

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



18º Seminário de
Iniciação Científica e
2º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2014

12 a 14 de agosto

Embrapa
Belém, PA
2014



18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA

CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE PIMENTA-DO-REINO EM MEIO CONTENDO ANTIBIÓTICOS

Nayara Camelo de Souza¹, Simone de Miranda Rodrigues², Gleyce Kelly de Sousa Ramos³

¹Graduanda do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: nay_gondim@hotmail.com

²Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

³Graduanda do Curso de agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia; Bolsista da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: gleyceramos17@yahoo.com.br

Resumo: A pimenteira-do-reino foi introduzida no Brasil no século XVII, assumindo cultivo comercial somente a partir da década de 30 quando introduzida no Pará por imigrantes japoneses. Objetivou-se avaliar a oxidação de embriões zigóticos de pimenta-do-reino em meio de cultura suplementado com diferentes antibióticos (Higromicina e Canamicina). Foram coletados frutos maduros da cultivar Bragantina, provenientes de matrizes do BAG da pimenteira-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental para retirada dos embriões zigóticos. Nas diferentes concentrações de antibióticos, os embriões zigóticos respondem diferentemente quanto aos níveis de oxidação, evidenciando maior oxidação com o aumento da concentração desse reagente.

Palavras-chave: canamicina, higromicina, oxidação, *Piper nigrum*

Introdução

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a especiaria mais importante comercializada no mundo devido a sua utilização na agroindústria e como condimento na indústria alimentícia (DUARTE; ALBUQUERQUE, 1999). Originária da Ásia foi introduzida no Brasil no século XVII, assumindo cultivo comercial a partir da década de 30 quando imigrantes japoneses introduziram a cultura no Pará.

A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, resulta em perdas significativas à pipericultura, comprometendo a produtividade no país. Todas as cultivares comercializadas no Brasil são suscetíveis à doença e os trabalhos focados na obtenção de híbridos interespecíficos, utilizando espécies de *Piper* nativas resistentes ao patógeno, ainda não apresentaram resultados promissores. A cultura de tecidos resultou em alguns protocolos para micropropagação da pimenteira-do-reino. Esses estudos, associados a pesquisas de identificação de genes de resistência ao patógeno (MOREIRA et al., 2012), permitirão aumentar a variabilidade genética dessa cultura e colaborar no entendimento do patossistema. Desse modo, desenvolver um protocolo de transformação genética torna-se importante, e



depende de estudos como o atual, que foca na avaliação do comportamento de explantes de pimenteira-do-reino cultivados em meios de cultura suplementados com antibióticos de seleção.

Assim, objetivou-se avaliar a oxidação de embriões zigóticos de pimenta-do-reino em meio contendo diferentes concentrações de antibióticos, visto esses reagentes comprometem a viabilidade de tecidos vegetais durante a fase de estabelecimento dos mesmos, já que não possuem resistência a esses antibióticos, diferentemente do que ocorre com tecidos vegetais transformados.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Foram coletados frutos maduros da cultivar Bragantina, provenientes de matrizes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da pimenteira-do-reino dessa instituição. Os frutos passaram por assepsia, consistindo primeiramente no despulpamento em água corrente, detergente, hipoclorito de sódio e incubação com detergente neutro, seguido de imersão por 15 min em derosal 0,2%. As sementes foram incubadas por 18h em hipoclorito de sódio a 1% a 40°C. A etapa seguinte consistiu na esterilização das sementes por 1 min em álcool 70%, seguido de hipoclorito de sódio 1,5% por 15 min, e finalizado com cinco lavagens em água destilada autoclavada. Em seguida, ocorreu a retirada dos embriões zigóticos pela região micropilar das sementes.

Os embriões foram introduzidos em frascos com 30 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com NaH_2PO_4 e ágar, suplementado com os antibióticos higromicina ou canamicina em diferentes concentrações (Tabela 1). Assim como uma inoculação de embriões em meio MS com phytagel ou ágar para o antibiótico canamicina, visando verificar a influência do agente solidificante.

Tabela 1 Concentrações dos antibióticos usados no experimento.

Antibióticos	Concentrações (mg.l^{-1})				
Higromicina (Ágar)	0	2,5	3,0	3,5	4,0
Canamicina (Ágar)	0	25	50	75	100
Canamicina (Phytagel)	0	25	50	75	100

Os embriões permaneceram em condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 16 h. por 14 semanas. Avaliados semanalmente quanto à porcentagem de oxidação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, para cada ensaio foi 2x4 sendo 2 antibióticos ou agente solidificantes com 4 concentrações dos antibióticos, sendo considerados 4 explantes/frascos, sendo 3 frascos/tratamento. O grau de oxidação foi realizado de forma qualitativa como: ausente, pouco oxidado (marrom claro), moderadamente oxidado (marrom médio) e muito oxidado (escuro).



Resultados e Discussão

Em todos os ensaios contendo antibióticos ocorreu oxidação. Apenas nos embriões zigóticos cultivados sem os antibióticos não foi evidenciado oxidação. Após 22 dias da inoculação dos embriões zigóticos em meio de cultura houve oxidação dos primeiros embriões nos meios contendo antibiótico higromicina. A oxidação em canamicina ocorreu 34 dias após a inoculação.

A tabela 2 evidencia o baixo valor de oxidação dos embriões cultivados em higromicina comparado ao cultivo em canamicina. A concentração de 3,5 mg.l⁻¹ apresentou os maiores índices de oxidação para higromicina, sendo de 18,75%, enquanto que a concentração de 4 mg.l⁻¹ foi afetada devido a contaminação de alguns frascos, dificultando a avaliação nessa concentração.

Tabela 2 Grau de oxidação dos explantes cultivados em meios contendo antibioticos (%).

Antibiótico	Concentração mg.l ⁻¹	Ausência	Pouco	Moderadamente	Muito
Controle	0	100	0	0	0
	2,5	93,73	6,25	0	0
	3	62,5	12,5	0	0
	3,5	56,25	18,75	0	0
	4	18,75	6,25	0	0
Higromicina	25	81,25	18,75	0	0
	50	56,25	12,5	31,25	0
	75	75	0	6,25	18,75
	100	37,5	6,25	0	31,25

Em relação à canamicina, comparando os diferentes agentes solidificantes, as concentrações de 75 mg.l⁻¹ e 100 mg.l⁻¹, resultaram nos maiores graus de oxidação para os meios solidificados com ágar, apresentando 18,75% e 31% de oxidação dos explantes, respectivamente. Na concentração de 100 mg.l⁻¹, verificou-se 6,2% e 31% para pouco e muito oxidado, respectivamente, o que indica o uso de 100 mg.l⁻¹ de canamicina em ensaios de transformação genética. Comparando a oxidação dos explantes em relação aos agentes gelificantes, ocorreu pouca oxidação nos explantes cultivados com ágar, indicando que o uso de ágar reduz a viabilidade de embriões zigóticos cultivados *in vitro* (Tabela 3).



Tabela 3 Grau de oxidação em canamicina com Ágar ou Phytigel (%).

	Concentração (mg.l ⁻¹)	Ausência	Pouco	Moderadamente	Muito
Ágar	0	100	0	0	0
	25	81,25	18,75	0	0
	50	56,25	12,5	31,25	0
	75	75	0	6,25	18,75
	100	37,5	6,25	0	31,25
Phytigel	0	75	0	0	0
	25	93,75	6,25	0	0
	50	87,5	12,5	0	0
	75	75	0	0	0
	100	87,5	12,5	0	0

Os resultados obtidos se assemelham ao trabalho apresentado por Lima et al. (2001) que constataram a necrose dos calos e a inibição da regeneração de plantas na presença de sulfato de canamicina. Concentrações mais elevadas provocaram a necrose completa dos tecidos, em um intervalo de tempo não superior a 4 semanas.

Conclusões

A canamicina provoca níveis maiores de oxidação em embriões zigóticos de pimenta-do-reino do que a higromicina, indicando o uso desse antibiótico na seleção de possíveis transformantes independentes para essa espécie vegetal.

Referências Bibliográficas

- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. Doenças da cultura da pimenta-do-reino. In: DUARTE, M. L. R. (Ed.). **Doenças de plantas no trópico úmido**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. p. 159-208.
- LIMA, M. A. C.; GARCIA, R. O.; MARTINS, G. S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MOREIRA, E. C. O. **Análise da Expressão diferencial do transcriptoma de raiz de *Piper nigrum* L. em resposta a infecção por *Fusarium solani* f. sp. *piperis***. 2012. 87 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA.