o maior valor neste estádio para a cultivar Guajarina foi obtido em T4 com 47,0% no mesmo período.

Dois tratamentos, T1 e T2, apresentaram concomitantemente maiores taxas percentuais aos 50 dias após o semeio no estádio de ECL. Para T1 estas taxas foram de 53,3% e 46,7%, respectivamente para Cingapura e Guajarina, enquanto que em T2 obteve-se 60,0% para as cultivares, Bento e Kuthiravally. Nos estádios de EHP e ECT, os maiores percentuais, respectivamente, foram alcançados aos 60 e 70 dias após o início do cultivo. Para fase de EHP, as cultivares Guajarina (53,3%) e Kuthiravally (46,7%) atingiram quando germinadas em T2, Cingapura em T1 (46,7%), enquanto que Bento (53,3%). Os maiores percentuais de ECT foram 46,7% para Cingapura, 60,0% para Guajarina e 53,3% para Kuthiravally.

Na fase final do processo de germinação caracterizado pela EEP com a total formação da plântula, T2 possibilitou maiores percentuais de germinação para todas as cultivares com 80,0% para Bento e Guajarina, 60,0% para Cingapura e 73,3% para Kuthiravally. Aos 50 dias de cultivo *in vitro*, avaliação final para SSR, a cultivar Bento apresentou 26,7% em T4, Cingapura 13,3% em T4 e T5, Guajarina 13,3% em T3 e T4 e Kuthiravally 13,3% em T3, T4 e T5. Após esse período, não houve desenvolvimento destas sementes para os estádios subsequentes de germinação.

Lemos (2003), em trabalho com germinação *in vitro* de pimenteira-do-reino obteve plântulas formadas aos 69 dias após o semeio em meio de cultura MS com adição de 0,17 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄. Todavia, este meio (testemunha) não apresentou as maiores taxas em nenhuma das fases da ontogenia, sendo observado maiores taxas para as cultivares Bento, Cingapura, Guajarina a concentração de 0,10 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ em ½ MS. O meio MS sem NaH₂PO₄ (T5) não apresentou os maiores valores em nenhum dos estádio, exceto para cultivar Bento na fase de ECT. Moura et al. (2008) testando diferentes concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenteira-do-reino, obteve plântulas doadoras de explante após três meses da germinação *in vitro* sem adição de NaH₂PO₄ ao meio de cultura MS.



Conclusão

- A concentração de sais MS e NaH_2PO_4 influencia na ontogênese e tempo de culminância para cada estágio da germinação *in vitro*;
- A concentração de $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 adicionada a $\frac{1}{2}$ MS é indicada para germinação *in vitro* de pimenteira-do-reino.

Referências Bibliográficas

DUARTE M. L. R.; ALBUQUERQUE F. C. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>> acesso em 06/10/2011.

JARAMILLO M.A. & MANOS P.S. **Phylogeny and Patterns of Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae)**. *American Journal of Botany*, v. 88, p. 706-716, 2001.

LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese (Doutorado em Melhoramento genético de plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo - Piracicaba. 191p. 2003.

MOURA, E.F.; MENEZES, I.C.; LEMOS, O.F. **Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino**. In: *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, jan-fev, 2008.

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