

*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



INDUÇÃO IN VITRO DE CALOS POR DIFERENTES FITORREGULADORES, PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO E OXIDAÇÃO EM HÍBRIDO INTRAESPECÍFICO DE *Piper nigrum* L. (PIPERACEAE) SOB FOTOPERÍODO REVERSO

Orlando Maciel Rodrigues Junior¹, Oriel Filgueira de Lemos², Dávia Rosane Rodrigues Leite³,
Camila Beatriz Lima de Souza³

¹ Bolsista FAPESPA Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia, orlando_maciel@hotmail.com

² Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia, oriel.lemos@embrapa.br

³ Mestranda UFRA em Biotecnologia aplicada à Agropecuária, davia.leite@hotmail.com; camila_beatrizz@hotmail.com

Resumo: A indução de calos é a primeira etapa da organogênese indireta. Este trabalho objetivou avaliar a indução de calos in vitro por diferentes fitorreguladores e os aspectos que limitam, tais como a presença de contaminação e de oxidação dos explantes em um híbrido intraespecífico de pimenta-do-reino. Os explantes foram inoculados em meio basal MS suplementado com os fitorreguladores 1mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ GA₃, apenas 1,5 mg.L⁻¹ BAP ou apenas 4 mg.L⁻¹ TDZ, além de uma testemunha sem fitorreguladores. Após 5 semanas, foram registradas as porcentagens de indução de calos, contaminação e oxidação. Não houve calos na testemunha. Todos os meios de cultura com reguladores de crescimento induziram calos, com a maior média de 70% em 1,5 mg.L⁻¹ BAP. A média de contaminação de explantes variou de 54% a 86% e todos os tratamentos apresentaram pelo menos o grau leve de oxidação. A utilização de 1mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃, 1,5 mg.L⁻¹ de BAP ou de 4mg.L⁻¹ de TDZ sob fotoperíodo reverso é eficaz na indução de calos no híbrido intraespecífico de *Piper nigrum*. A ocorrência de contaminação e a oxidação limitam a calogênese in vitro, devendo ser minimizadas pelo ajuste no método de assepsia e pelo teste de outros antioxidantes.

Palavras-chave: calogênese, regeneração, vitropatógeno

Introdução

O Pará é o maior produtor nacional de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L. - Piperaceae) (IBGE, 2013) e é de grande interesse para a pesquisa que o material que está sendo melhorado, tal como híbridos intra e interespecíficos, possa ser vegetativamente propagado de forma eficiente. No âmbito da cultura de tecidos, uma dessas formas é a organogênese indireta, na qual brotos são regenerados a partir de calos (LEMOS, 2003). A indução de calos, portanto, é a primeira etapa para essa multiplicação in vitro e pode empregar diversos tipos de fitorreguladores e condições ambientais controladas. Dentre estas últimas, o fotoperíodo reverso (16h de escuro e 8h de luz, o oposto do usual)



é uma nova possibilidade para a calogênese eficiente (AHMAD et al., 2014). Além disso, fatores prejudiciais devem ser considerados para a otimização da organogênese indireta, como a contaminação pelos chamados “vitropatógenos” (micro-organismos que interferem nas técnicas de cultura in vitro, não sendo necessariamente fitopatógenos em campo) e a oxidação dos explantes (HERNÁNDEZ; GONZÁLES, 2010). Assim, este trabalho objetivou avaliar a indução de calos in vitro por diferentes fitorreguladores e a presença de contaminação e de oxidação dos explantes sob fotoperíodo reverso em um híbrido intraespecífico de pimenteira-do-reino.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. O material vegetal utilizado como fonte de explantes foi o híbrido intraespecífico de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) número 15, originário do cruzamento das cultivares Apra x Guajarina e mantido in vitro em sala de crescimento. Seguiu-se a metodologia de Ahmad et al. (2014) com adaptações. Como o material vegetal apresentava contaminação, folhas não cortadas foram imersas em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2% (v/v), com uma gota de surfactante Tween 20 para cada 100 ml de solução. As folhas foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada e então cortadas em quadrados de aproximadamente 1,0 cm² para a inoculação em frascos de 260 ml contendo 35 ml de meio de cultura. Utilizou-se o meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 30g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2g.L⁻¹ de Phytigel, acrescido de ácido ascórbico (100 mg.L⁻¹) e de fitorreguladores nas seguintes concentrações: 1mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico); apenas 1,5 mg.L⁻¹ de BAP; apenas 4 mg.L⁻¹ de TDZ (thidiazuron); e uma testemunha (desprovida de fitorreguladores). O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl a 1N e o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Empregaram-se 10 frascos por tratamento, cada um contendo 5 explantes, sendo todos mantidos por 5 semanas em condições controladas de câmara tipo B.O.D a 25 ± 2°C e sob fotoperíodo reverso (16h escuro/ 8h luz). Após a 5ª semana, foram avaliadas as porcentagens de presença de calos, de contaminação visível dos explantes e de oxidação. Quanto ao cálculo das porcentagens, para indução de calos, o número de explantes apresentando calos foi dividido pelo total de explantes inoculados por tratamento; para a contaminação visível e oxidação, foi empregada uma escala subjetiva baseada na seguinte análise visual: ausente (nenhum sinal aparente), leve (pequenos traços de contaminação ao redor do explante; leve escurecimento das áreas seccionadas), moderada



(halos de contaminação do meio ao redor do explante; escurecimento mais acentuado do explante, mas com presença de áreas ou nervuras verdes) ou intensa (nebulosidade de contaminação do meio ao redor do explante; escurecimento total do explante). Finalmente o número de explantes de cada categoria foi dividido pelo total de explantes inoculados.

Resultados e Discussão

A média de porcentagem de indução de calos foi igual a zero no tratamento sem fitorreguladores (testemunha); $52 \pm 27\%$ para $1 \text{ mg.L}^{-1} \text{BAP} + 0,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{GA}_3$; $70 \pm 25,39\%$ para o tratamento $1,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{BAP}$; e $60 \pm 26,67\%$ para o tratamento $4 \text{ mg.L}^{-1} \text{TDZ}$. O maior valor obtido para a indução de calos para o tratamento BAP, coincidindo coincidiu com os menores níveis de contaminação e oxidação, sendo seguido pelos tratamentos TDZ e BAP+GA3 (Figuras 1 e 2). Ahmad et al. (2014) também observaram valores máximos para indução de calos nestes mesmos tratamentos, não havendo diferença significativa entre si, e ausência total de calos no meio sem fitorreguladores. Comparativamente, Ahmad et al. (2013) observaram valores inferiores na indução de calos de *P. nigrum* sob condições de fotoperíodo normal (16h luz/ 8h escuro). Além disso, é sabido que a contaminação por vitropatógenos e a oxidação são prejudiciais para as respostas ótimas dos explantes (HERNÁNDEZ; GONZÁLES, 2010). Neste trabalho, a porcentagem dos explantes livres de contaminação variou de 54% a 86%, enquanto que todos os explantes apresentaram, no mínimo, o grau leve de oxidação. Para otimizar a indução de calos e consequentemente a organogênese indireta de *P. nigrum*, são necessários ajustes no protocolo de assepsia, bem como a inclusão de outros antioxidantes no meio de cultura para diminuir a interferência negativa da contaminação e oxidação (HERNÁNDEZ; GONZÁLES, 2010).

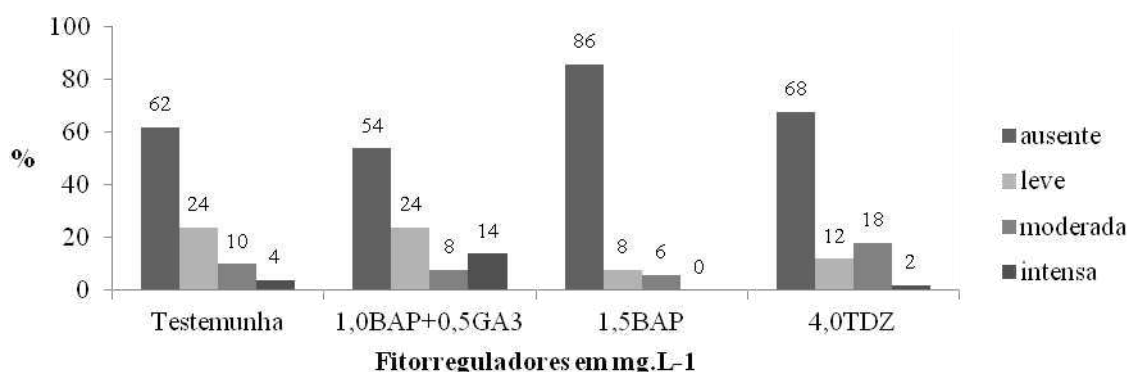


Figura 1: Porcentagem dos graus de contaminação dos explantes de *Piper nigrum* em diferentes fitorreguladores.

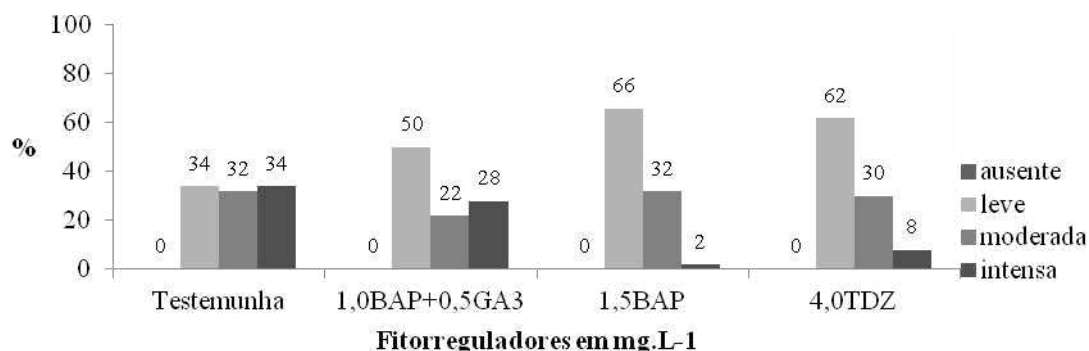


Figura 2: Porcentagem dos graus de oxidação dos explantes de *Piper nigrum* em diferentes fitorreguladores.

Conclusão

A utilização de 1mg.L^{-1} de BAP + $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de GA_3 , $1,5\text{mg.L}^{-1}$ de BAP ou de 4mg.L^{-1} de TDZ sob fotoperíodo reverso é eficaz na indução de calos no híbrido intraespecífico de *Piper nigrum*. A contaminação e a oxidação estão presentes nesta etapa da calogênese in vitro, devendo ser minimizadas pelo ajuste no método de assepsia e pelo teste de outros antioxidantes.

Referências Bibliográficas

- AHMAD, N.; ABBASI, B. H.; FAZAL, H.; KHAN, M. A.; AFRIDI, M. S. Effect of reverse photoperiod on in vitro regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L. **Comptes Rendus Biologies**, v. 337, n. 1, p. 19–28, 2014.
- AHMAD, N.; ABBASI, B. H.; RAHMAN, I.; FAZAL, H. *Piper nigrum*: Micropropagation, Antioxidative enzyme activities, and Chromatographic Fingerprint Analysis for Quality Control. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 7, p. 2004–2015, 2013.
- HERNÁNDEZ, Y.; GONZÁLEZ, M. E. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en -el establecimiento in vitro de frutales perennes. **Cultivos Tropicales**, v. 31, n. 4, p. 58-69, 2010.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de dados Agregados. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 29 jun. 2015.



19º Seminário de Iniciação Científica e 3º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental
19 a 20 de agosto de 2015, Belém,PA.

LEMOS, 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.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n. 3, p. 473-497, 1962.