



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

BELÉM
2014



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia: Área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro
Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos**

**BELÉM
2014**

Castro, Gledson Luiz Salgado de

Alterações na morfologia e no crescimento *in vitro* de *Piper nigrum* L. submetidas ao filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* Alb. / Gledson Luiz Salgado de Castro. - Belém, 2014.

73 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2014.

1. *Piper nigrum* L - suscetibilidade. 2. Filtrado de cultura
3. *Fusarium solani* f. sp. *piperis* I. Título.

CDD – 583.25



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia: Área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro
Presidente/Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Dr.^a Ilmarina Campos de Menezes
Embrapa Amazônia Oriental
1º Examinador

Prof.^a Dr.^a Michelle Martins do Nascimento Pauxis
Universidade Federal Rural da Amazônia
2º Examinador

Prof.^a Dr.^a Joanne Moraes de Melo Souza
Universidade Federal Rural da Amazônia
3º Examinador

DEDICO

Aos meus pais, Luiz Lopes de Castro e Síría Nazaré da Silva Salgado, pelos os seus sacrifícios, incentivos e apoio nos momentos mais difíceis para me manter em meus estudos.

Aos meus irmãos Wagner Salgado de Castro, Sara Salgado de Castro e Wanderson Salgado de Castro, por todo amor, carinho e o apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos e demais familiares, tão importantes em todos os momentos da minha vida pelo incentivo.

OFEREÇO

A minha querida esposa, Rosana da Costa Silva, por todo amor, carinho, força, paciência, companheirismo e compreensão em todos os momentos desta jornada. Muito obrigado por acreditar em meu crescimento profissional.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida, saúde e paz. Por toda a força concedida diante das dificuldades e por todas as vitórias alcançadas. Sempre serei muito grato por estar comigo, por iluminar a minha mente e fazer de mim um instrumento em suas mãos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pela formação profissional e oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Agronomia;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão das bolsas de estudos e financiamento das pesquisas;

À professora e coordenadora do Programa de Pós-graduação em Agronomia Dr.^a Herdjania Veras de Lima pela sua disposição em fazer seu melhor para elevar o nível do curso

Ao meu grande amigo e orientador, Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro, pela orientação, ensinamentos e conhecimentos repassados desde os tempos de graduação. Muito obrigado pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

À banca examinadora de qualificação Dr.^a Célia Regina Tremacoldi, Ph. D. Moacyr Bernardino Dias Filho e Prof.^a Dr.^a Joanne Moraes de Melo Souza, e a banca examinadora de defesa Dr.^a Ilmarina Campos de Menezes, Prof.^a Dr.^a Michelle Martins do Nascimento Pauxis e Prof.^a Dr.^a Joanne Moraes de Melo Souza pela participação e pelas contribuições na melhoria do trabalho. Muito obrigado;

Ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental pelo fornecimento dos isolados do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, em especial a Dr.^a Célia Regina Tremacoldi pela atenção, esclarecimentos, e por estar sempre disposta a ajudar e ensinar. A todos os estagiários, em especial a Luciane Reis e Samuel Amaral e ao funcionário Sr. Manoel pelo auxílio durante o preparo do filtrado.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, onde pude desenvolver as pesquisas com todo apoio necessário, em especial ao meu co-orientador Dr. Pesq. Oriel Filgueira de Lemos. A ele tenho imensa admiração pelo seu profissionalismo e por sua disposição, não medindo esforços para atender e transmitir seus conhecimentos. À Dra Ilmarina Menezes pela amizade, orientações, momentos de descontração e aos demais funcionários pela convivência e ajuda durante a realização deste trabalho.

As mestrandas Camila Sousa e Dávia Leite pela amizade e ajuda quando solicitadas. Aos estudantes de iniciação científica, em especial, à Gleyce Kelly Ramos e Ruanny Vidal

pelo auxílio na condução do experimento e ao Orlando Maciel Rodrigues Junior pela ajuda na tradução do resumo dessa dissertação.

Aos meus pais, Luiz Lopes de Castro e Sírnia Nazaré da Silva Salgado, pelos os seus sacrifícios, incentivos e apoio nos momentos mais difíceis para me manter em meus estudos. Por estarem sempre comigo dando-me muito amor e carinho.

Aos meus irmãos Wagner Salgado de Castro, Sara Salgado de Castro e Wanderson Salgado de Castro, por todo amor, carinho e o apoio nas horas mais difíceis.

A minha querida esposa, Rosana da Costa Silva, por todo amor, carinho, força, paciência, companheirismo e compreensão em todos os momentos desta jornada. Muito obrigado pela força e por acreditar em meu crescimento profissional.

Aos meus queridos amigos Sebastião Kelvin Balieiro Nunes e Rafael Venâncio da Silva Ferreira por todo o apoio e incentivo. Pelas conversas, pelos momentos de descontração e pela ajuda quando solicitados.

Aos meus amigos do Mestrado, Bruna Sayuri Fujiyama, Dalton Dias da Silva Júnior, Edwin Almeida, Luiz Henrique Rocha Lopes, Michel Emerson, Michel Keisuke Sato, Sibebe Joice Tapajós da Silva e Priscila Maia dos Santos, que desde os tempos de graduação sempre estiveram comigo me incentivando e me apoiando em minhas decisões. Pelos momentos de alegria e de descontração.

Às minhas grandes amigas Fabrícia Kelly Cabral Moraes e Lana Roberta Reis dos Santos pela ajuda e companheirismo em todas as etapas deste trabalho, pela amizade, pela agradável convivência, por dividir comigo todos os momentos de dificuldade durante a execução do experimento. Por me incentivar e ensinar através de suas experiências e competências. Pelos bons momentos de alegria e descontração, e por toda atenção e carinho a mim dispensado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação e para o meu crescimento profissional.

Minhas sinceras considerações e agradecimentos

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	ácido indolacético
ANA	ácido naftalenoacético
BAP (BA)	6-benzilamino purina (6-benziladenina)
MS	meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962)
1/2MS	meio básico com metade da concentração dos sais MS
BSA	Batata-Sacarose-Ágar
Czapek-Dox	Meio para cultivo do fungo e preparo do filtrado de cultura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito da média das doses do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre o sistema radicular dois genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura.	44
Tabela 2 Efeito da média das doses filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre o caule dos genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultivo.....	49
Tabela 3 Efeito da média das doses do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as folhas de dois genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura.	55
Tabela 4 Doses estimadas (DL ₅₀) do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> para reduzir em 50% o crescimento dos genótipos de <i>Piper nigrum</i> L. e das suas regiões das raízes, caule e folhas.....	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Principais cultivares de pimenteira-do-reino encontradas em áreas produtoras do estado da Pará: (A) Cingapura, (B) Guajarina, (C) Bragantina, (D) Kuthiravally, (E) Iaçará-1 e (F) Apra..... 20
- Figura 2. Plantas de pimenteira-do-reino infectadas por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. (A) Sintomas de amarelecimento, desfolha, necrose das folhas e apodrecimento do colo. (B) Morte da planta após três anos do início dos sintomas na parte aérea..... 23
- Figura 3. Cultivo e preparo do filtrado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*: (A e B) Inoculação e cultivo do isolado em meio de cultura BSA. (C) Aspecto do fungo após 15 dias de incubação. (D) Inoculação do fungo em meio de cultura Czapek-Dox. (E) Filtrado de cultura autoclavado após a filtragem e separação do micélio crescido durante 28 dias. . 41
- Figura 4. Alterações morfológicas nas plantas de *Piper nigrum* L. submetidas às doses (% v/v) do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*: (A) Plantas do híbrido intraespecífico, (B) Plantas da cultivar Bragantina..... 43
- Figura 5. Alterações no número e comprimento das raízes dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidos às doses do filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura..... 45
- Figura 6. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* nas alterações do número e comprimento das raízes dos genótipos *in vitro* de *Piper nigrum* L. aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão. 46
- Figura 7. Alterações na massa fresca e massa seca do sistema radicular de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultivo. 47
- Figura 8. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* na massa fresca e massa seca das raízes dos genótipos *in vitro* de *Piper nigrum* L. aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão..... 48
- Figura 9. Alterações no desenvolvimento caulinar de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura. 50
- Figura 10. Efeito das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* na morfologia do caule dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as média \pm desvio padrão..... 52
- Figura 11. Alterações na massa fresca e massa seca no caule dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura..... 53
- Figura 12. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre as massas fresca e massa seca do caule de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão. 54

Figura 13. Evolução sintomatológica na área foliar dos dois genótipos de <i>Piper nigrum</i> L. submetidos ao filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> , aos 45 dias em meio de cultura.	56
Figura 14. Alterações nas folhas dos genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> aos 45 dias em meio de cultura.	57
Figura 15. Alteração foliar sob o efeito de doses do filtrado da cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em dois genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão.	58
Figura 16. Alterações na massa foliar sob o efeito de doses do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Piperis</i> em dois genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura.	59
Figura 17. Alterações na massa foliar sob o efeito de doses do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em dois genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam média \pm desvio padrão.	60
Figura 18 Alterações na massa seca total dos genótipos <i>in vitro</i> de pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.) aos 45 dias em meio de cultura com filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Piperis</i>	61

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	16
1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1.1. Origem	18
1.1.2. Botânica	18
1.1.3. Cultivares	19
1.1.4. Importância socioeconômica.....	21
1.1.5. A doença fusariose	21
1.1.6. Melhoramento genético da pimenteira-do-reino visando resistência à fusariose	24
1.1.7. Seleção <i>in vitro</i>	26
1.1.8. Cultura de tecidos.....	28
REFERÊNCIAS	31
2. ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Piper nigrum</i> L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> Alb.	37
2.1. INTRODUÇÃO	37
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1. Material Vegetal.....	39
2.2.2. Multiplicação dos brotos a partir de segmentos nodais	39
2.2.3. Enraizamento <i>in vitro</i> dos brotos	40
2.2.4. Obtenção do filtrado de cultura de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	40
2.2.5. Avaliação da fitotoxicidade do filtrado da cultura de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em plantas de <i>Piper nigrum</i> L.....	41
2.2.5.1. Avaliação das alterações morfológicas.....	41
2.2.5.2. Avaliação das alterações no crescimento.....	42
2.2.5.3. Análise estatística	42
2.3. RESULTADOS.....	43
2.3.1. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> na morfologia e no crescimento das plantas de <i>Piper nigrum</i> L.	43
2.3.2. Alterações no sistema radicular	43
2.3.3. Alterações no caule.....	49

2.3.4. Alterações nas folhas	55
2.4. DISCUSSÃO	63
2.5. CONCLUSÕES	67
ANEXOS	68
REFERÊNCIAS	71

ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

RESUMO

As cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em uso no Brasil são suscetíveis ao fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Porém, os níveis de suscetibilidade ainda não são conhecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade por meio das alterações na morfologia e no crescimento *in vitro* da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico (Apra x Guajarina) de pimenteira-do-reino submetidas ao filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Brotos previamente enraizados foram transferidas para meio de cultura MS com 3% de sacarose, vitaminas MS, 0,2% de phytigel, 0,05 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético e adição do filtrado de cultura nas doses de 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v). As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, luminância de 3000 lux e a 25 ± 3 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (2 genótipos e 5 doses do filtrado) e aos 45 dias de cultivo foram observadas alterações na morfologia e redução no crescimento dos dois genótipos quanto a parte aérea e raízes. Os dados foram submetidos às análises de variância e regressão. O híbrido apresentou as maiores médias para o número e comprimento das raízes, assim como maior acúmulo médio de massa fresca e seca das raízes. O comprimento médio do caule e do entrenó foram maiores para a Bragantina, no entanto, os acúmulos médios de massa fresca e massa seca do caule, assim como o número médio de gemas foram maiores para o híbrido. O número médio de folhas, área foliar total, folhas senescentes e acúmulos de massa fresca e seca nas folhas foram maiores para o híbrido. O filtrado fúngico em meio de cultura provoca alteração mais acentuada na morfologia e no crescimento da cultivar Bragantina do que no híbrido e se constitui uma alternativa *in vitro* para quantificar os níveis de suscetibilidade dos genótipos de *Piper nigrum* L. às toxinas produzidas pelo patógeno.

Palavras chaves: *Piper nigrum* L - suscetibilidade, Filtrado de cultura, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

CHANGES IN THE MORPHOLOGY AND IN THE *IN VITRO* GROWTH OF *Piper nigrum* L. SUBJECTED TO *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb. CULTURE FILTRATE

ABSTRACT

The cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) in use in Brazil are susceptible to the fungus *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. However, susceptibility levels are not yet known. The aim of this study was to evaluate the susceptibility through changes in morphology and *in vitro* growth of the cultivar Bragantina and the intraspecific hybrid (Apra x Guajarina) of black pepper subjected to culture filtrate of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Previously rooted shoots were transferred to MS medium with 3% sucrose, MS vitamins, 0.2% phytigel, 0.05 mg L⁻¹ naphthalene acetic acid and culture filtrate at doses of 0, 20, 30 40 and 50% (v/v). Plants were grown in a growth chamber with a 16h photoperiod and 3000 lux illuminance at 25 ± 3 ° C. The experimental design was a completely randomized factorial design of 2x5 (2 genotypes and 5 doses of filtrate) and, at 45 days of cultivation, changes in morphology and reduced growth of shoots and roots were observed and evaluated on both genotypes. Data were submitted to analysis of variance and regression. The hybrid had the highest means for the number and length of roots, as well as higher average accumulation of fresh and dry weight of roots. The mean stem and internode length were higher for Bragantina, however, the average accumulation of fresh and dry weight of the stem, as well as the average number of buds, were higher for the hybrid. The average number of leaves, total leaf area, senescent leaves and accumulation of fresh and dry weight in the leaves were higher for the hybrid. The fungus culture filtrate in the medium causes more evident changes in the morphology and the growth of cultivar Bragantina than in the hybrid and it is an *in vitro* alternative to quantify the levels of susceptibility of genotypes of *Piper nigrum* L. to toxins produced by the pathogen.

Keywords: *Piper nigrum* L. - susceptibility, Culture filtrate, *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pertence à família Piperaceae, com mais de 2000 espécies. É uma planta trepadeira, perene, que cresce aderida a tutores de madeira ou a troncos de árvores, podendo atingir até cinco metros de altura quando adulta. Encontra-se distribuída na América tropical e principalmente no sul da Ásia onde esta cultura de originou (SOUZA et al., 2011; GORDO et al., 2012).

Seu fruto, denominado de pimenta-do-reino, é amplamente utilizado na culinária como condimento, em forma de grãos inteiros, moídos e misturados a outros condimentos. Possui um óleo volátil responsável por seu sabor picante e aroma intenso proporcionado pela piperina (BENITEZ et al., 2009). A piperina é um importante alcaloide que possui atividades anti-inflamatória, analgésica e antioxidante, além de aumentar drasticamente a absorção de selênio, vitamina B e β -caroteno, bem como de outros nutrientes (LEE et al., 2005).

Atualmente, o Vietnã é o maior produtor e exportador mundial de pimenta-do-reino, seguido da Indonésia e Índia (FAOSTAT, 2012). O Brasil é o quarto maior produtor mundial com uma produção de 41.958 t, sendo 31.027 t produzidos pelo estado do Pará, cerca de 74% da produção nacional de pimenta-do-reino seca. O estado do Pará é o maior produtor nacional, seguido dos estados do Espírito Santo, Bahia e Paraíba (IBGE, 2013).

Apesar de o Brasil ser um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, a incidência de doenças, aliada a inexistência de cultivares resistentes, tem contribuído para reduzir a produção e a produtividade no país. A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (ALBUQUERQUE et al., 1961), tem causado a morte de milhares de pimenteiros, resultando em grandes perdas de produção e redução no ciclo produtivo da cultura de 20 anos para 6 a 8 anos (SHAHNAZI et al., 2012).

O *F. solani* f. sp. *piperis* Alb. é um fungo natural do solo e que sobrevive tanto na planta quanto na matéria orgânica do solo, como saprófita. A infecção geralmente se inicia pelas raízes mais jovens e raízes secundárias, as quais apodrecem progressivamente, levando ao amarelecimento e murcha das folhas, que podem cair no solo ou necrosar e ficar aderidas aos ramos. Com o progresso da doença a planta fica totalmente desprovida de folhas e morre (KIMATI et al., 2005; DIAS, 2006; TREMACOLDI, 2010).

Ainda não existem cultivares de pimenteira-do-reino resistentes a fusariose no Brasil. No entanto, várias medidas têm sido adotadas para tentar controlar a doença. Segundo Tremacoldi (2011), o uso de folhas de nim trituradas e incorporadas ao solo pode controlar em 100% a podridão das raízes de pimenteira-do-reino. Além disso, foi verificado que a casca

de caranguejo, adicionada ao solo, pode auxiliar na redução de incidência da fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino (BENCHIMOL et al., 2005).

Outras medidas de controle têm sido utilizadas visando deixar a plantas menos predispostas a fusariose, dentre elas: adubação química balanceada, drenagem do solo muito argiloso e irrigação no período de seca. Além disso, deve-se manter uma cobertura vegetal nas entrelinhas e evitar capinas drásticas nos plantios. (BENCHIMOL et al., 2000; DUARTE et al., 2002).

A propagação rápida de plantas livres de patógenos e clonagem de material de elite, resgate de embriões de cruzamentos intraespecífico e interespecíficos (BARBOSA, 2002), geração de variabilidade genética por mutações induzidas, produção de plantas transgênicas, análises genético-moleculares e a seleção *in vitro* são técnicas *in vitro* que podem servir como ferramentas valiosas para auxiliar no controle da doença (LEMOS, 2010).

A seleção *in vitro*, utilizando toxinas fúngicas como agente seletivo, é uma técnica que pode ser utilizada em programas de melhoramento genético, visando obter plantas resistentes ou tolerantes a doenças. Em pimenteira-do-reino, Lemos (2003) verificou que o filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* foi bastante eficiente como agente seletivo e pode ser utilizado para seleção de materiais com potenciais para a resistência à fusariose.

O efeito do filtrado fúngico como agente seletivo pode ser avaliado por diversos parâmetros, por exemplo, inibição do crescimento em massa, percentagem de explantes em regeneração, percentagem de explantes necróticos e alterações na morfologia (HOLLMANN et al., 2002). Em maracujazeiro-amarelo *in vitro*, o filtrado de cultura de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* causou reduções no número, comprimento, massa fresca e massa seca das raízes, além do amarelecimento e queda das folhas. No entanto, essas reduções apresentaram diferentes níveis, o que permitiu selecionar aqueles genótipos de maracujazeiro-amarelo menos suscetíveis ao patógeno (FLORES, 2008).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar as alterações na morfologia e no crescimento das plantas do híbrido intraespecífico de *Piper nigrum* L. (Apra X Guajarina) e da cultivar Bragantina submetidas ao cultivo *in vitro* com adição de filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*, agente causal da fusariose em pimenteira-do-reino. Assim, será possível testar a hipótese de que há diferença quanto à suscetibilidade entre as plantas de pimenteira-do-reino às toxinas fúngicas presentes no filtrado do patógeno.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. Origem

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), também conhecida no Brasil como pimenta preta ou pimenta da Índia é originária das florestas de Kerala, no sul da Índia. Na Europa, durante a idade média, seu fruto foi a primeira especiaria oriental a ser utilizada como um artigo de comércio de grande importância. Era destinada a preservação de carnes e para tornar mais agradáveis alimentos repulsivos. Posteriormente, foi levada da Índia para outras regiões tropicais e subtropicais no mundo (ALBUQUERQUE e DUARTE, 1986).

No Brasil, a pimenta-do-reino foi introduzida pelos portugueses no século XVII, no estado da Bahia, sendo levada em seguida para os estados da Paraíba, do Maranhão e do Pará. Porém, devido ao pouco conhecimento sobre a tecnologia de produção e a utilização de cultivares inadequadas, a pimenteira-do-reino não se estabeleceu como uma cultura industrial (ALBUQUERQUE e CONDURÚ, 1971; DIAS, 2006).

A exploração econômica só veio ocorrer em 1933, quando imigrantes japoneses que se destinavam ao estado do Pará, trouxeram algumas mudas da cultivar Kuching, conhecida como Cingapura, em referência ao porto de embarque desses imigrantes. As mudas foram cultivadas na fazenda Açaizal, no município paraense de Tomé-Açu. Dessa base genética comum ocorreu a expansão comercial do cultivo no Pará, por meio da propagação vegetativa desse material botânico (ANDO et al., 1997; SILVA e SOUZA, 2009).

1.1.2. Botânica

Conhecida botanicamente como *Piper nigrum* L. a pimenteira-do-reino pertence à família *Piperaceae* e ao grupo das *Magnollidae* (SMITH, 2008). Essa família está representada por 5 gêneros. O gênero *Piper* inclui cerca de 2000 espécies que se caracterizam pelo uso medicinal popular e pela importância econômica e comercial, em virtude da produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e de inseticida (BRITO, 2012). No Brasil, encontram-se 450 destas espécies, distribuídas desde a região Amazônica até a região sudeste do país. Apresentam diversas formas de crescimento, dentre elas, ervas, arbusto e pequenas árvores (MENEZES, 2011).

As raízes, na maioria, são adventícias, no entanto, algumas são do tipo pivotante. As folhas podem ser grandes ou pequenas, codiformes ou lanceoladas, geralmente de coloração verde escuro, pecioladas e inteiras com disposição alternada. As flores são de coloração esbranquiçada, sem perianto, que se agregam em espiguetas, podem ser masculinas, femininas ou bissexuais. As espécies cultivadas apresentam, normalmente, flores hermafroditas, o que facilita a polinização e o desenvolvimento do fruto (AGAREZ et al., 1994). A polinização natural é por geitonogamia através da dispersão do pólen por gotículas d'água ou chuvas, cuja formação do fruto dá-se seis meses após a polinização. Os frutos desenvolvem-se em espiguetas, também denominadas amentilhos, onde são agrupadas até 150 grãos. Na maturação, os grãos apresentam cor vermelha e diâmetro entre 4 e 6 mm (DIAS, 2006).

1.1.3. Cultivares

As cultivares de *Piper nigrum* L. apresentam ótimo crescimento e desenvolvimento em clima quente e úmido, com precipitação pluviométrica média de 2500 mm/ano, umidade acima de 80%, temperatura média em torno de 23 °C a 28 °C e solos com textura média e boa drenagem (KRISHNAMURTHY et al., 2011). Atualmente, nos estados do Pará, Bahia e Espírito Santo a cultivar mais plantada pelos pipericultores é a Cingapura. Entretanto, depois de estudos realizados por Albuquerque et al., (1989) no estado do Pará, foram selecionadas duas outras cultivares: a Bragantina e a Guajarina, todas elas apresentando bons índices de produtividade.

A Cingapura foi introduzida no Brasil em 1933 por imigrantes japoneses. Apresenta plantas com formato cilíndrico; folhas pequenas e estreitas; espigas curtas com comprimento médio de 7,0 cm e frutos de tamanho médio (Figura 1 A). É suscetível à fusariose, podridão-do-pé e viroses, porém apresenta resistência à murcha-amarela. É recomendada para condições de solos de textura média com boa drenagem.

A Guajarina é descendente da cultivar Arkulam Munda, introduzida da Índia por volta de 1970. Essa cultivar apresenta formato cilíndrico quando adulta; com folhas alongadas e de tamanho médio; espigas longas, com comprimento médio de 12,0 cm; os frutos apresentam bom enchimento nas espigas, sendo esféricos e graúdos (Figura 1 B). É suscetível à fusariose, podridão-do-pé, murcha amarela e viroses. É recomendada para ambientes com período de estiagem definidos e solos bem drenados.

A Bragantina foi introduzida no Brasil na década de 1980, originou-se de propagação vegetativa do híbrido Panniyur, obtido do sul da Índia. As plantas possuem folhas largas e cordiformes; espigas longas, com comprimento médio de 14,0 cm; flores 100% hermafroditas e frutos graúdos (Figura 1 C). É suscetível à fusariose, podridão-do-pé e viroses, porém é resistente à murcha-amarela. Recomenda-se para ambientes com maior precipitação pluviométrica e solos com maior capacidade de retenção de umidade.

A Kuthiravally foi introduzida da Índia, no período 1982/93, através de estacas. Apresenta folhas largas e compridas, espigas longas com comprimento médio de 12,0 cm, com extremidade recurvada repleta de frutos graúdos (0,49 mm de diâmetro) de maturidade tardia (Figura 1 D). Exibe alta resistência á murcha amarela, porém, é suscetível à fusariose. Indicada para solos de textura média e bem drenados.

A Iaçará-1 foi introduzida da Índia em 1981, sob a forma de estacas vegetativas. As folhas são de tamanho médio e estreitas. As espigas apresentam tamanho médio de 9,0 cm, repletas de frutos em condições ambientais favoráveis (Figura 1 E). A cultivar não apresenta resistência à fusariose, à podridão do pé e às viroses, mas apresenta resistência a murcha amarela. É recomendada para cultivos em área de solo de textura média com boa drenagem.

A cultivar Apra é oriundo de estacas de plantas matrizes provenientes do sul da Índia, na década de 1980. Apresenta folhas largas; espigas longas, com comprimento médio de 12,0 cm, contendo várias fileiras de frutos graúdos (Figura 1 F). Possui alta resistência à murcha-amarela, porém, é suscetível à fusariose e ao secamento dos ramos. Recomenda-se seu cultivo em solos de textura média e bem drenados.

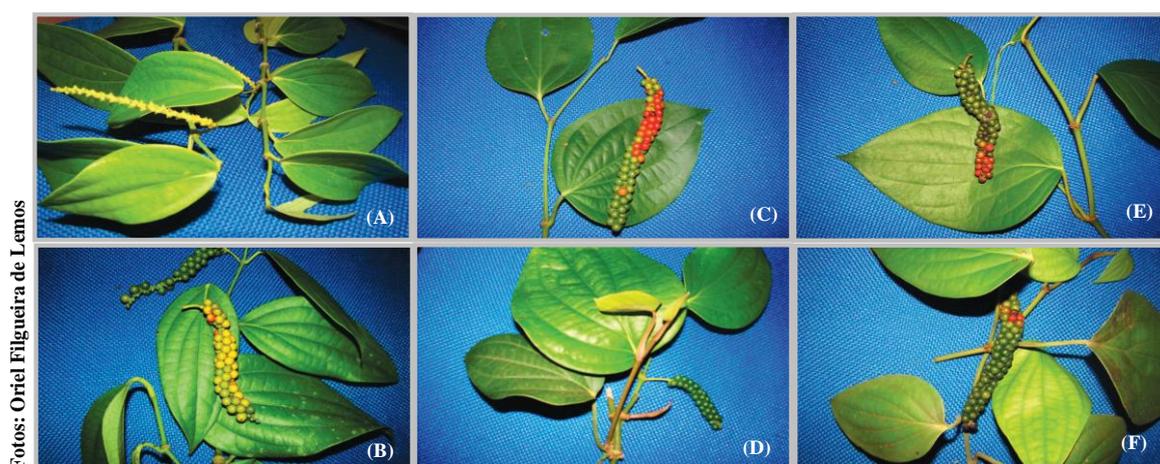


Figura 1. Principais cultivares de pimenteira-do-reino encontradas em áreas produtoras do estado da Pará: (A) Cingapura, (B) Guajarina, (C) Bragantina, (D) Kuthiravally, (E) Iaçará-1 e (F) Apra. Fonte: LEMOS et al., 2011.

1.1.4. Importância socioeconômica

A pimenta-do-reino é uma especiaria de grande importância econômica no mercado nacional e internacional. Em 2012 a exportação de especiarias para os EUA, principal importador, rendeu um ganho total de cerca de US\$ 5 bilhões, sendo US\$ 1,84 bilhões resultante da pimenta-do-reino. O Vietnã e Indonésia são os maiores produtores e exportadores, seguidos de Índia e Brasil. Nos últimos 10 anos, o Vietnã teve um aumento de 150% na sua área colhida e, atualmente, apresenta uma produção de 110.000 t, cerca de 32% da produção total mundial de pimenta-do-reino (ANEXO A). Indonésia, Índia e Brasil representam 24%. Os demais países, como a China e Sri Lanka, produziram abaixo de 10% da produção total mundial (IPC, 2012).

Em 2001, o Brasil ocupou a quarta posição mundial na produção de pimenta-do-reino, e em 2006 apresentou sua maior produção dos últimos 10 anos, com 80.316 t em uma área colhida de 33.224 ha, sendo a produtividade média de 2,42 t/ha. Porém houve uma queda de produção de aproximadamente 50 % até o ano de 2012 (ANEXO A). Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor de pimenta-do-reino, com uma produção de 41.919 t colhidas em uma área de 18.701 ha e com uma produtividade média de 2,24 t/ha (FAOSTAT, 2012).

O estado do Pará é o maior produtor nacional de pimenta-do-reino, seguido do Espírito Santo e da Bahia. A maior produção brasileira dos últimos 10 anos, relatada anteriormente, teve participação de 83,46% do estado do Pará. No entanto, essa produção reduziu nos anos seguintes, sendo registrada uma produção de 32.267 t no ano de 2012, com queda de 48% (ANEXO B). Atualmente, o Pará representa 74% da produção nacional, com uma produção de 31.027 t em uma área colhida de 14.414 ha, e produtividade média de 2,15 t/ha. O Espírito Santo é o segundo maior produtor, representando 16% da produção nacional. (IBGE, 2013).

1.1.5. A doença fusariose

No início da exploração econômica da pimenteira-do-reino, a cultivar Cingapura foi utilizada em sucessivas propagações vegetativas, durante três décadas consecutivas, ocupando extensas áreas de monocultivo. Essa condição contribuiu para a uniformidade genética das populações e constituiu-se como o principal fator que favoreceu o desenvolvimento da doença conhecida como podridão das raízes ou fusariose, que se disseminou rapidamente em curto espaço de tempo, causando grandes prejuízos econômicos aos produtores de pimenta-do-reino (ANDO et al., 1997).

Os primeiros registros da fusariose ocorreram em 1957 nos pimentais de Tomé-Açu, contudo, somente em 1961, a partir de material coletado no plantio de Paulo Ohashi, no Município de Santa Isabel do Pará, foi determinada a natureza do seu agente causal, o fungo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *piperis* Albuquerque. (ALBUQUERQUE, 1961). Albuquerque et al., (1996) realizaram trabalhos em áreas de ocorrência da doença no estado do Pará e constataram que a partir do terceiro ano, as plantas desenvolveram a doença, e ao sexto ano apresentaram índices de infecção de até 100%.

A fusariose trouxe graves consequências econômicas, sociais e ambientais que resultaram em queda de produção e das exportações, falência, desemprego, emigração de 50% da população de produtores para outros estados do país, abandono de propriedades, venda de propriedades a baixo custo, mudanças no *status* social dos produtores e alterações no sistema de produção (DUARTE et al., 2002). Calcula-se que esse patógeno tenha causado, em 30 anos, perdas de produção da ordem de 150 milhões de dólares; e uma redução da área plantada de 60 mil hectares para, aproximadamente, 18 mil hectares, e do número de produtores de 16.756 para 7.951 entre as décadas de 1980 e 1990 (BARBOSA, 2002).

O fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (teleomorfo *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*) é um habitante natural dos solos, que sobrevive tanto na planta como necrotrófico quanto na matéria orgânica do solo como saprófita. Pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae (TREMACOLDI, 2010). Produz três tipos de esporos, os macroconídios, microconídios e os conídios intermediários, formados de conidióforos, cujos esporos de resistência, os clamidósporos, podem se originar do espessamento de paredes das células das hifas ou de macroconídios (SILVA et al., 2011).

Sendo um patógeno de solo, a infecção geralmente se inicia pelas raízes mais jovens e raízes secundárias. As condições de temperatura e umidade elevadas da região Norte brasileira favorecem a multiplicação do patógeno e o avanço da colonização dos tecidos das raízes. Com o apodrecimento progressivo do sistema radicular, começam a aparecer os sintomas reflexos na parte aérea das pimenteiras, como amarelecimento e murcha das folhas, que podem cair no solo ou necrosar e ficar aderidas aos ramos. Geralmente, as plantas morrem após dois ou três anos do início dos sintomas na parte aérea. No estágio mais avançado da sintomatologia, a podridão alcança o colo da planta, podendo ser visível o enegrecimento dos tecidos internos do caule (Figura 2) (TREMACOLDI, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).



Figura 2. Plantas de pimenteira-do-reino infectadas por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. (A) Sintomas de amarelecimento, desfolha, necrose das folhas e apodrecimento do colo. Fonte: TREMACOLDI, 2010. (B) Morte da planta após três anos do início dos sintomas na parte aérea. Fonte: NASCIMENTO, 2009.

Ainda não existem cultivares resistentes a fusariose, no entanto, várias medidas têm sido adotadas para tentar controlar a doença. Segundo Tremacoldi (2011), o uso de folhas de nim trituradas e incorporadas ao solo pode controlar em 100% a fusariose de pimenteira-do-reino. Além disso, foi verificado que a casca de caranguejo, adicionada ao solo, pode auxiliar na redução de incidência da fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino (BENCHIMOL et al., 2005).

Outras medidas de controle envolvem a adubação química balanceada, drenagem do solo muito argiloso e irrigação no período de seca, visando deixar a planta menos predispostas à doença. Além disso, deve-se evitar capinas drásticas nos plantios e manter uma cobertura vegetal nas entrelinhas (DUARTE et al., 2002; BENCHIMOL et al., 2000). Porém, essas medidas de controle são pouco eficientes e muito onerosas. Para Serrano et al., (2012) devem ser adotadas medidas preventivas durante a condução dos pimentais, por meio da produção e plantio de mudas saudáveis.

1.1.6. Melhoramento genético da pimenteira-do-reino visando resistência à fusariose

O melhoramento genético da pimenteira-do-reino tem como objetivo o desenvolvimento de cultivares mais produtivas e resistentes a doenças, como a fusariose, para reduzir ou evitar os prejuízos econômicos causados por essa enfermidade. Porém, a variabilidade genética estreita das cultivares no Brasil e as dificuldades encontradas para se introduzir materiais do centro de origem dificultam a obtenção de fontes de resistência. Desta forma, alguns trabalhos foram desenvolvidos buscando identificar espécies do gênero *Piper*, nativas da Amazônia, com resistência à doença (POLTRONIERI et al., 2000).

Albuquerque et al. (2001), testaram a resistência de oito espécies nativas da Amazônia: *P. aduncum* L., *P. arboreum* Aublet, *P. carniconnectivum* C. DC., *P. colubrinum* Link., *P. hispidinervium* C. DC., *P. hispidum* S.W., *P. hostmannianum* (Miq) e *P. tuberculatum* Jacq. Os resultados mostraram que absolutamente nenhuma das plantas das nove espécies nativas, cultivadas em solo infestado com isolado do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* apresentou algum sintoma da doença. Segundo estes autores, essas espécies nativas poderiam ser utilizadas em cruzamentos com cultivares de *Piper nigrum* L., visando obter híbridos interespecíficos com as características de resistência ao patógeno.

O programa atual de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental está testando as combinações da cultivar Bragantina de *P. nigrum* com espécies de *Piper* nativas para avaliar a compatibilidade e a viabilidade de produção de híbridos férteis. Simultaneamente, também visam obter híbridos intraespecíficos através de polinizações controladas, entre genótipos da espécie *P. nigrum*, utilizando a Bragantina como progenitora, para obtenção de combinações que expressem caracteres produtivos superiores em relação ao vigor médio dos pais. Após a obtenção dos híbridos, serão necessárias algumas gerações de retrocruzamento com o progenitor de *P. nigrum* (Bragantina) para a obtenção de uma cultivar com boas características de produção e resistência ao *Fusarium* (LEMOS et al., 2011).

Poltronieri et al. (1997), efetuaram cruzamentos intraespecíficos em pimenteira-do-reino, visando explorar o vigor híbrido, aliado a níveis de tolerância à fusariose. Os híbridos obtidos foram submetidos à inoculação artificial com suspensão de esporos de *F. solani* f. sp. *piperis*. As avaliações foram realizadas semanalmente durante 12 meses, contando-se o número de plantas mortas. Os resultados mostraram que menos de 5% das plantas conseguiram sobreviver, sendo consideradas como escapes. Os autores concluíram que esses híbridos não apresentaram tolerância à fusariose.

Nambiar et al., (1978) conseguiram desenvolver o primeiro híbrido de pimenteira-do-reino através da combinação entre as cultivares “Uthirankotta” x “Taliparamba-1”. O cruzamento resultou na produção de 69 sementes, das quais 14 plantas F₁ sobreviveram e uma delas apresentou comprimento médio de espiga de 10 cm, com 82 flores por espiga e 82% de frutificação. Este híbrido, denominado de Panniyur-I, foi multiplicado e apresentou desempenho superior em todas as características quando comparado as cultivares locais.

O primeiro híbrido interespecífico de pimenteira-do-reino com resistência parcial a podridão do pé, causada por *Phytophthora* sp., foi desenvolvido pela primeira vez através do cruzamento de *P. nigrum* (Panniyur-5) com a espécie selvagem *Piper colubrinum*. Foram observadas características anatômicas e morfológicas distintas, com um grande número de espigas longas. As avaliações moleculares revelaram a introgressão parcial de genes responsáveis pela resistência a podridão das raízes. Este híbrido interespecífico foi denominado de cultura P5PC-1 e, apesar de ser parcialmente infértil, representa um grande avanço para desenvolvimento de cultivares resistentes de *P. nigrum* a partir da espécie selvagem *P. colubrinum* (VANAJA et al., 2008).

Alternativamente ao melhoramento genético, estudos com porta-enxertos resistente ao fusário foram realizados. Albuquerque (1968) selecionou a espécie *P. colubrinum* para ser utilizada como porta-enxerto, por ser compatível com a pimenteira-do-reino e altamente resistente ao *F. solani* f. sp. *piperis*. Inicialmente, as plantas enxertadas apresentaram bom desenvolvimento vegetativo e boa produção, porém apresentaram incompatibilidade tardia, com morte das plantas.

Em outros experimentos com mudas de *P. nigrum*, *P. peltatum* e *P. colubrinum*, testou-se a resistência dessas espécies, inoculando na região do caule, esporos de *Phytophthora palmivora* e *F. solani* f. sp. *piperis*. Foi constatado que apenas as espécies *P. peltatum* e *P. colubrinum* não desenvolveram a doença, podendo ser usadas como fontes de resistências a esses patógenos (ALBUQUERQUE, 1966).

Os métodos de melhoramento convencionais da pimenteira-do-reino podem ser complementados com técnicas biotecnológicas. A obtenção de híbridos somáticos a partir do isolamento e fusão de protoplastos oriundos de *P. nigrum* e *P. columbrinum*, ou outros materiais que apresentem boa produtividade e resistência a doenças, é um aspecto importante para o melhoramento genético da cultura (BARBOSA, 2002). No entanto, a obtenção da resistência da pimenta-do-reino à fusariose utilizando essas técnicas ainda necessita de estudos mais abrangentes no âmbito da transgenia.

Segundo Lemos et al., (2011) o conhecimento citogenético, as técnicas *in vitro*, marcadores moleculares e a identificação de genes se constituem em ferramentas valiosas para a solução deste problema, seja pela propagação rápida de plantas livres de patógenos e clonagem de material elite, resgate de embrião resultante de cruzamentos intra e interespecíficos, geração de variabilidade genética por mutações induzidas, seleção *in vitro* e/ou produção de plantas transgênicas.

1.1.7. Seleção *in vitro*

As dificuldades encontradas no melhoramento convencional desta espécie fazem da seleção *in vitro* uma alternativa na utilização de biotecnologias como ferramentas para auxiliar em programas de melhoramento genético. Essa técnica pode ser eficiente para a obtenção de plantas resistentes a doenças quando utilizado o filtrado de cultura como agente seletivo. Segundo Svabová e Lebeda (2011), as toxinas presentes no filtrado de culturas são capazes de produzir sintomas da doença semelhantes aos observados em campo e, desta forma, podem ser usadas para a seleção de plantas resistentes a patógenos.

A seleção *in vitro* também pode ser vantajosa para plantas em que a seleção para resistência em condições de campo ou casa de vegetação é dificultada por condições climáticas ou por aspetos ligados ao patógeno (FLORES et al., 2008). Segundo Predieri (2001), as flutuações naturais da quantidade de inóculo e as condições climáticas que influenciam na dispersão do patógeno, infecção, desenvolvimento e expressão da doença são fatores que reduzem bastante a eficiência da seleção *in vivo*, além de demandar muito tempo.

O método de seleção *in vitro* utiliza uma combinação de vários órgãos de plantas ou um explante *in vitro* com diferentes tipos de agentes de seleção que podem (em condições ideais) desencadear reações semelhantes de planta em respostas ao agente patogênico. Quando submetido ao adequado agente seletivo, órgãos ou tecidos que sobrevivem a pressão de seleção são fontes potenciais de tolerância ou resistência. A diferença entre linhagens tolerantes ou resistentes selecionadas *in vitro* e o material vegetal original podem ter origem a partir de variação somaclonal ou mutagênese induzida (SVABOVÁ e LEBEDA, 2011).

Lemos (2003) afirma que é possível o melhoramento genético da pimenteira-do-reino para resistência à fusariose por meio da mutagênese associada à tecnologia *in vitro*. Em bananeira (MATSUMOTO et al., 1999), abacaxizeiro (BORRAS et al., 2001) e soja (JIN et

al., 1996) submetidas ao tratamento mutagênico, a seleção *in vitro* com filtrados fúngicos permitiu a obtenção de novos fenótipos tolerantes ao *Fusarium*.

Para Predieri (2001), a possibilidade de executar uma seleção *in vitro* depende, acima de tudo, da disponibilidade de um sistema eficiente de regeneração e propagação clonal, juntamente com um agente seletivo eficiente. Segundo Pontaroli e Camadro (2001), a utilização de toxinas como agente seletivo permite selecionar plantas resistentes a patógenos em estágios iniciais de desenvolvimento. Este aspecto traz vantagens por acelerar o processo de seleção.

Fungos do gênero *Fusarium* produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos em filtrado de cultura (LEMOS, 2003). Existem vários trabalhos em que seleção *in vitro*, utilizando-se o filtrado de cultura de diferentes espécies desse gênero, consistiu em um método eficiente para a seleção de plantas resistentes ao patógeno, como: maracujazeiro-amarelo (FLORES, 2008), bananeira (MATSUMOTO et al., 2010) e soja (HAIKAL et al., 2008).

Plantas de quatro genótipos de ervilhas, que apresentam diferentes graus de resistência ao *Fusarium solani*, foram inoculadas em cultura de filtrado desse patógeno para comparar seus diferentes padrões de reações. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os genótipos na redução do percentual de sobrevivência, comprimento e peso de raízes. Desta forma, a seleção *in vitro* permitiu identificar aquelas plantas com o mais alto grau de resistência e o mais alto nível de suscetibilidade aos metabólitos contidos na cultura de filtrado (SVÁBOVÁ et al., 2011).

Flores et al. (2012) submeteram plantas de maracujazeiro-amarelo a seleção *in vitro*, utilizando filtrado da cultura de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* como agente seletivo. As plantas apresentaram reduções no número, comprimento, massa fresca e massa seca das raízes em função das concentrações do filtrado fúngico adicionadas ao meio de cultura. Foi possível identificar os diferentes níveis de sensibilidade, assim como aqueles genótipos resistentes ao filtrado fúngico. Os autores verificaram que esta técnica foi viável para acelerar o melhoramento do maracujazeiro para a resistência à murcha de *Fusarium*.

Plântulas de pepino das cultivares Aodai e Caipira foram cultivadas *in vitro* com filtrado de cultura de *Fusarium oxysporum*. As reações de murchamento das plântulas frente à ação do filtrado evidenciaram que as cultivares Aodai e Caipira se comportaram como suscetível e resistente, respectivamente. Estes resultados sugerem que os compostos tóxicos extracelulares produzidos pelo patógeno podem ser utilizados na seleção de cultivares resistentes (MELO e PICCININ, 1999).

Brisset et al. (1988) observaram que a inoculação de *Erwinia amylovora* em plantas de pêra *in vitro*, causou superexpressão da susceptibilidade ao patógeno, quando comparada com respostas de campo, permitindo assim apenas a seleção de indivíduos com altos níveis de resistência. Donovan et al. (1994), comparando métodos de seleção *in vitro* e seleção *in vivo* de genótipos de macieira (*Malus domestica*) resistentes a *Erwinia amylovora*, observaram que as plantas em condições *in vitro* sofrem maior pressão de seleção.

O efeito do agente seletivo (cultura do patógeno, cultura de filtrado, fitotoxinas, etc) deve ser demonstrado em experimento preliminar, onde uma gama de concentrações adequadas permita comparar a toxicidade sobre os germoplasma suscetível e tolerante ou resistente. O resultado de tais experimentos é determinar a dosagem precisa do agente seletivo, que é ótima para seleção de material resistente, eliminando ou reduzindo drasticamente o crescimento do material susceptível (SVÁBOVÁ et al., 2011).

Hidalgo et al., (1998) comprovaram o efeito fitotóxico do filtrado da cultura de *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose em abacaxizeiro, em cultivares resistentes e suscetíveis de abacaxizeiro tanto em folhas (concentração do filtrado a 80% v/v) quanto em calos cultivados *in vitro* (10 a 30% v/v). Resultado semelhante foi observado por Borrás et al. (2001) ao testarem diferentes concentrações do filtrado, cujos efeitos em folhas (acima de 50% do filtrado fúngico v/v) possibilitaram a separação entre as cultivares suscetíveis das resistentes.

As variações quanto à suscetibilidade e resistência *in vitro* as toxinas de *Fusarium* se devem principalmente a variedade ou genótipo, tanto quanto observado ao ataque do patógeno sob condições de campo. Essas variações refletem os mecanismos de resistência que operam a vários níveis, desde a prevenção contra a invasão e expansão do fungo à tolerância ou degradação à toxina (MCLEAN, 1996).

1.1.8. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta com alto potencial para aplicação dentro do programa de melhoramento vegetal. Essa técnica permite a multiplicação de plantas livres de patógenos e de material elite, em grande escala, em curto espaço de tempo e em uma área reduzida (ANDRADE, 2002). Segundo Lameira et al., (1996) a multiplicação *in vitro* de um explante possibilita a produção de até 15000 plantas por ano. Isso permite que os

melhoristas possam introduzir nova cultivares mais rapidamente do que mediante a utilização da propagação convencional (SILVA, 2011).

Qualquer parte separada da planta destinada ao cultivo *in vitro* denomina-se de explante. Pode ser um fragmento de folha, de raiz, de caule ou de qualquer tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (BARRUETO CID, 2010). A regeneração é fundamental na capacidade de proliferação das células vegetais e organização em tecidos e, eventualmente, em plantas completas. Essa capacidade é denominada totipotência, que consiste no potencial de uma célula para se regenerar como uma planta completa (ANDRADE, 2002). Porém, nem todos os explantes reagem da mesma forma a uma determinada condição *in vitro*, devido aos variados requerimentos nutricional, hormonal e outros fatores.

Os meios nutritivos e a sua composição fornecem as condições necessárias para a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas, as quais têm o caráter clonal embutido em sua natureza. Além do meio nutritivo, vários fatores estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração, como: tipo de meio básico de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, tipo de explante etc. Porém, se o meio nutritivo não for adequado em virtude de alguns de seus nutrientes, a obtenção de plântulas clones pode falhar (ZHANG et al., 2003).

Em trabalhos realizados por Matheus e Rao (1984) com pimenteira-do-reino, os explantes provenientes de segmentos de hipocótilo, gemas axilares e ápice caulinar, permitiram a formação de calos em meio de cultura contendo uma larga combinação de auxina-citocinina. Além disso, os ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* diferenciaram múltiplas brotações em meio MS contendo os reguladores de crescimento ácido 3-indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) (1 mg L^{-1} de cada) e enraizaram em meio com a metade da concentração de sais MS com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA).

Khoon e Talib (1985) realizaram enraizamento *in vitro* de brotos de pimenteira-do-reino utilizando duas substâncias fenólicas (floroglucinol ou floridzina) e o ANA. Os resultados mostraram que não houve influencia dessas substancia fenólicas no enraizamento, enquanto que o ANA induziu maior número de comprimento de raízes em comparação com o meio de cultura sem ANA.

Santos (2012) avaliou a multiplicação e enraizamento *in vitro* de quatro cultivares de pimenteira-do-reino. Os resultados mostraram, para todas as cultivares, que a combinação dos reguladores de crescimento Tidiazuron (TDZ) e BAP induziu o superbrotamento, porém, com qualidade comprometida. O meio MS suplementado apenas com BAP foi mais eficiente para

obtenção de maior número de gemas. No enraizamento *in vitro*, a dose de sacarose de 30 g L⁻¹ proporcionou boa formação de raízes com aspectos desejáveis para a aclimatização.

Moura et al., (2008) testou diferentes concentrações de BAP e carvão ativado adicionados ao meio de cultura na micropropagação da pimenteira-do-reino, cultivar Bragantina. Este autor verificou que a menor concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, na ausência de carvão ativado, foi mais eficiente na indução de brotações e formação de explantes.

Assim, a cultura de tecidos mostra-se uma técnica de fundamental importância, tanto no melhoramento genético de plantas, como na obtenção de plantas saudáveis, sendo de grande interesse na obtenção em larga escala de mudas geneticamente idênticas que darão origem à plantas com características superiores. No entanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é crucial, pois esta é a maior limitação na aplicação da moderna biotecnologia para melhoramento vegetal (BARBOSA, 2002).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C. de Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino. **IPEAN**. p 44. (IPEAN-Circular, 5), 1961.
- ALBUQUERQUE, F. C. Podridão das raízes da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) causada por *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. Anais do Instituto de Micologia 3: p 468-491. 1966.
- ALBUQUERQUE, F. C. *Piper columbrinum* Link. porta-enxerto para *Piper nigrum* L. resistente às enfermidades causadas por *Phytophthora palmivora* Biutl. e *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. 1968.
- ALBUQUERQUE, F. C.; CONDURÚ, J. M. P. Cultura da pimenta do reino na região Amazônica. Belém: **IPEAN**, 149p. 1971.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. Estádio atual do conhecimento do melhoramento da cultura da pimenta-do-reino no trópico úmido brasileiro. In : SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1984, Belém. Anais. Belém: Embrapa-CPATU, p. 359-372. 1986.
- ALBUQUERQUE, F. C.; VELOSO, C. A. C.; DUARTE, M. L. R.; OSVALDO, R. Pimenta-do-reino: recomendações básicas para seu cultivo. EMBPAPA-UEPAE. Documentos, Belém, n. 12, 40 p. 1989.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; NUNES, A. M. L.; STEI, R. L. B.; POLTRONIERI, M. C.; OLIVEIRA, R. P. Comportamento de germoplasma de pimenta-do-reino em relação à produtividade e resistência a doenças em regiões da Amazônia brasileira. EMBRAPA, Belém, PA. Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido. CPATU. Documentos, 85. p.305. 1996.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de Piperaceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica** v.31. p. 341-348, 2001.
- ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F. C. de.; POLTRONIERI, M. C.; TULMANN-NETO, A. **Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) através da irradiação gama**. In: Seminário internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu, 1., Belém, 1996. Anais. Belém, Embrapa Amazônia Oriental, JICA, p. 237-243, 1997.
- ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, (Documentos, 58), 16p. 2002.
- AGAREZ, F. V.; PEREIRA, C.; RIZZINI, C. M. **Botânica Angiosperma**. 2ª edição. Rio de Janeiro. Editora: Âmbito Cultural, 1994.
- BARBOSA, F. B. C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.19, n. 3, p.429-449, set./dez. 2002.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa informações tecnológicas, Brasília, DF, 303 p. 2010.

BENCHIMOL, R. L.; YING CHU, E.; YUITIMOTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino: Sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.35, n.7, p.1343-1348, jul. 2000.

BENCHIMOL, R. L.; SUTTON, J. C.; DIAS-FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de Fusariose e na promoção do crescimento de mudas de Pimenteira-do-Reino. **Fitopatologia Brasileira**. v. 2 n. 31, abr. 2005.

BENITEZ, N. P.; LEÓN, E. M. M.; STASHENKO, E. E. Essential oil composition from two species of piperaceae family grown in Colombia. **Journal of Chromatographic Science**, Vol. 47, p. 804 – 807. October, 2009.

BORRÁS, O.; SANTOS, R.; MATOS, A. P.; CABRAL, R. S.; ARZOLA, M. A first attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariose disease. **Plant Breeding**. n.120: p. 435-438, 2001.

BRISSET, M. N., PAULIN, J. P.; DURON, M. Feasibility of rating fire blight susceptibility of pear cultivars (*Pyrus communis*) on *in vitro* microcuttings. **Agronomie**, v.8, p.707-710, 1988.

BRITO, W. U. **Isolamento, caracterização e expressão em sistema bacteriano de um gene que codifica uma proteína transportadora de lipídeos de *Piper nigrum* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará - UFPA. Belém - PA. 59p. 2012.

DIAS, A. G. O cultivo da Pimenteira-do-reino. Vitória-ES, S.V.L 300p.: il, 2006.

DONOVAN, A. M.; MORGAN, R.; VALOMBRA-PIAGNANI, C.; RIDOUT, M. S.; JAMES, D. J.; GARRETT, C. M. E. Assessment of somaclonal variation in apple. I. Resistance to the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. **Journal of Horticultural Science**, v.69, p.105-113, 1994.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; CHU, E. Y.; BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S. Manejo integrado da fusariose e da murcha amarela da pimenteira-do-reino In: Poltronieri, L. S.; Trindade, D. R. (ed.). Manejo integrado das principais doenças de cultivos amazônicos. Belém: Embrapa Amazônia Oriental p, 1-16, 2002.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **FAOSTAT**, 2012. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/download>. Acesso em: 12/01/2014.

FLORES, P. S. **Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e ácido fusárico na seleção *in vitro* de maracujazeiro-amarelo**. Tese de doutorado. Viçosa - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 88p. 2008.

FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. v. 108, p. 37–45, 2012.

GORDO, S. M. C.; PINHEIRO, D. G.; MOREIRA, E. C. O.; RODRIGUES, S. M.; POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F.; SILVA, I. T.; RAMOS, R. T. J.; SILVA, A.; SCHNEIDER, H.; SILVA JUNIOR, W. A.; SAMPAIO, I.; SYLVAIN DARNET, S. High-throughput sequencing of black pepper root transcriptome. **BMC Plant Biology**. p. 2- 9. V. 12, n. 168. 2012.

HAIKAL, N. Z. Effects of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. **Journal of Applied science Research**, v.4, n.1, p.48-52, 2008.

HIDALGO, O. B.; SANTOS, R.; MATOS, A. P.; CABRAL, R. S.; TUSSEL, R. T.; ARZOLA, M.; SANTOS, R.; PEREZ, M. C. Phytotoxic effect of culture filtrate from *Fusarium subglutinans* the causal agent of fusariose of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Euphytica** 104: 73-77. 1998.

HOLLMANN, P. J; LOHBRUNNER, G. K.; SHAMOUN, S. F.; LEE, S. P. Establishment and characterization of Rubus tissue culture systems for in vitro bioassays against phytotoxins from Rubus fungal pathogens. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 68: 43-48. 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Sistema de recuperação automática – SIDRA**. 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=1&i=P>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2014.

IPC - INTERNATIONAL PEPPER COMMUNITY. **Pepper statistics 2001-2012**. 2012. Disponível em: <http://www.ipcnet.org/n/statpdf/index.php?p=swps>. Acesso em: 05 junho 2012.

JIN, H.; HARTMAN, G. L.; HUANG, Y. H.; NICKELL, C. D.; WIDHOLM, J. M. Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. **Phytopathology** 86: 714-718. 1996.

KHOON, C. B.; TALIB, S. S.; Effects of naphthalene acetic acid and two phenolic substances on rooting of pepper shoots cultures *in vitro*. **MADRI Research Bulletin**, v.13, n 1, p. 108-110, 1985.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 623 p. 2005.

KRISHNAMURTHY, K. S.; KANDIANNAN, K.; SIBIN. C.; CHEMPAKAM, B.; ANKEGOWDA, S. J. Trends in climate and productivity and relationship between climatic variables and productivity in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Indian Journal of Agricultural Sciences** 81 (8): 729–33, August 2011.

LAMEIRA, O. A.; DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F. de. **Micropropagação, cultura de embrião e regeneração de plantas *in vitro* de pimenta-do-reino**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, (Projeto de Pesquisa), 1996.

LEE, S. A.; HONG, S. S.; HAN, X. H.; HWANG, J. S.; OH, G. J.; LEE, K. S.; LEE, M. K.; HWANG, B. Y.; RO, S. J. Piperine from the fruits of *Piper longum* with inhibitory effect on

monoamine oxidase and antidepressant-like activity. **Chem. Pharm. Bull.** Pharmaceutical Society of Japan, v. 53 n. 7. p. 832-835, July, 2005.

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

LEMOS, O. F.; NETO, A. T.; ALBINO, J. C.; POLTRONIERI, M. C.; ANDO, A. *In vitro* and *in vivo* selection of black pepper (*Piper nigrum*) mutants tolerant to Fusariosis. **Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases, IAEA**. Vienna, n. 1, p. 267-284. May, 2010.

LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; MENEZES, I. C. de M.; MONDIN, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 375), 45 p. 2011.

MATHEWS, M. H.; RAO, P. S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Current Science**, v. 53, n.4, p. 183-186, 1984.

MATSUMOTO, K.; SOUZA, L. A. C.; BARBOSA, M. L. *In vitro* selection for *Fusarium* wilt resistance in banana. I: Co-cultivation technique to produce culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*. **Fruits**. v.54, p.97-102, 1999.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUZA, L.A.C.; TEIXEIRA, J.B.; *In vitro* selection for resistance to *Fusarium* wilt in Banana. **Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases, IAEA**. Vienna, n. 1, p. 101-113. May, 2010.

MCLEAN, M. The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: an update since . **Mycopathologia** 133: 163-179. 1996.

MENEZES, I. C. **Caracterização genética de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) utilizando marcadores moleculares**. Tese de doutorado. Belém - Universidade Federal do Pará. 144p. 2011.

MELO, I. S.; PICCININ, E.; Toxic metabolites from culture filtrate of *fusarium oxysporum* and its effects on cucumber cells and plantlets. **Revista de Microbiologia Jaguariúna**. SP. n. 30, p. 104-106, 1999.

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

NAMBIAR, P. K. V.; PILLAY, V. S.; SASIKUMARAN, S.; CHANDY, K. C. Pepper research at panniur: a resume. **Journal of Plantation Crops**, v. 6, n. 1, p. 4-11. 1978.

NASCIMENTO, S. B. ***Piper tuberculatum* Jacq.: Prospecção de genes e bactérias endofíticas com potencial uso em melhoramento genético**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 90p, 2009.

OLIVEIRA, B. S.; NETO, A. P. D.; SILVA, M. B. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. Viçosa-MG, v.1, n.1., p.84-88, Julho. 2011.

POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, M. C.; ROCHA, N. O. G. **Incidência de doenças em pimenta longa (*Piper hispidinervium*) nos estados do Acre e Pará. *Fitopatologia Brasileira* 22: p 345. 1997.**

POLTRONIERI, M. C.; ALBUQUERQUE, F. C. de; OLIVEIRA, M. R. C. de. Retrospectivas, avanços e perspectivas no melhoramento genético de pimenta-do-reino visando resistência à fusariose. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 25, p. 246-251, 2000.

PONTAROLI, A. C. & CAMADRO, E. L. Increasing resistance to *Fusarium* crown and root rot in asparagus by gametophyte selection. ***Euphytica*** v.122, p.343–350, 2001.

PREDIERI, S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.64, p.185-210, 2001.

SILVA, R. S.; SOUZA, C. R. B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. ***Acta Amazonica***, Manaus-AM, v. 39, p. 255-260, 2009.

SILVA, B. S. O.; DRUMOND NETO, A. P.; SILVA, M. B. da. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Viçosa, v.1, n.1, p.84-88, julho. 2011.

SANTOS, L. R. R. **Ontogênese, multiplicação, enraizamento in vitro e aclimatização de quatro cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA. Belém - PA. 83p. 2012.

SHAHNAZI, S.; MEON, S.; VADAMALAI, G.; AHMAD, K.; NEJAT, N. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. ***J Gen Plant Pathol.*** v. 78. p. 160–169, April, 2012.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae) ***Plant Systematics and Evolution*** n. 275 p. 9-30, 2008.

SOUZA, C. R. B.; BRÍGIDA, A. B. S.; SANTOS R. C.; COSTA C. N. M.; DARNET, S. H.; HARADA, M. L. Identification of sequences expressed during compatible black pepper-*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. ***Acta Physiologiae Plantarum***, Kraków. V. 33, p. 2553-2560, May. 2011.

SVÁBOVÁ, L.; LEBEDA, A.; KITNER, M.; SEDLÁROVÁ, M.; PETRIVALSKÝ, M.; DOSTÁLOVÁ, R.; ONDREJ, M.; HORÁČEK, J.; SMYKALOVÁ, I.; GRIGA, M.; Comparison of the effects of *fusarium solani* filtrates in vitro and in vivo on the

morphological characteristics and peroxidase activity in pea cultivars with different susceptibility. **Journal of Plant Pathology**. n. 1, p. 19-30, 2011.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Belém, PA - Embrapa Amazônia Oriental, 21 ed., 23 pag. Agosto, 2010.

TREMACOLDI, C. R. **Tecnologia para o controle da podridão de raízes em mudas de pimenteira-do-reino**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado técnico, 226), 4p. 2011.

VANAJA, T.; NEEMA, V. P.; MAMMOOTTY, K. P.; RAJESHKUMAR, R. Development of a promising interspecific hybrid in black pepper (*Piper nigrum* L.) for Phytophthora foot rot resistance. **Euphytica**. n. 161. p. 437-445. October, 2008.

ZHANG, L.; XU, T.; SUN, X.; ZHANG, H.; TANG, K. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In Vitro-Plant**, New York, v. 39, p. 459-462. 2003.

2. ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA E NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDAS AO FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

2.1. INTRODUÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pertence ao gênero *Piper*, que possui cerca de 2000 espécies encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (MENEZES et al., 2009). No Brasil, 450 destas espécies crescem de forma nativa e são bastante utilizadas na medicina popular e na identificação de óleos essenciais. Esses óleos possuem diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (KHAN et al., 2010; ZARAI et al., 2013; SINGH et al., 2013).

A pimenteira-do-reino é uma planta perene e trepadeira de grande produtividade e a condimentar mais valorizada no mundo, com grande importância econômica dentro da olericultura (MAGEVSKI et al., 2011). No entanto, a incidência de doenças como a fusariose tem causado a morte de milhares de pimenteiras, resultando em grandes perdas de produção e redução do ciclo produtivo desta cultura.

A fusariose ou podridão das raízes, causada pelo fungo *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*, anamorfo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (ALBUQUERQUE, 1961), é a doença fúngica mais importante da pimenteira-do-reino. Este fungo, habitante natural do solo, sobrevive tanto na planta quanto na matéria orgânica do solo. O patógeno pode infectar a pimenteira através do sistema radicular, causando o apodrecimento das raízes e das radículas, resultando no aparecimento dos sintomas reflexos na parte aérea como o amarelecimento e murcha das folhas (TREMACOLDI, 2010).

Atualmente, não existe controle químico eficaz e nem cultivares resistentes ao *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (BENCHIMOL et al., 2000). As dificuldades encontradas para o desenvolvimento de cultivares resistentes estão relacionadas à estreita variabilidade genética entre os genótipos existentes no Brasil e a inexpressividade da fusariose no centro de origem da cultura, o que dificulta a introdução de material genético para a obtenção de fonte de resistência (CARNAÚBA et al., 2007; SILVA e SOUZA, 2009; LEMOS et al., 2011). Logo, outros métodos devem ser utilizados visando ampliar a variabilidade genética.

Estudos com piperáceas nativas da Amazônia foram realizados, os quais identificaram algumas espécies com níveis satisfatórios de tolerância à fusariose, que podem ser usadas como fontes de resistência, entre elas a *Piper tuberculatum* Jacq. e a *Piper colubrinum* Link.

(ALBUQUERQUE et al., 2001). Contudo, os processos celulares e moleculares envolvidos neste mecanismo de resistência ainda são desconhecidos (SILVA e SOUZA, 2009).

Segundo Lemos (2003) a propagação rápida de plantas livres de patógenos e clonagem de material de elite, resgate de embriões de cruzamentos intraespecífico e interespecíficos, geração de variabilidade genética por mutações induzidas, produção de plantas transgênicas, análises genético-moleculares e a seleção *in vitro* são técnicas *in vitro* que podem servir como ferramentas valiosas para o melhoramento genético da pimenteira-do-reino.

A seleção *in vitro* para genótipos de *P. nigrum* utilizando o filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* como agente seletivo, pode ser uma ferramenta biotecnológica viável para acelerar o melhoramento genético da pimenteira-do-reino para resistentes e/ou tolerantes a fusariose. Existem vários trabalhos em que a seleção *in vitro* utilizando filtrado da cultura de fungos do gênero *Fusarium* consistiu em um método eficiente na seleção de plantas resistentes ao patógeno. Dentre as culturas selecionadas, citam-se: maracujazeiro-amarelo (FLORES, 2008), soja (HAIKAL et al., 2008) e bananeira (MATSUMOTO et al., 2010).

Flores et al., (2012) submeteram plantas de maracujazeiro-amarelo a seleção *in vitro*, utilizando filtrado da cultura de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* como agente seletivo. As plantas apresentaram reduções no número, comprimento, massa fresca e massa seca das raízes em função das concentrações do filtrado fúngico adicionadas ao meio de cultura. Foi possível identificar os diferentes níveis de sensibilidade, assim como aqueles genótipos resistentes ao filtrado fúngico. Os autores verificaram que esta técnica foi viável para acelerar o melhoramento do maracujazeiro para a resistência a murcha de *Fusarium*.

Apesar de não existirem cultivares de pimenteira-do-reino resistentes ao *F. solani* f. sp. *piperis*, os diferentes níveis de suscetibilidade ao patógeno ainda não foram demonstradas. Diante disso, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a suscetibilidade por meio da quantificação da magnitude das alterações na morfologia e no crescimento das plantas *in vitro* da cultivar Bragantina e do híbrido intra-específico (Apra x Guajarina) submetidas ao filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará. O material vegetal utilizado foi proveniente do cultivo *in vitro* do híbrido intraespecífico (Apra x Guajarina) e da cultivar Bragantina. O cultivo do fungo e o preparo do filtrado foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental.

2.2.1. Material Vegetal

O material vegetal foi obtido através do cultivo *in vitro* de brotos da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico na fase de enraizamento com seis semanas e no quinto subcultivo. A cultivar Bragantina foi proveniente do cultivo de meristemas enquanto o híbrido foi obtido a partir de sementes geradas do cruzamento interespecífico entre as cultivares Apra e Guajarina do Banco Ativo de Germoplasma – BAG da Embrapa Amazônia Oriental.

2.2.2. Multiplicação dos brotos a partir de segmentos nodais

Em câmara de fluxo laminar os brotos de Bragantina e do híbrido intraespecífico foram seccionadas com o auxílio de um bisturi para a obtenção dos explantes de segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm contendo uma gema axilar ou apical caulinar. Os explantes foram inoculados verticalmente com a secção proximal em contato com 40 ml de meio de cultura dentro de frascos com capacidade de 300 ml.

Para a indução e multiplicação de brotações foi utilizado o meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), (ANEXO C), suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) para o híbrido intra-específico e 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,2 mg L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) para a cultivar Bragantina (LEMOS, 2003). Além dos reguladores, o meio MS foi suplementado com 3% de sacarose e 0,2% de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 min sob pressão de 1,5 atm.

Os frascos contendo cinco explantes foram vedados com filme de PVC resinite e, mantidos durante seis semanas em sala de crescimento, em ambiente com fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 3°C.

2.2.3. Enraizamento *in vitro* dos brotos

Os brotos contendo duas ou três gemas e duas ou três folhas foram inoculados em frascos de vidro cilíndricos de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura constituído da metade das concentrações dos sais minerais MS (½ MS), 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas MS, 0,2% de phytigel e suplementado com 0,05 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) (MORAES et al., 2013). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 °C por 20 min sob pressão de 1,5 atm.

Os frascos contendo três ou quatro brotos foram vedados com filme de PVC e mantidos durante três semanas em sala de crescimento, em ambiente com fotoperíodo de 16 h com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 3°C.

Após o enraizamento *in vitro*, as plantas foram padronizadas com duas ou três folhas expandidas e quatro ou cinco raízes com o comprimento aproximado de 1,0 cm. Para induzir o alongamento, as plantas foram transferidas para meio básico MS, 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas MS, 0,2% de phytigel e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 min a 121°C. As plantas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 3°C durante uma semana.

2.2.4. Obtenção do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*

O isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* foi cedido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Bioma Amazônia do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Este isolado foi proveniente de plantas de pimenteiras-do-reino com os sintomas da fusariose do município de Baião, Pará.

O isolado foi cultivado durante uma semana em meio BSA (batata-sacarose-ágar) (ANEXO D). Em seguida, discos de 0,7 cm de diâmetro, contendo micélio e conídios do fungo, foram retirados das placas de Petri e transferidos para erlenmeyers contendo meio de cultura Czapek-Dox (ANEXO D), sendo um disco para cada 200 ml de meio. Após 28 dias incubados no escuro, à temperatura de 25 °C ± 2 foi realizada a filtração com o auxílio de uma dupla gaze esterilizada. O micélio do fungo foi descartado e o filtrado foi autoclavado por 20 min a 121°C e 1,5 atm (LEMOS, 2003). Em seguida, o filtrado fúngico foi armazenado em temperatura ambiente até o momento dos ensaios *in vitro* (Figura 3).

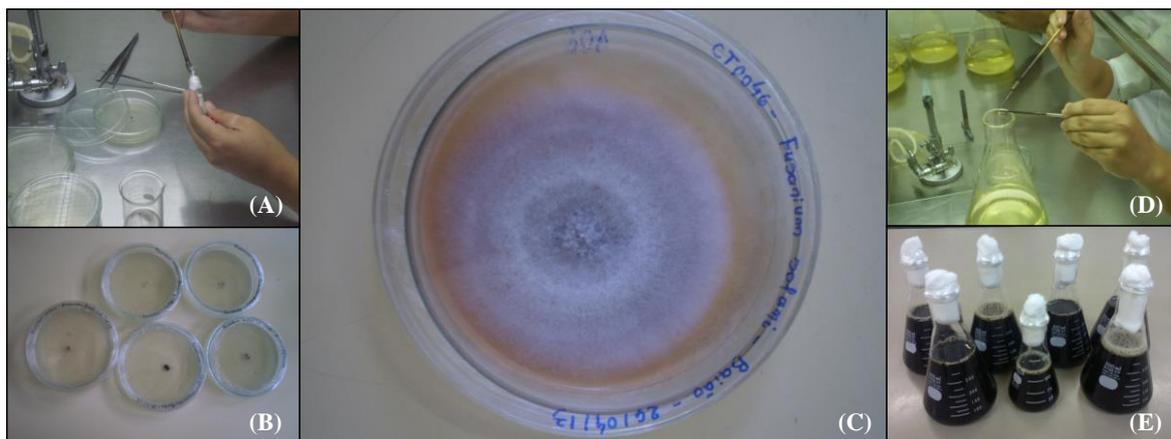


Figura 3. Cultivo e preparo do filtrado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*: (A e B) Inoculação e cultivo do isolado em meio de cultura BSA. (C) Aspecto do fungo após 15 dias de incubação. (D) Inoculação do fungo em meio de cultura Czapek-Dox. (E) Filtrado de cultura autoclavado após a filtragem e separação do micélio crescido durante 28 dias.

2.2.5. Avaliação da fitotoxicidade do filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* em plantas de *Piper nigrum* L.

As plantas foram inoculadas em tubos de vidro com capacidade de 56 mL, contendo 15 mL de meio de cultura básico com a metade da concentração dos sais MS (descrito no item 2.2.3) e suplementado com 0, 20, 30, 40 e 50 % (v/v) do filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*. O efeito fitotóxico do filtrado fúngico nas alterações na morfologia e no crescimento das raízes, caule e folhas foi avaliado 45 dias após a inoculação das plantas. Durante esse período, as plantas foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

Para cada genótipo foram utilizadas dez repetições, sendo cada repetição constituída por dois tubos, sendo uma planta em cada tubo. O delineamento experimental foi completamente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) para verificar o efeito médio do filtrado fúngico entre os dois genótipos, e análise de regressão para avaliar o comportamento dos dados em função das concentrações do filtrado fúngico.

2.2.5.1. Avaliação das alterações morfológicas

As alterações morfológicas foram realizadas através da quantificação do número de folhas totais e senescentes, número de gemas, comprimento dos entrenós, comprimento do caule, número de raízes e comprimento da maior raiz. O número de folhas foi obtido a partir

da contagem direta, considerando-se apenas as folhas completamente expandidas. As folhas que estavam desprendidas da planta e com aspecto necrótico foram contabilizadas como senescentes. Para a contagem direta de gemas e raízes foram consideradas apenas aquelas emitidas durante o período de avaliação (45 dias). O comprimento da maior raiz foi medido na região compreendida entre o coleto da planta e o ápice radicular mais distante. O comprimento do caule foi medido na região compreendida entre o coleto e a gema apical do caule. Para o entrenó foi considerado aquele de maior comprimento. Essas mensurações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (KINGTOOLS, precisão de 0,01 mm).

2.2.5.2. Avaliação das alterações no crescimento

As plantas foram seccionadas e separadas em raiz, caule e folhas para as respectivas pesagens de massa fresca (MF) e massa seca (MS). Após a pesagem, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel Kraft e levado para estufa de ventilação forçada a 65 °C, até atingirem massa seca constante. As folhas foram escaneadas com o auxílio de uma impressora multifuncional (EPSON) para a obtenção das imagens digitalizadas. Em seguida, essas imagens foram processadas no software QUANT v. 1.0.2 (VALE et al.,2001) para a determinação da área foliar total, área foliar sadia, área foliar clorótica e área foliar necrótica. Todas essas avaliações foram realizadas também no início do experimento (0 DIAS) para verificar o estado inicial das plantas. Desta forma, foi possível observar o efeito das concentrações do filtrado fúngico no crescimento das plantas.

2.2.5.3. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5, sendo dois genótipos e cinco doses do filtrado fúngico (0, 20, 30, 40 e 50% v/v). Para cada genótipo foram utilizadas dez repetições, sendo cada repetição constituída por duas plantas. Os dados quantitativos e qualitativos foram analisados com o auxílio do programa estatístico SAS v. 9. O comportamento dos dados em relação às doses do filtrado fúngico foram avaliados por meio da análise da regressão. No entanto, para a comparação da fitotoxicidade do filtrado fúngico entre os genótipos foi utilizada análise da variância (teste F).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* na morfologia e no crescimento das plantas de *Piper nigrum* L.

O efeito da fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* na morfologia e no crescimento das plantas de *P. nigrum* foi avaliado aos 45 dias de cultivo. Para os dois genótipos foram observadas alterações na morfologia e redução do crescimento das raízes e do caule a partir da concentração de 20% do filtrado fúngico. A fitotoxicidade foi aumentando à medida que se aumentou a concentração do filtrado fúngico para 30%, 40% e 50% em meio de cultura. Nas folhas, ocorreu o aparecimento de áreas cloróticas e necróticas, que iniciaram a partir da borda foliar e foram expandindo até o pecíolo, seguido de queda das mesmas. Desta forma, foram observadas reduções no número de folhas e na área foliar total, sendo mais agravantes na concentração de 50% do filtrado fúngico (Figura 4).



Figura 4. Alterações morfológicas nas plantas de *Piper nigrum* L. submetidas às doses (% v/v) do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*: (A) Plantas do híbrido intraespecífico, (B) Plantas da cultivar Bragantina.

2.3.2. Alterações no sistema radicular

O efeito fitotóxico do filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* na morfologia e no crescimento do sistema radicular dos genótipos de *P. nigrum* L. foi avaliado através do número, comprimento, massa seca e massa fresca das raízes. O híbrido apresentou as maiores médias para o número de raízes, comprimento de raiz e acúmulos de massa fresca e massa seca do sistema radicular (Tabela 2).

Tabela 1 Efeito da média das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre o sistema radicular dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura.

Genótipo	Raízes			
	Número	Comprimento (cm)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
Híbrido	14,38 a	28,77 a	306,86 a	43,48 a
Bragantina	11,30 b	20,06 b	221,23 b	28,23 b
CV(%)	17,91	20,00	12,45	16,09

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

As alterações morfológicas, resultantes da fitotoxicidade das concentrações de 0%, 20%, 30%, 40% e 50% do filtrado de cultura foram avaliadas através do número e comprimento das raízes. O comportamento das alterações apresentou uma curva de tendência do tipo quadrática decrescente ($P < 0,001$). O ajuste desta curva ($R^2 > 0,8$) permitiu identificar os maiores valores para o número e comprimento de raiz em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. No entanto, esses valores foram reduzindo à medida que se aumentou a concentração em ambos os genótipos, cujo comportamento foi semelhante, com maiores valores para o híbrido (Figura 5).

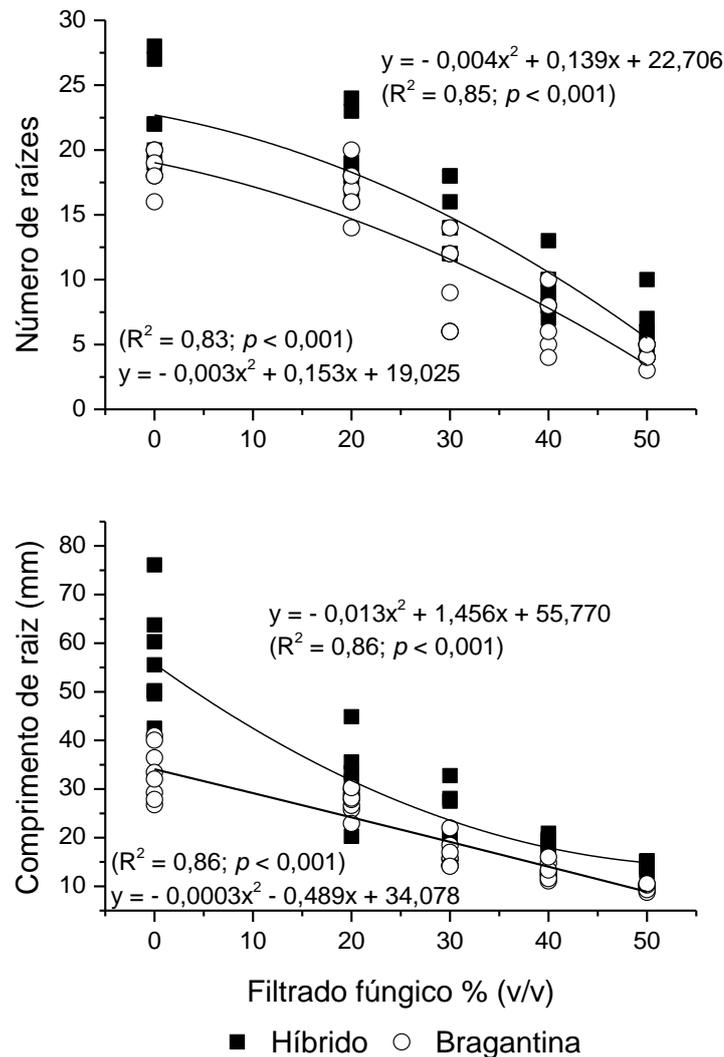


Figura 5. Alterações no número e comprimento das raízes dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidos às doses do filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura.

O híbrido apresentou o maior número médio de raízes (22,36) e maior comprimento médio de raiz (56 mm) em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. As reduções no número e comprimento das raízes foram observadas a partir da concentração de 20% sendo mais acentuada à medida que se aumentou as concentrações do filtrado fúngico. Foi possível estimar, a partir das equações das curvas (Figura 5), as concentrações de 33,95% e 17,88% do filtrado fúngico que reduziram em 50% o número de raízes e o comprimento da raiz, respectivamente. As maiores reduções foram de 88,37% para o número de raízes (6,25) e 94,08% para o comprimento de raiz (14,24 mm) na concentração de 50% do filtrado fúngico (Figura 6).

A cultivar Bragantina teve comportamento semelhante ao híbrido. Maiores números (18,50) e comprimento médio de raízes (18,50 mm) em meio de cultura na ausência do filtrado fúngico foram decrescendo a partir da concentração de 20% do filtrado fúngico. As equações das curvas (Figura 5) permitiram estimar as concentrações de 31,26% e 24,11% do filtrado fúngico que reduziram em 50% o número e o comprimento das raízes, respectivamente. A concentração de 50% do filtrado fúngico provocou reduções mais acentuadas de 96,61% para o número de raízes (4,25) e 99,15% para o comprimento da raiz (11,07 mm) (Figura 6).

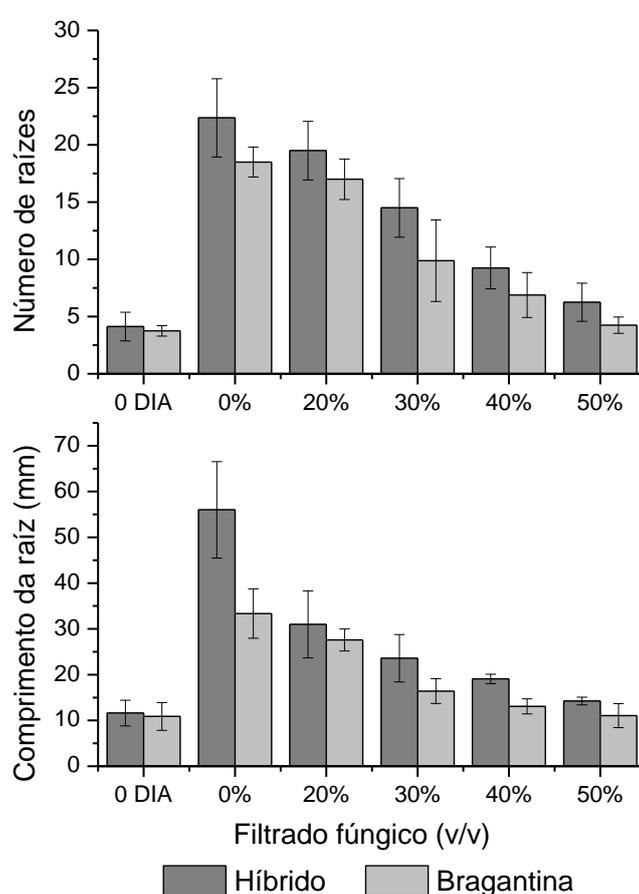


Figura 6. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* nas alterações do número e comprimento das raízes dos genótipos *in vitro* de *Piper nigrum* L. aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão.

As alterações no crescimento do sistema radicular, resultantes da fitotoxicidade das concentrações do filtrado fúngico de foram avaliadas através do acúmulo de massa fresca e massa seca nas raízes. O modelo matemático do segundo grau, expresso por uma curva quadrática decrescente foi significativo para descrever o comportamento do cultivo *in vitro* das plantas em relação às concentrações do filtrado fúngico ($P < 0,001$). A curva de regressão

ajustada aos dados ($R^2 > 0,75$) permitiu identificar os maiores valores para o acúmulo de massa fresca e massa seca em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico, e menores valores à medida que se aumentou a concentração do filtrado fúngico ao meio de cultura. Esse comportamento foi semelhante para os dois genótipos, com maiores valores para o híbrido (Figura 7).

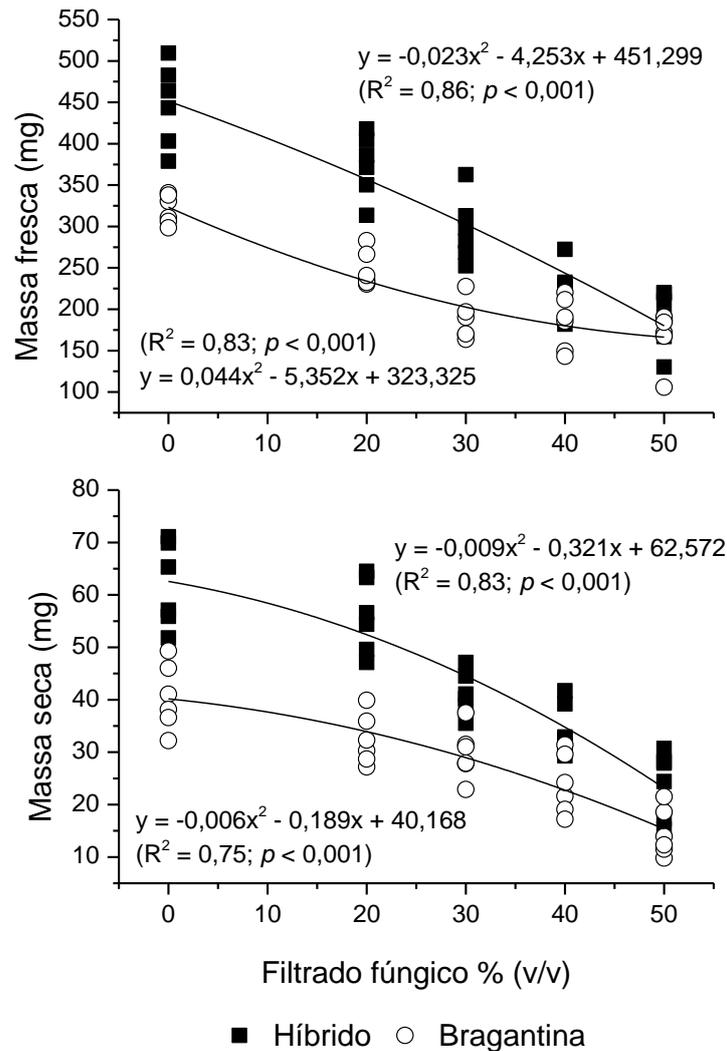


Figura 7. Alterações na massa fresca e massa seca do sistema radicular de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultivo.

Os maiores acúmulos de massa fresca (446,82 mg) e massa seca (61,85 mg) para o híbrido foram observados em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. Esses valores começaram a reduzir a partir da concentração de 20% do filtrado e, à medida que se aumentou as concentrações foram observados maiores reduções. As equações das curvas ajustadas aos dados (Figura 7) permitiram estimar as concentrações de 28,52% e 35,21% que reduziram em

50% o acúmulo de massa fresca e massa seca das raízes, respectivamente. As reduções mais acentuadas de 94,55% para a massa fresca (189,77 mg) e 85,45% para a massa seca (23,96), foram observadas na concentração de 50% do filtrado fúngico. Comportamento semelhante foi observado para a cultivar Bragantina, maiores valores de massa fresca (320,73 mg) e massa seca (40,55 mg) em meio de cultura ausente do filtrado fúngico. Ao adicionar o filtrado fúngico ao meio de cultura foi possível estimar as concentrações de 17,53% e 30,54% para reduzir em 50% o acúmulo de massa fresca e massa seca, respectivamente. As maiores reduções de 98,53% para a massa fresca (167,74 mg) e 99,37% para a massa seca (14,60 mg) foram observados na concentração de 50% do filtrado fúngico (Figura 8).

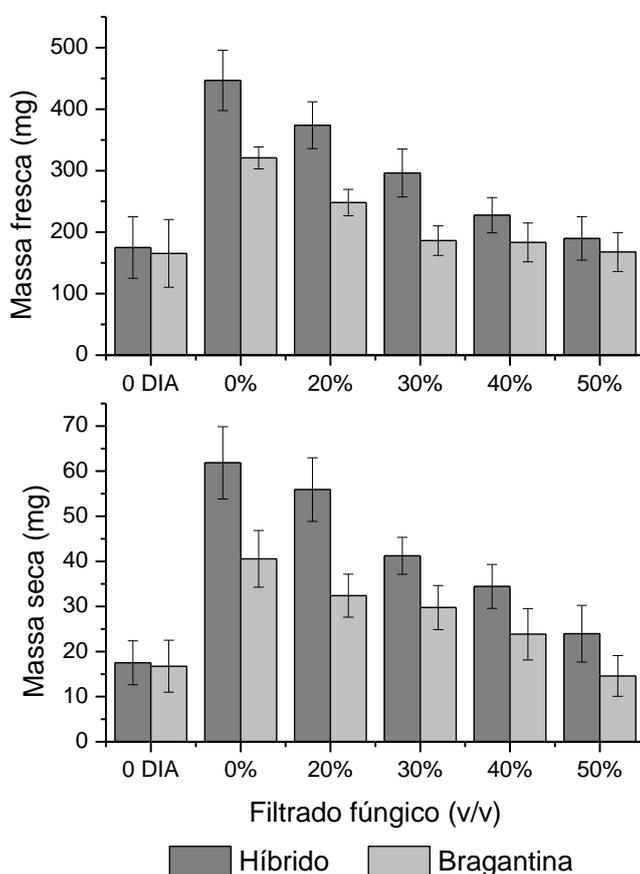


Figura 8. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* na massa fresca e massa seca das raízes dos genótipos *in vitro* de *Piper nigrum* L. aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão.

A concentração do filtrado fúngico no crescimento das raízes das plantas de *P. nigrum* para reduzir em 50% a massa seca das raízes do híbrido foi de 35,21%, enquanto para a cultivar Bragantina foi de 30,54% do filtrado fúngico. Além disso, concentração de 50% do

filtrado fúngico provocou uma maior redução (99,37%) na massa seca das raízes da Bragantina em relação à redução (85,45%) do híbrido.

2.3.3. Alterações no caule

As alterações na morfologia e no crescimento do caule resultantes da fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* foram realizadas através das mensurações do comprimento do caule e do entrenó, número de gemas, massa fresca e massa seca. A Bragantina apresentou os maiores comprimentos médios do caule e do entrenó (Tabela 3). No entanto, devido ao maior número de gemas, o híbrido apresentou maiores acúmulos de massa fresca e massa seca do caule (Tabela 3).

Tabela 2 Efeito da média das doses filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre o caule dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultivo.

Genótipo	Caule				
	Comprimento (mm)	Número de gemas	Comprimento do entrenó (mm)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
Híbrido	27,49 b	3,53 a	13,24 b	355,55 a	25,85 a
Bragantina	32,56 a	3,25 b	17,57 a	315,31 b	23,09 b
CV (%)	17,00	18,12	14,25	13,16	19,58

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

As concentrações (0%, 20%, 30%, 40% e 50% v/v) do filtrado fúngico de *F. solani* f. sp. *piperis* causaram alterações morfológicas no caule das plantas em diferentes magnitudes. Os dados de número de gemas, comprimento do caule e do entrenó em relação às concentrações do filtrado fúngico apresentaram o comportamento de uma curva quadrática decrescente ($P < 0,001$). As equações das curvas apresentaram $R^2 > 0,75$, sendo possível observar que mais de 70% das reduções no número de gemas, comprimentos do caule e do entrenó foram resultantes das concentrações do filtrado fúngico adicionados ao meio de cultura (Figura 9).

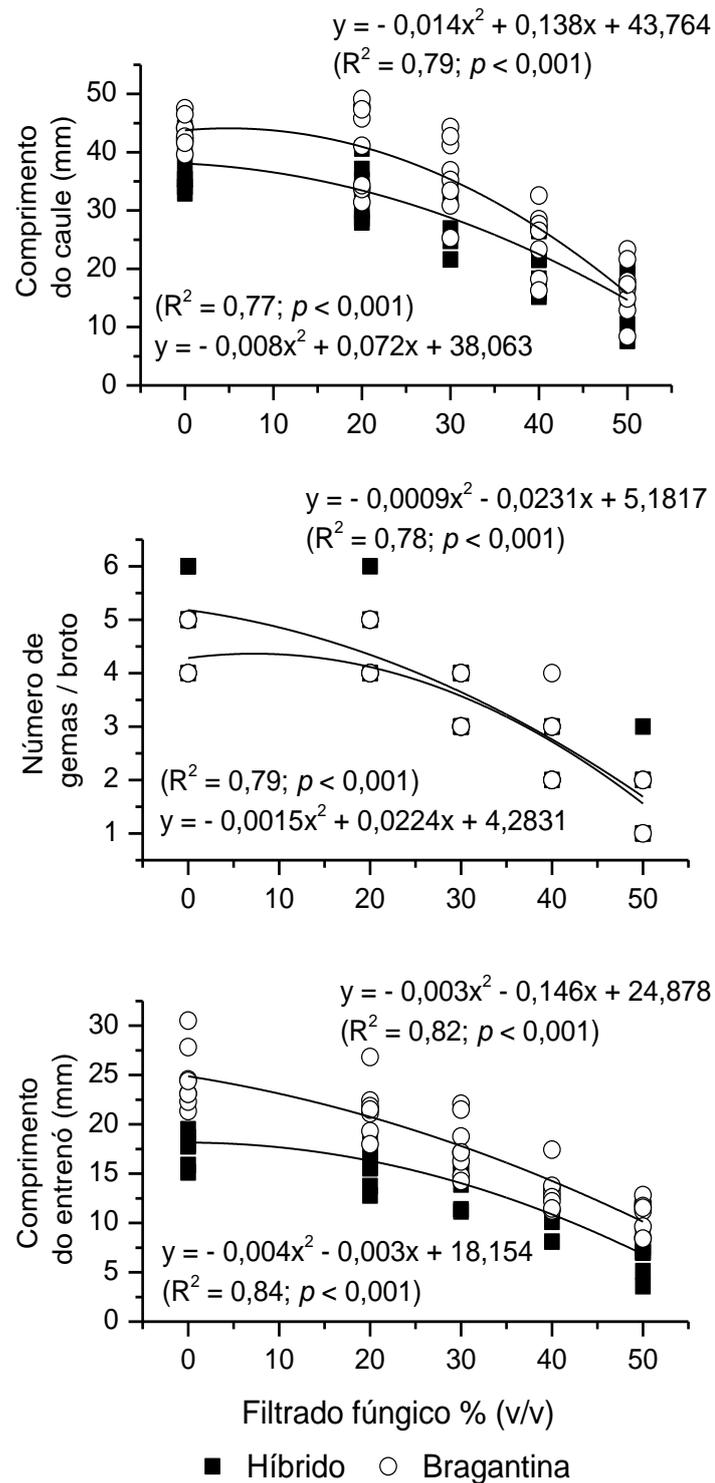


Figura 9. Alterações no desenvolvimento caulinar de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura.

O híbrido apresentou os maiores valores para o comprimento médio do caule (37,94 mm) e do entrenó (18,24 mm) e número médio de gemas (5,13) em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. A fitotoxicidade das concentrações do filtrado fúngico foi observado através da redução desses valores a partir de concentração de 20%. Foi observado através das equações das curvas (Figura 9), que ao aumentar essa concentração do filtrado fúngico para 35,43% o comprimento do caule reduziu em 50%, enquanto que para o comprimento do entrenó e o número de gemas essa mesma redução (50%) ocorreu nas concentrações do filtrado fúngico de 36,66% e 34,68%, respectivamente. As maiores reduções foram observadas na concentração de 50% do filtrado fúngico, sendo de 90,55% para o comprimento do caule (15,51 mm), 93,16% para o comprimento do entrenó (6,66 mm) e 88,17% para o número de gemas (2,51) (Figura 10).

A cultivar Bragantina em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico apresentou os maiores valores para comprimento médio do caule (43,56 mm) e do entrenó (24,64 mm), e número médio de gemas (4,25). No entanto, da mesma forma que o híbrido, esses valores foram decrescendo a partir da adição de 20% do filtrado fúngico. As equações das curvas (Figura 9) mostraram que as concentrações de 39,63%, 37,54% e 39,01% do filtrado fúngico reduziram em 50% o comprimento do caule, comprimento do entrenó e o número de gemas, respectivamente. As maiores reduções foram de 82,92% para o comprimento do caule (16,62 mm), 73,59% para o comprimento do entrenó (10,73 mm) e 91,29% para o número de gemas (2,62) em meio de cultura com 50% da concentração do filtrado fúngico (Figura 10).

As alterações morfológicas no caule das plantas de *P. nigrum* resultante da fitotoxicidade das concentrações do filtrado fúngico mostraram que o híbrido reduziu em 50% o número de gemas, comprimento do caule e do entrenó em menores concentrações do filtrado fúngico quando comparado com a cultivar Bragantina. Além disso, o híbrido apresentou maiores reduções para o comprimento do caule e do entrenó em relação a cultivar Bragantina na concentração de 50% do filtrado fúngico. Porém, a Bragantina apresentou maior redução do número de gemas em relação ao híbrido, nessa mesma concentração.

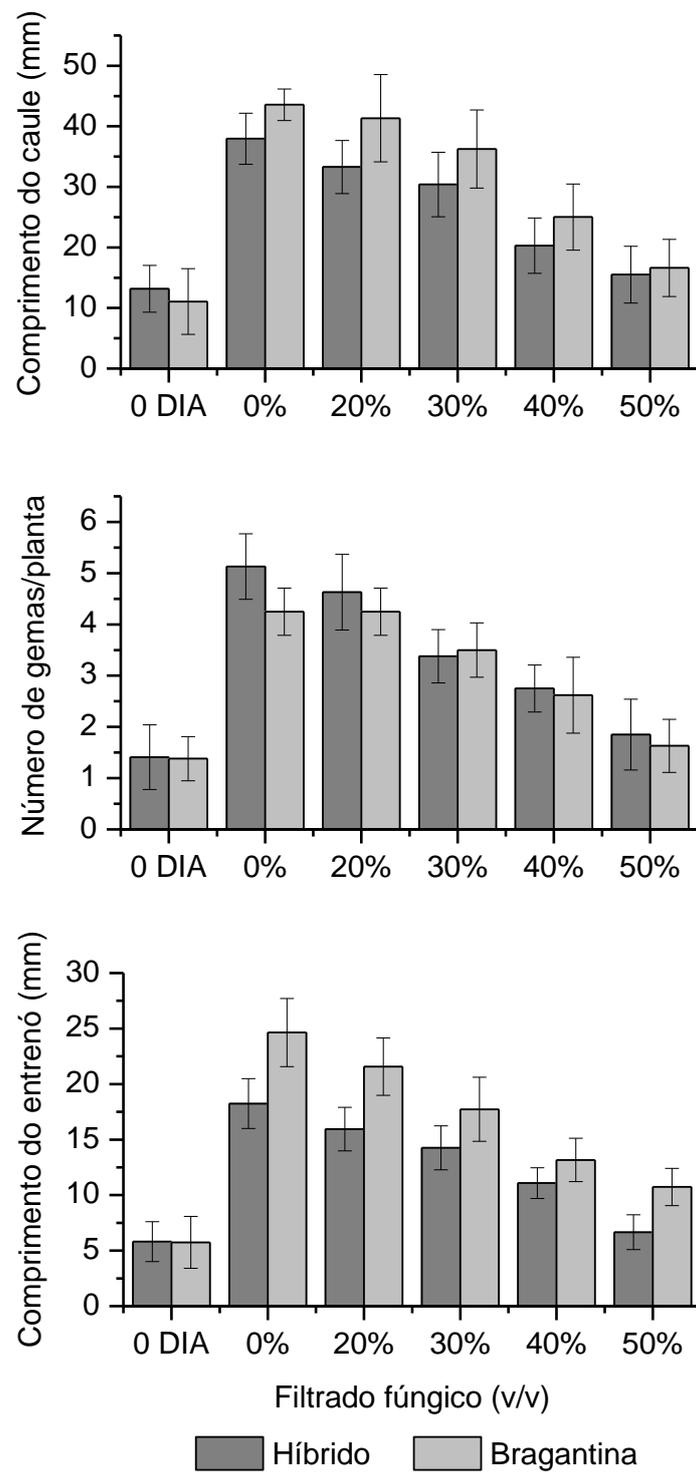


Figura 10. Efeito das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* na morfologia do caule dos genótipos *in vitro* de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as média \pm desvio padrão.

As alterações no crescimento do caule das plantas de *P. nigrum* resultantes da fitotoxicidade das concentrações (0%, 20%, 30%, 40% e 50% v/v) do filtrado fúngico de *F. solani* f. sp. *piperis* foram observadas no acúmulo de massa fresca e massa seca. O modelo matemático do segundo grau, expresso por uma curva quadrática decrescente ($P < 0,001$) ajustou-se para descrever o comportamento dos dados em relação às concentrações do filtrado fúngico. As equações das curvas apresentaram $R^2 > 0,70$, sendo possível observar que mais de 70% das reduções nos acúmulos de massa fresca e massa seca foram resultantes das concentrações do filtrado fúngico adicionados ao meio de cultura (Figura 11).

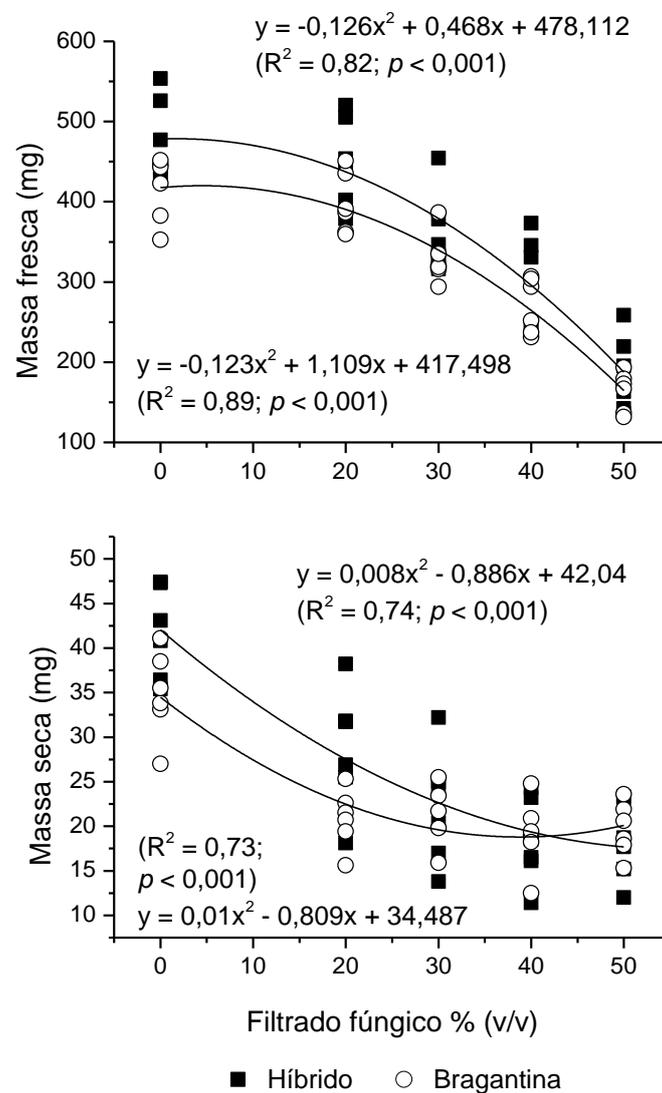


Figura 11. Alterações na massa fresca e massa seca no caule dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura.

O híbrido apresentou os maiores acúmulos de massa fresca (476,25 mg) e massa seca (41,73 mg) do caule em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. No entanto, esses

valores foram reduzindo a partir de 20% da concentração do filtrado fúngico. A massa fresca reduziu em 50% na concentração de 38,21% do filtrado fúngico, enquanto que a massa seca reduziu na mesma proporção (50%) na concentração 20,24%. As maiores reduções foram observadas na concentração de 50% do filtrado fúngico, sendo de 88,75% para a massa fresca e 86,67% para a massa seca (Figura 12).

Da mesma forma que o híbrido, a cultivar Bragantina apresentou os maiores valores de massa fresca (416,48 mg) e massa seca (34,83 mg) em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. A fitotoxicidade do filtrado fúngico causou reduções de 50% na massa fresca e na massa seca nas concentrações de 37,97% e 10,89% do filtrado fúngico, respectivamente. As reduções mais acentuadas foram de 93,92% na massa fresca e 95,83% na massa seca em meio de cultura com adição de 50% do filtrado fúngico (Figura 12).

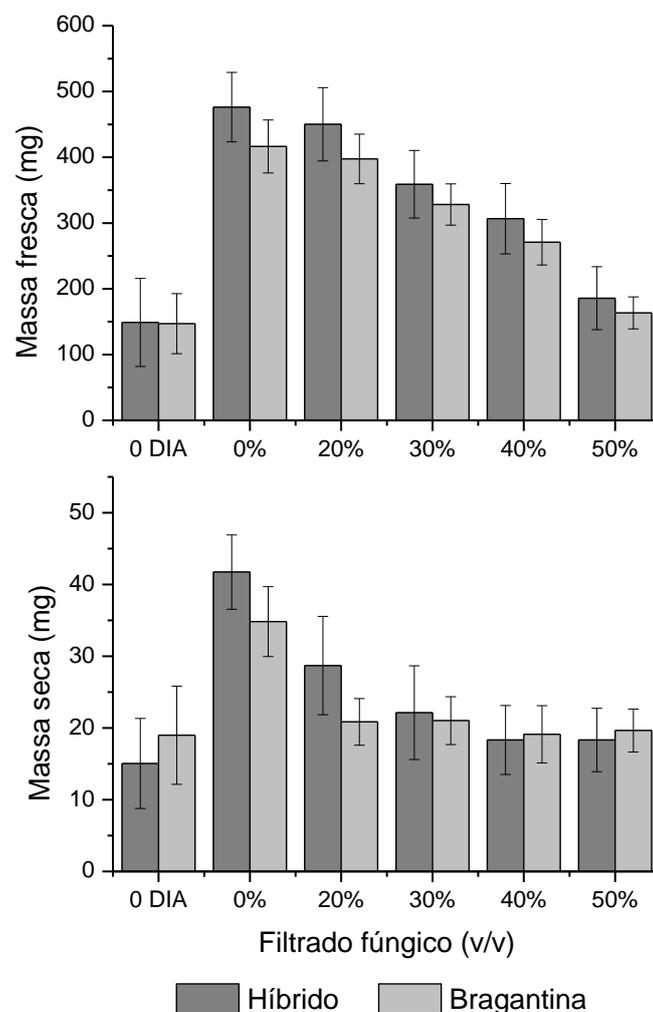


Figura 12. Efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre as massas fresca e massa seca do caule de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão.

As reduções no crescimento avaliadas pela massa seca do caule das plantas de *P. nigrum* mostraram que uma menor concentração (10,89%) do filtrado fúngico foi o suficiente para reduzir em 50% a massa seca do caule da cultivar Bragantina, enquanto que o híbrido apresentou essa mesma redução em uma maior concentração do filtrado fúngico (20,24%). Além disso, a Bragantina apresentou maior redução da massa seca (95,83%) em relação ao híbrido (86,67%) em meio de cultura acrescido de 50% do filtrado fúngico.

2.3.4. Alterações nas folhas

As folhas dos genótipos de *P. nigrum* apresentaram alterações na morfologia e no crescimento em função da fitotoxicidade do filtrado de cultura do patógeno. O número médio de folhas, área foliar total, massa fresca e massa seca foram maiores para o híbrido em relação a cultivar Bragantina (Tabela 4). No entanto, devido ao maior número médio de folhas, a percentagem de folhas senescentes foi maior para o híbrido (Tabela 4).

Tabela 3 Efeito da média das doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre as folhas de dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura.

Genótipo	Folhas				
	Número	Senescentes (%)	Área total (cm ²)	Massa fresca (mg)	Massa seca (mg)
Híbrido	3,85 a	52,96 a	19,58 a	487,88 a	64,09 a
Bragantina	3,37 b	34,28 b	14,35 b	425,26 b	46,01 b
CV (%)	18,08	19,76	23,72	17,57	11,97

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

As plantas em meio de cultura sem filtrado fúngico também apresentaram alterações em sua área foliar total em função da exaustão do meio ½ MS. Entretanto, a razão principal para essa alteração nos dois genótipos foi devido à fitotoxicidade do filtrado fúngico. Foram observados sintomas de clorose e necrose no limbo foliar, que apareceram a partir das bordas foliares e se estenderam até o pecíolo da folha. Aos 45 dias foram observados 5 graus sintomatológicos, considerados como nulo, moderado, médio, alto e extremo (Figura 13).

No grau nulo ou sem sintomas, as folhas apresentaram 100% de área foliar sadia de coloração verde intenso. No entanto, no grau moderado a área foliar sadia reduziu para 25,31% e foi observado o aparecimento de área foliar clorótica de 67,35% e área foliar necrótica de 7,34%. No grau médio foram observados 34,25% de área foliar sadia, 38,36% de

área foliar clorótica e 27,39% de área foliar necrótica. O grau alto apresentou 14,09% de área foliar sadia, com redução da área clorótica para 21,95% e aumento da necrótica para 63,95%. O grau extremo não apresentou áreas foliares sadia e clorótica, no entanto, a área foliar necrótica aumentou para 100%, sendo observada a queda das folhas (Figura 13).

As plantas em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico apresentaram queda das folhas de 25,28% para o híbrido e 16,83% para a Bragantina e aumentaram a partir da concentração de 20% do filtrado fúngico até atingir 69,17% para o híbrido e 53,33% para a Bragantina à concentração de 50% do filtrado fúngico (Figura 14).

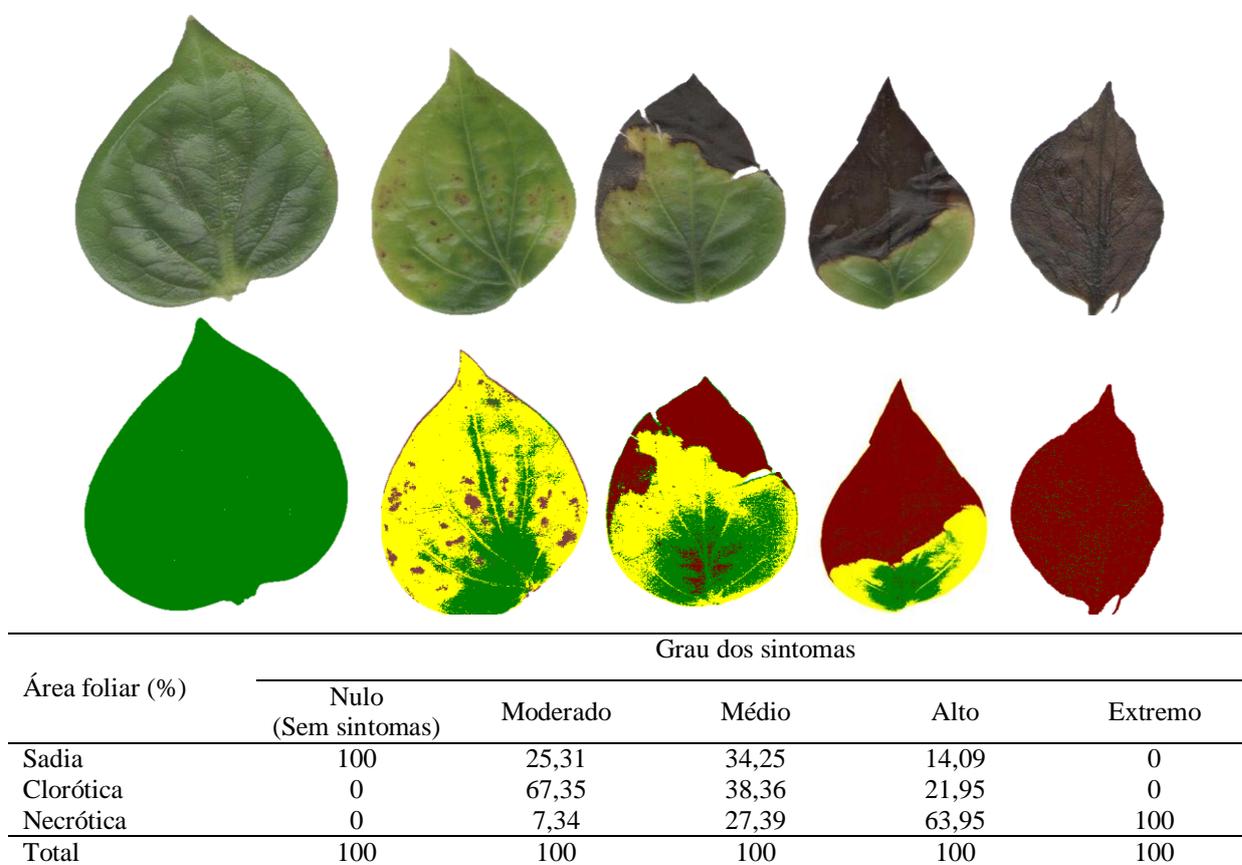


Figura 13. Evolução sintomatológica na área foliar dos dois genótipos de *Piper nigrum* L. submetidos ao filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, aos 45 dias em meio de cultura.

As alterações morfológicas nas folhas dos genótipos de *P. nigrum* resultantes do efeito fitotóxico das concentrações de 0%, 20%, 30%, 40% e 50% do filtrado fúngico de *F. solani* f. sp. *piperis* foram registradas através da redução no número médio de folhas, área foliar total, folhas senescentes, massa fresca e massa seca. As alterações quanto ao número de folhas e área foliar em função das concentrações do filtrado fúngico apresentaram comportamento descrito por uma curva de tendência do tipo quadrática decrescente ($P < 0,001$), mas o comportamento quanto à senescência foi descrito por uma curva quadrática crescente ($P < 0,001$) (Figura 14).

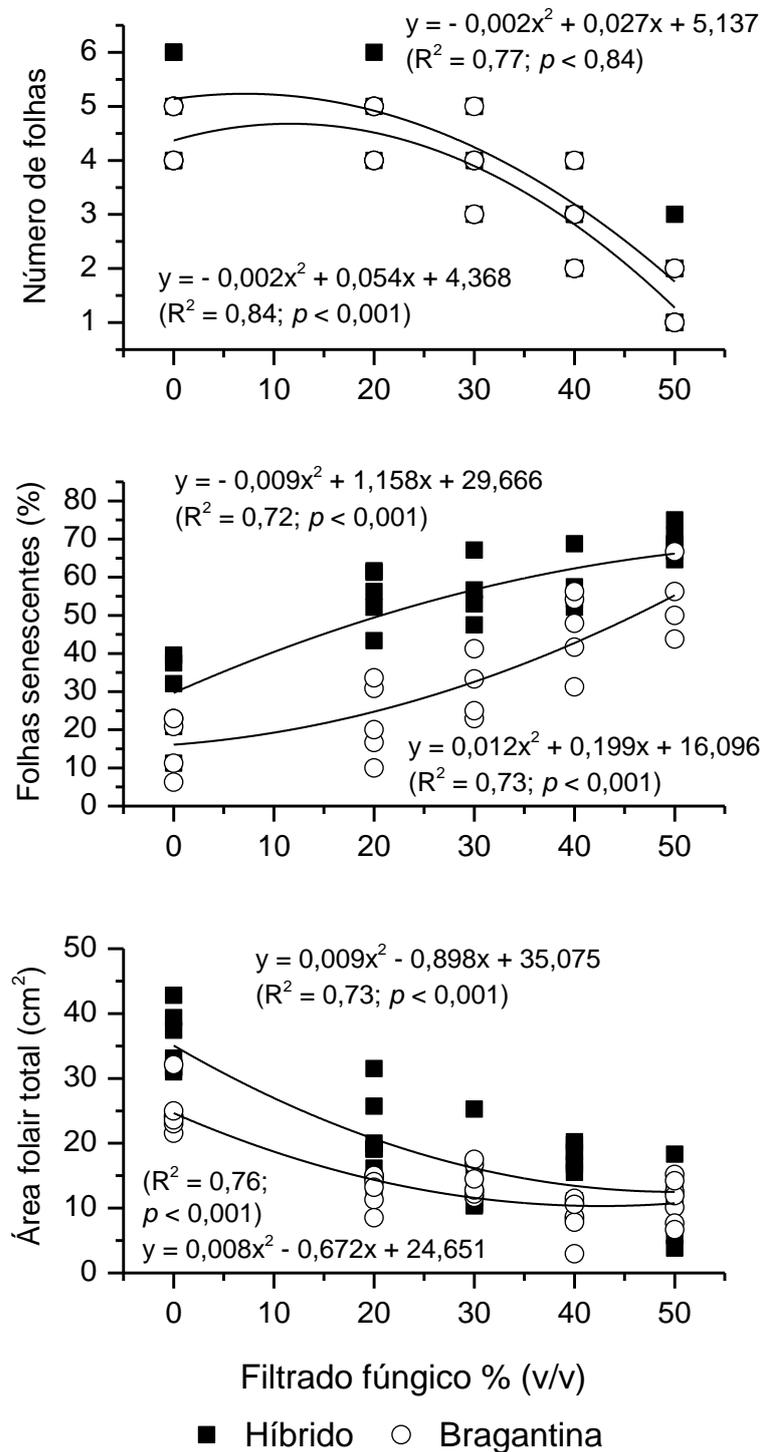


Figura 14. Alterações nas folhas dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) sob efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* aos 45 dias em meio de cultura.

O híbrido em meio de cultura sem filtrado apresentou os maiores valores médios para o número de folhas (5,13) e área foliar (35,31 cm²) e, o menor valor médio para o número de folhas senescentes (3,41). Foi observado, através das equações das curvas (Figura 14), que a

adição de 39,36% e 16,76% do filtrado fúngico ao meio de cultura reduz em 50% o número de folhas e a área foliar total, respectivamente. Para as folhas senescentes, a concentração de 34,85% do filtrado fúngico aumenta em 50% o número de folhas senescentes. As alterações foram mais acentuadas na concentração de 50% do filtrado fúngico. Houve uma redução no número de folhas (1,75) em 90,62% e da área foliar total (11,08 cm²) de 94,79%, enquanto que o número de folhas senescentes (9,70) aumentou 64,85% (Figura 15).

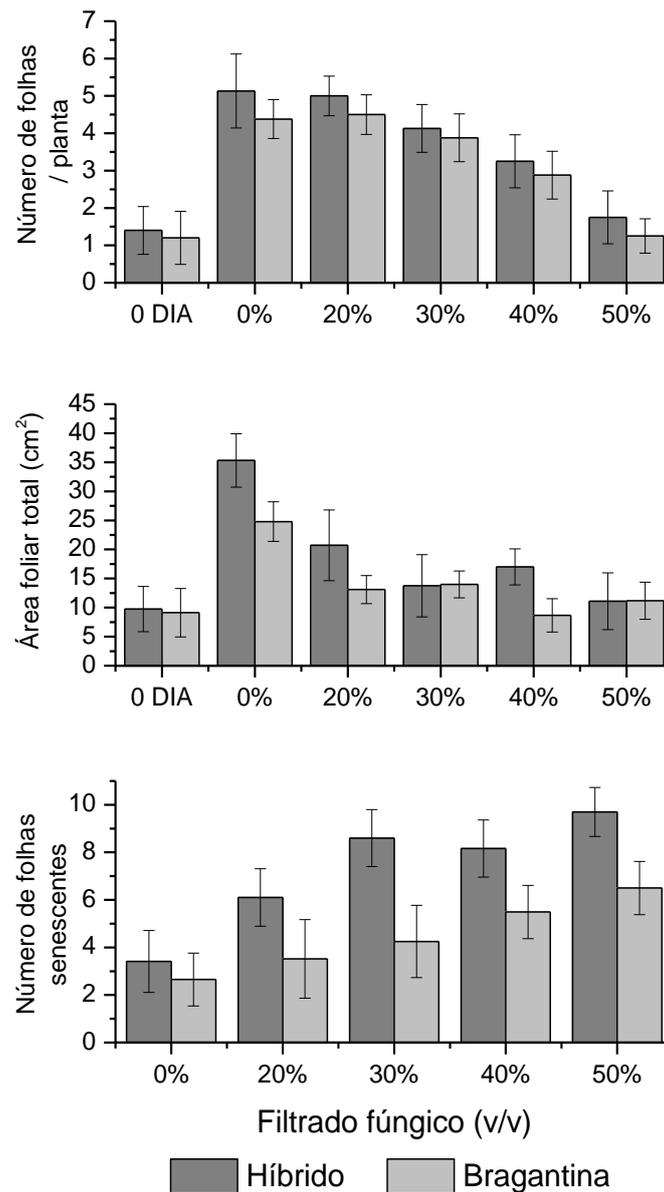


Figura 15. Alteração foliar sob o efeito de doses do filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam as médias \pm desvio padrão.

As plantas da cultivar Bragantina apresentaram maiores valores médios para o número de folhas (4,38) e área foliar total (24,79 cm²) e folhas senescentes (2,65) em meio de cultura sem a adição do filtrado fúngico. As equações das curvas (Figura 14) mostraram que a adição de 40,23% e 13,76% do filtrado fúngico ao meio de cultura reduzem em 50% o número de folhas e a área foliar total, respectivamente. Para as folhas senescentes, a concentração de 44,81% do filtrado fúngico aumentaram em 50% o número de folhas senescentes. As alterações foram mais acentuadas na concentração de 50% do filtrado fúngico. Ocorreu redução no número de folhas (1,25) em 98,43% e na área foliar total (11,18 cm²) de 86,85%, enquanto que o número de folhas senescentes (6,50) aumentou 59,23% (Figura 15).

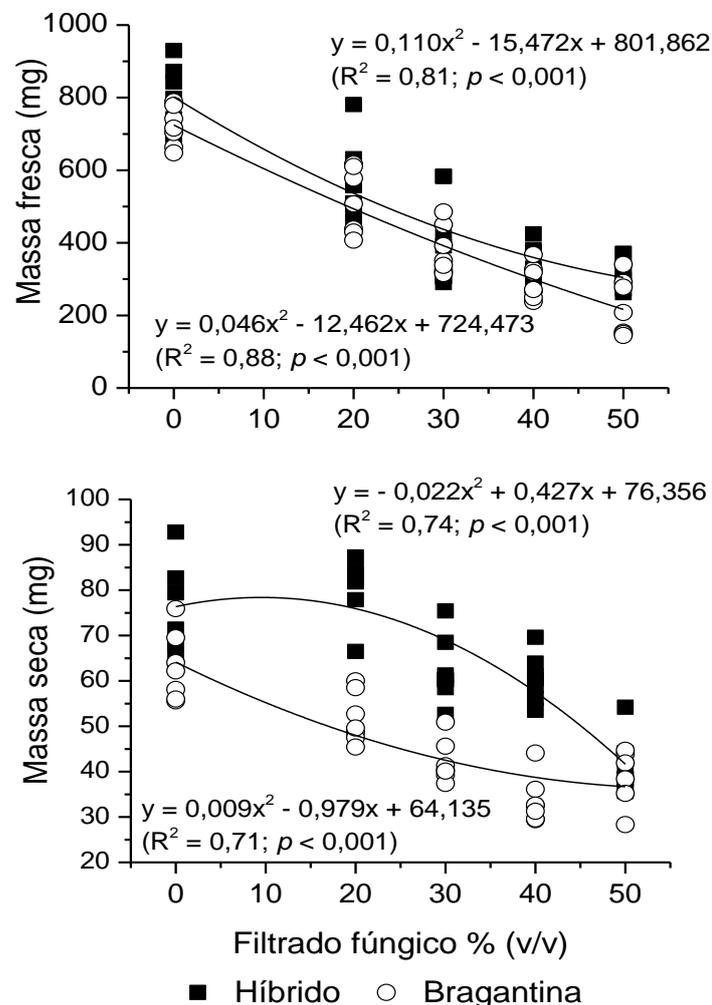


Figura 16. Alterações na massa foliar sob o efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *Piperis* em dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura.

As alterações no crescimento das folhas dos genótipos de *P. nigrum* resultantes do efeito fitotóxico das concentrações de 0%, 20%, 30%, 40% e 50% do filtrado da cultura de *F.*

solani f. sp. *piperis* foram avaliadas através do acúmulo de massa fresca e massa seca. Os dados em função das concentrações do filtrado fúngico foram descritos por uma curva quadrática decrescente ($P < 0,001$), com maiores valores para o híbrido (Figura 16).

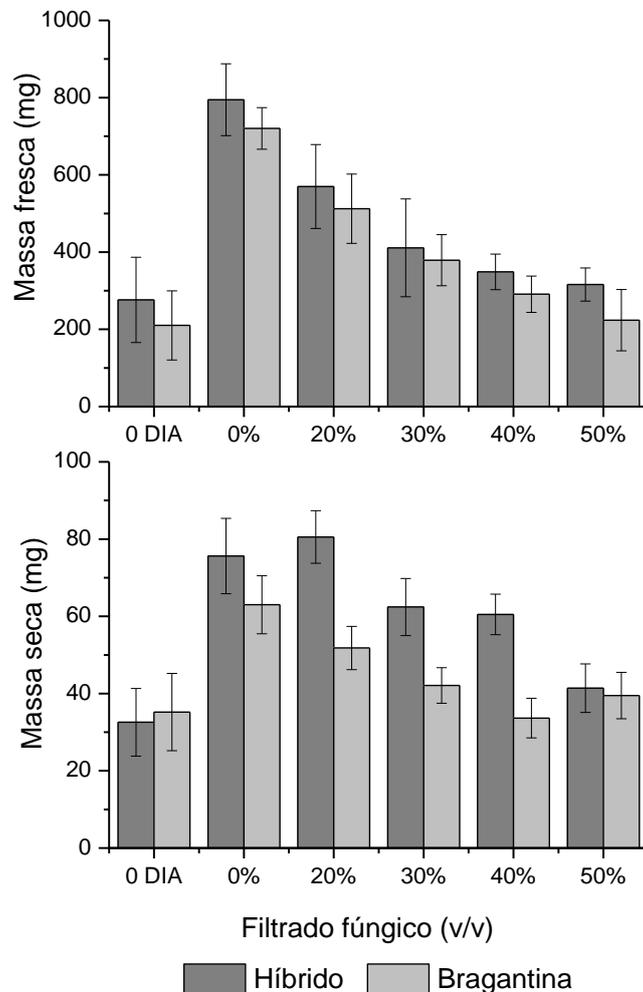


Figura 17. Alterações na massa foliar sob o efeito de doses do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em dois genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura. As barras representam média \pm desvio padrão.

O híbrido apresentou maiores acúmulos de massa fresca (794,5 mg) e massa seca (75,6 mg) em meio de cultura sem o filtrado fúngico. No entanto, foi estimado (Figura 16) que a adição de 20,10% e 42,49% do filtrado fúngico ao meio de cultura reduziu em 50% o acúmulo de massa fresca e massa seca, respectivamente. À medida que se aumentou a concentração do filtrado fúngico ao meio de cultura foram observadas reduções desses valores, sendo as maiores reduções de 92,33% para a massa fresca e 79,46% para a massa seca em meio de cultura com 50% da concentração do filtrado fúngico (Figura 17).

A cultivar Bragantina, da mesma forma que o híbrido, apresentou maiores acúmulos de massa fresca (720,14 mg) e massa seca (63,0 mg) em meio de cultura sem o filtrado fúngico. Foi estimado, através das equações das curvas (Figura 16), que a adição de 22,72% e 18,28% do filtrado fúngico ao meio de cultura reduz em 50% o acúmulo de massa fresca e massa seca, respectivamente. No entanto, as maiores reduções foram observadas em meio de cultura com 50% da concentração do filtrado fúngico. A massa fresca reduziu 97,35%, enquanto que a massa seca reduziu 84,56% (Figura 17).

O acúmulo de massa seca mostrou que para reduzir o crescimento das folhas do híbrido em 50% é necessária uma maior concentração do filtrado fúngico (44,81%) em comparação com a cultivar Bragantina (18,28%). Além disso, a concentração de 50% do filtrado fúngico provocou reduções mais drásticas no crescimento das folhas da Bragantina (84,56%) que no híbrido (79,46%).

De forma geral, ao avaliar a pressão de toxicidade do filtrado fúngico nos dois genótipos, através do somatório do acúmulo de massa seca nas raízes, caule e folhas, pode-se observar que a Bragantina foi mais sensível que o híbrido. As equações das curvas (Figura 18) permitiram estimar as concentrações do filtrado fúngico (DL₅₀) de 18,71% e 31,94% para reduzir em 50% o acúmulo de massa seca total na Bragantina e no híbrido, respectivamente.

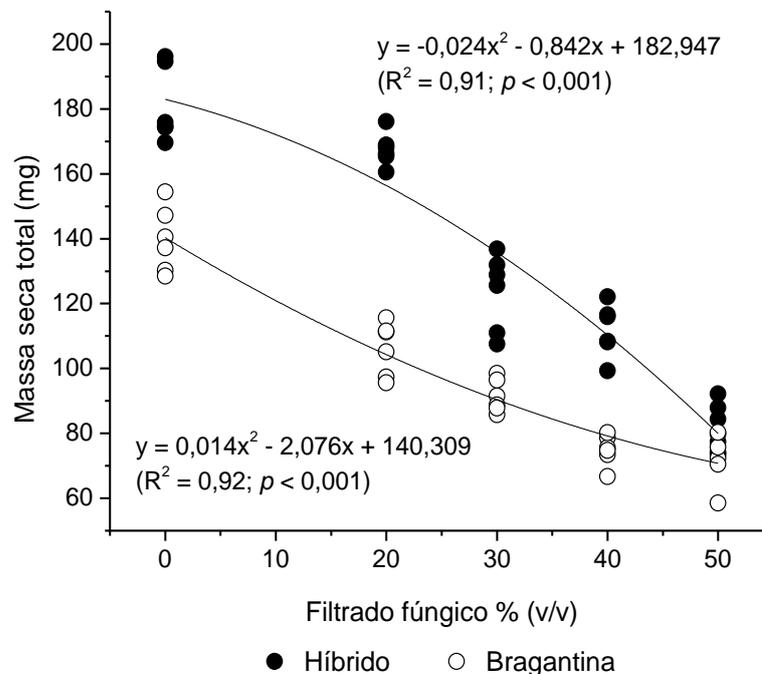


Figura 18 Alterações na massa seca total dos genótipos *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) aos 45 dias em meio de cultura com filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*.

Entre as regiões da planta (raízes, caule e folhas) foi observado que o caule dos dois genótipos apresentou maior sensibilidade à pressão de toxicidade do filtrado fúngico, pois, quando comparado com as regiões da raiz e das folhas, foram observadas menores doses do filtrado fúngico (DL_{50}) para reduzir em 50% o acúmulo de massa seca (Tabela 4). Em seguida, as raízes foram mais sensíveis que as folhas à pressão de toxicidade do filtrado fúngico para o híbrido, enquanto que para a Bragantina as folhas foram mais sensíveis em comparação com as raízes a pressão de toxicidade (Tabela 4).

Tabela 4 Doses estimadas (DL_{50}) do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* para reduzir em 50% o crescimento dos genótipos de *Piper nigrum* L. e das suas regiões das raízes, caule e folhas.

Genótipos	DL_{50} % (v/v) do filtrado fúngico			
	Raiz	Caule	Folhas	Planta
Híbrido	35,21	20,24	42,49	31,94
Bragantina	30,54	10,89	18,28	18,71

As doses foram estimadas através das curvas de regressão da variável de massa seca total e das regiões da planta.

2.4. DISCUSSÃO

Apesar de não existirem cultivares de pimenteira-do-reino resistentes ao *F. solani* f. sp. *piperis*, os diferentes níveis de suscetibilidade ao patógeno ainda não são conhecidos. Diante disso, o presente trabalho conseguiu demonstrar diferenças nas alterações na morfologia e no crescimento das plantas *in vitro* da cultivar Bragantina e do híbrido intraespecífico de *P. nigrum*, submetidos à pressão de seleção *in vitro* por filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*.

A fitotoxicidade das concentrações do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* provocou alterações na morfologia e no crescimento das raízes, caule e folhas da cultivar Bragantina e no híbrido intra-específico. No entanto, essas alterações ocorreram em diferentes magnitudes, sendo possível observar os diferentes níveis de sensibilidade dos genótipos ao filtrado de cultura do patógeno.

Segundo Lebeda et al., (2010) o filtrado de culturas fúngicas pode conter uma grande quantidade de metabólitos secundários, polissacarídeos, oligossacarídeos, proteínas, glicoproteínas, ácidos graxos insaturados, reguladores de crescimento (auxina, citocinina e ácido giberélico) e as toxinas que apresentam um papel fundamental no desenvolvimento da doença. Para Yoder (1980), as toxinas são classificadas com base no seu modo de ação, as que são responsáveis pelo aparecimento da doença, sendo essenciais para causar a doença, chamadas de fatores de patogenicidade, e aquelas que são necessárias pelo desenvolvimento e aumento da extensão da doença, chamadas de fatores de virulência.

Considerando que o filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* foi autoclavado, o efeito fitotóxico na alteração da morfologia e do crescimento dos genótipos de pimenteira-do-reino, possivelmente, foi devido às toxinas termoestáveis presentes no filtrado fúngico.

Duarte e Archer (2003) verificaram a natureza termoestável dos metabólitos tóxicos produzidos por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Estes autores observaram que folhas destacadas de sete cultivares de pimenta-do-reino e *Piper betle* exibiram sintomas de descoloração das nervuras após imersão em filtrados autoclavado e não-autoclavado. Foram observadas algumas pequenas reduções na atividade biológica, sugerindo que, se algumas substâncias foram inativadas por aquecimento, a maior parte dos componentes tóxicos permaneceu ativa.

A aplicação de filtrado de culturas *in vitro* podem desencadear várias respostas de defesa na planta, por exemplo, a produção de fitoalexinas; acúmulo de compostos fenólicos e aumento da atividade de enzimas como peroxidases, beta-1,3-glucanase e quitinase (SINGH et al., 2003). Em plantas sensíveis às fitotoxinas presentes no filtrado fúngico, podem ser

observadas alterações morfológicas e inibição do crescimento em peso (HOLLMANN et al., 2002).

O efeito fitotóxico do filtrado fúngico na alteração da morfologia das raízes foi observado através da redução do número de raízes e comprimento da raiz. A redução no crescimento das raízes foi observada através do menor acúmulo de massa fresca e massa seca. No entanto, essas reduções ocorreram em diferentes magnitudes para os dois genótipos de *Piper nigrum* L. Esses resultados demonstraram que é possível identificar os níveis de suscetibilidade dos genótipos ao filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*.

O número e comprimento de raiz foram maiores para o híbrido. Consequentemente, o acúmulo de massa fresca e massa seca também foram maiores para o híbrido. Quanto aos efeitos da fitotoxicidade do filtrado fúngico no crescimento das raízes, no híbrido para reduzir em 50% o crescimento das raízes são necessário uma maior concentração do filtrado. Além disso, as reduções mais agudas, observadas na maior concentração do filtrado fúngico, ocorreram para a Bragantina. Desta forma, foi verificada menor sensibilidade das raízes do híbrido em relação às raízes da Bragantina ao filtrado fúngico.

Flores et al., (2012) encontrou resultados semelhantes para plantas de maracujazeiro-amarelo sensíveis e insensíveis ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. Estes autores adicionaram concentrações do filtrado fúngico deste patógeno ao meio básico de cultura. Os resultados mostraram maior redução no número e comprimento das raízes para o genótipo sensível. Da mesma forma, o acúmulo de massa fresca e massa seca também apresentaram maiores reduções no crescimento das raízes do genótipo insensível. Para este mesmo genótipo, a maior concentração do filtrado fúngico inibiu o crescimento das raízes.

Dentre as toxinas produzidas por espécies do gênero *Fusarium*, o ácido fusárico é o metabólito secundário tóxico mais estudado. Apesar de sua função ainda não estar completamente elucidada, acredita-se que há o envolvimento da toxina no desenvolvimento da doença (SVABOVÁ e LEBEDA, 2005). Em raízes de plantas de milho, foi observado que o ácido fusárico diminui a atividade respiratória da mitocôndria necessária para o suprimento de ATP das raízes causando a redução no número e comprimento das mesmas (TELLES-PUPULIN et al., 1996).

No presente trabalho, o comprimento do caule foi maior para a Bragantina. Isso pode ser justificado pelo seu maior comprimento do entrenó. Entretanto, o híbrido apresentou maior número de gemas, a qual pode ter influenciado no maior acúmulo de massa fresca e massa seca do caule do híbrido. Além disso, a maior concentração do filtrado fúngico

diminuiu mais o crescimento do caule da Bragantina. De forma semelhante ao crescimento das raízes, foi verificada menor suscetibilidade do híbrido.

Em plântulas de soja foi verificado que o filtrado esterilizado e não-esterilizado de *Fusarium culmorum* foram capazes de reduzir o comprimento do caulículo, além de reduzir também a massa seca da parte aérea. Estas reduções aumentaram em função da idade da cultura, constatando ainda que o filtrado fúngico não perdeu sua toxicidade após sua esterilização. Porém, esses efeitos podem ser resultado de uma complexa interação com outras toxinas (HAIKAL, 2008).

O aumento das concentrações do filtrado fúngico afetou o crescimento da parte aérea dos genótipos testados, promovendo alterações no número de folhas e área foliar total. Conseqüentemente, foram observadas reduções no acúmulo de massa fresca e massa seca das folhas. Isso ocorreu porque a fitotoxicidade do filtrado fúngico aumentou a senescência foliar. Apesar de serem observadas também folhas senescentes nas plantas testemunha, provavelmente devido à exaustão do meio de cultura, o maior número de folhas senescentes foi observado na concentração de 50% do filtrado fúngico.

O número de folhas, a área foliar total, a massa fresca e massa seca das folhas foram maiores para o híbrido. Entretanto, devido ao maior número de folhas, o híbrido apresentou maior número de folhas senescentes. Quanto ao crescimento das folhas, avaliado pelo acúmulo de massa seca, a cultivar Bragantina apresentou maior sensibilidade ao filtrado fúngico, pois foi necessária uma menor concentração do filtrado fúngico para reduzir em 50% o crescimento de suas folhas. Além disso, a maior concentração do filtrado fúngico causou maior redução do crescimento das folhas da Bragantina quando comparada ao híbrido.

Os resultados mostraram que o híbrido foi menos sensível ao filtrado fúngico. Apesar do maior número de folhas senescentes, o híbrido apresentou uma maior área foliar total, resultante de um maior número de folhas. Provavelmente, a capacidade fotossintética do híbrido foi menos afetada em relação à Bragantina, a qual pode ter influenciado na maior assimilação de carbonos, e conseqüentemente em um maior crescimento.

Em plantas de maracujazeiro-amarelo suscetíveis e não suscetíveis ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, a adição do filtrado fúngico deste patógeno no meio de cultura resultou no aumento da senescência das folhas. Os resultados mostraram maior percentagem de folhas senescentes no genótipo sensível. Desta forma, foi possível observar maior tolerância do genótipo insensível às toxinas presentes no filtrado fúngico (FLORES, 2008).

O efeito fitotóxico do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* resultou em redução da área foliar sadia nos genótipos de *Piper nigrum* L. Após 45 dias da inoculação das plantas

em meio de cultura contendo as concentrações do filtrado fúngico, foram observadas o aparecimento de áreas foliares cloróticas, que evoluíram com o tempo para áreas foliares necróticas. Esses sintomas começaram pelas bordas foliares e foram dirigindo-se para o pecíolo das folhas, resultando em queda das folhas. Esses sintomas foram observados em um maior número de folhas na maior concentração do filtrado fúngico, justificando a maior percentagem de folhas senescentes.

Fusarium solani produzem toxinas do tipo naftazarinas que podem ser translocadas para a parte aérea da planta, causando necrose foliar (PASCHOLATI et al., 2008). Achor et al. (1993) verificaram que folhas de plântulas de limão rugoso, cultivadas em solução contendo dihidrofusarubina, um tipo de naftazarina, possuíam clorose similar aos sintomas apresentados por plantas doentes com podridão de raiz no campo. Posteriormente, esses mesmos pesquisadores concluíam que essa clorose nas folhas de citros era devido à disfunção nos cloroplastos (degradação da clorofila) causada pela toxina.

Segundo Agrios (2005) as toxinas produzidas por fungos patogênicos inibem algumas enzimas que estão envolvidas direta ou indiretamente na fotossíntese. Isto leva à degradação das clorofilas e/ou redução da síntese de clorofilas, resultando no desenvolvimento de clorose nas folhas.

2.5. CONCLUSÕES

O filtrado fúngico em meio de cultura, desde a concentração de 20%, provoca alterações na morfologia e no crescimento *in vitro* dos genótipos de *P. nigrum*;

À medida que a concentração aumenta no meio de cultura há alterações mais agudas na morfologia e reduções mais acentuadas no crescimento das raízes, caule e folhas;

O sistema radicular da cultivar Bragantina é mais sensível ao filtrado fúngico quando comparada com o híbrido;

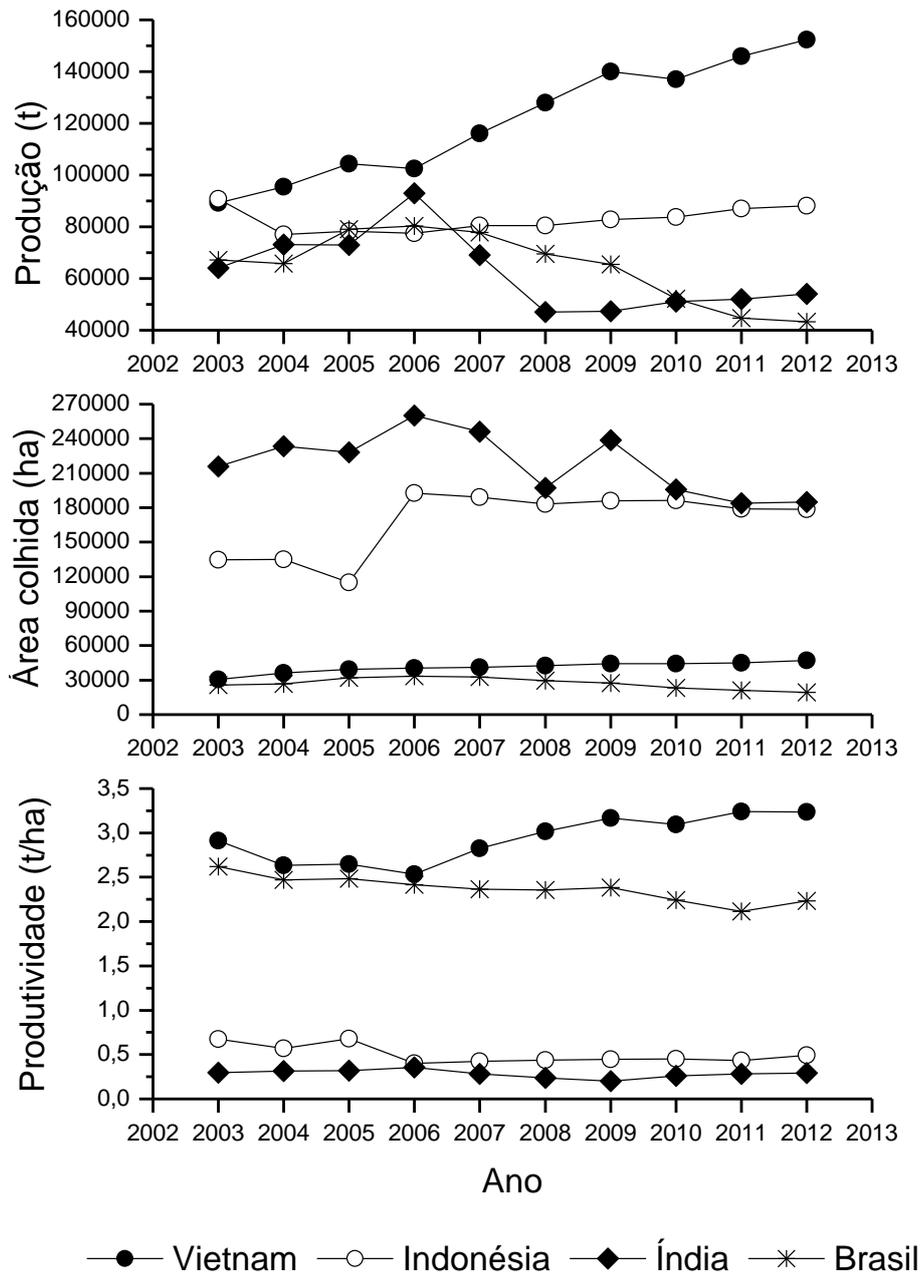
O filtrado fúngico provoca alterações mais acentuadas no crescimento do caule e folhas da Bragantina do que no híbrido;

A utilização do filtrado de cultura de *F. solani f. sp. piperis* é uma alternativa para determinar os níveis de suscetibilidade dos genótipos de *Piper nigrum* L. às toxinas produzidas pelo patógeno, que estão envolvidas na ocorrência da fusariose;

Os níveis das alterações na morfologia e no crescimento das plantas permitiram observar que há diferenças quanto à reação dos genótipos ao cultivo *in vitro* com adição de filtrado do fungo ao meio de cultura, sendo o híbrido menos sensível às toxinas do filtrado fúngico que a cultivar Bragantina.

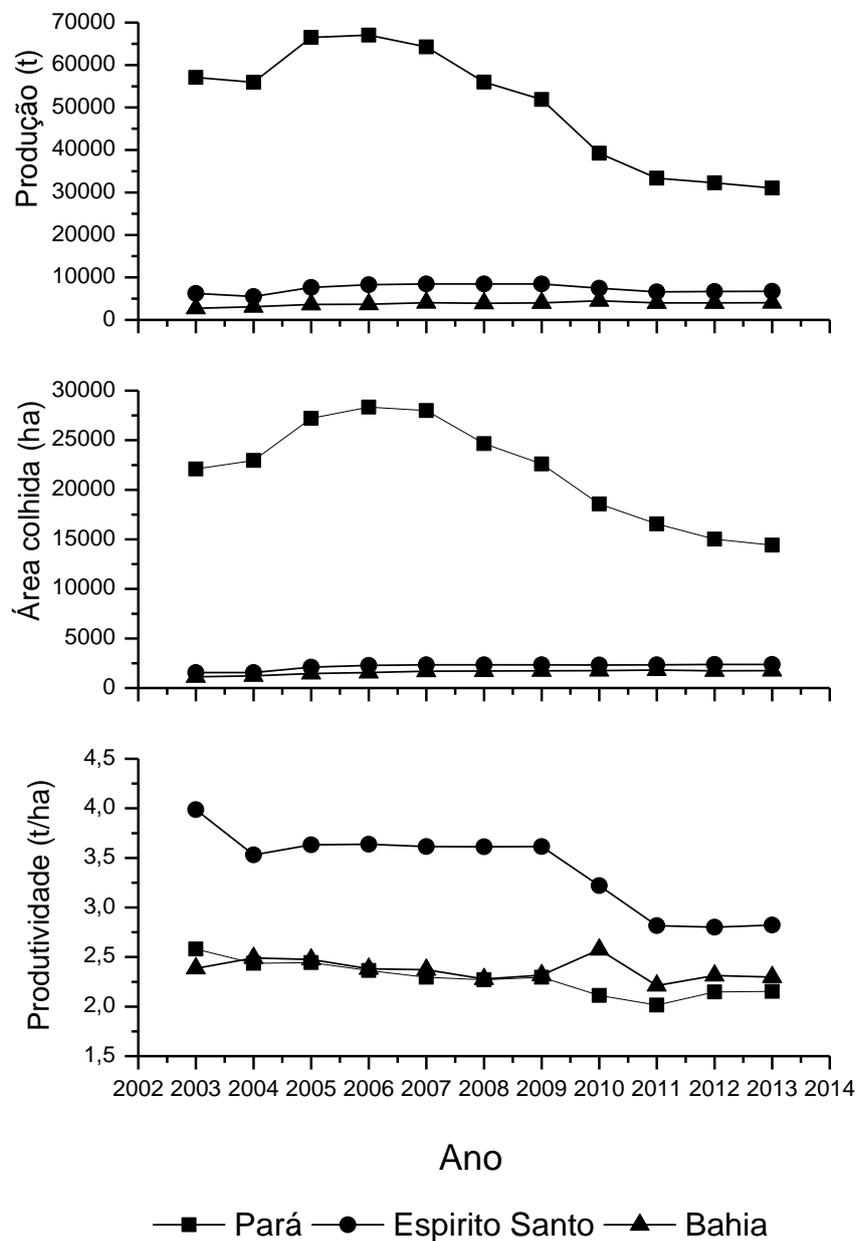
ANEXOS

ANEXO A. Produção, Área colhida e Produtividade nos últimos 10 anos dos quatro maiores países produtores de pimenta-do-reino no mundo.



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de dados extraídos da Organização das Nações Unidas Para a Alimentação e Agricultura-FAO, 2012. Os dados estão disponíveis em <http://faostat.fao.org>. Acesso em 12/01/2014.

ANEXO B. Produção, Área colhida e Produtividade nos últimos 10 anos dos quatro maiores estados produtores de pimenta-do-reino no Brasil.



Fonte: Elaborada pelo autor a partir de dados extraídos do INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2014. Os dados estão disponíveis em <http://www.sidra.ibge.gov.br>.

ANEXO C. Composição do meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962).

Composto	(mg L ⁻¹)
Macronutrientes	
- KNO ₃	1.900
- NH ₄ NO ₃	1.650
- MgSO ₄ .7H ₂ O	370
- CaCl ₂ .2H ₂ O	440
- KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
- MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
- KI	0,83
- H ₃ BO ₃	6,2
- ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
- CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
- Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
- CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe-EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
NaEDTA	37,3
Vitaminas	
Tiamina – HCl	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	100,0
Outros	
Sacarose	30.000,0

ANEXO D. Meios de Czapek-Dox e Batata-Sacarose-Agar para cultivo de fungo.

Composto	Czapek-Dox (g L ⁻¹)	BSA (g L ⁻¹)
- NaNO ₃	3,0	
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	
- KH ₂ PO ₄	1,0	
- KCl.2H ₂ O	0,5	
- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	
- Sacarose	30,0	10,0
- Fe-EDTA	2,5 ml (Fe-EDTA 20x MS)	
- Disco de batata sem pele		200,0
- Agar		20,0

REFERÊNCIAS

- ACHOR, D. S.; NEMEC, S.; BAKER, R. A. Effects of *Fusarium solani* naphthazarin toxins on the cytology and ultrastructure of rough lemon seedlings. **Mycopathologia**. 123, 26-117, 1993.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5 ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- ALBUQUERQUE, F. C. de Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino. **IPEAN**. p 44. (IPEAN-Circular, 5), 1961.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de Piperaceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica** v.31. p. 341-348, 2001.
- BENCHIMOL, R. L.; YING CHU, E.; YUITIMOTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino: Sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesq. Agrop.bras.**, Brasília, v.35, n.7, p.1343-1348, jul. 2000.
- CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, I. O. Ocorrência de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em *Piper nigrum* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 96-97, 2007.
- DUARTE, M. L. R.; ARCHER, S. A. In vitro toxin production by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Fitopatologia Brasileira** v.28. n.3. p.229 – 235, jun. 2003.
- FLORES, P. S. **Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e ácido fusárico na seleção *in vitro* de maracujazeiro-amarelo**. Tese de doutorado. Viçosa - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. 88p. 2008.
- FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult**. v. 108, p. 37–45, 2012.
- HAIKAL, N. Z. Effects of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. **Journal of Applied science Research**, v.4, n.1, p.48-52, 2008.
- HOLLMANN, P. J; LOHBRUNNER, G. K.; SHAMOUN, S. F.; LEE, S. P. Establishment and characterization of *Rubus* tissue culture systems for in vitro bioassays against phytotoxins from *Rubus* fungal pathogens. **Plant Cell Tiss Organ Cult** 68: 43-48. 2002.
- KHAN, S.; MIRZA, K. J.; ANWAR, F.; ABDIN, M. Z. Development of RAPD markers for authentication of *Piper nigrum* L. **Environment & We An International Journal of Science & Technology**. v.5, p. 47 – 56, 2010.
- LEBEDA, A; SVABOVA, L. In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. In: FAO/IAEA. **Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease**. International Atomic Energy Agency, Vienna, p. 5-45. 2010.

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

LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; MENEZES, I. C. de M.; MONDIN, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 375), 45 p. 2011.

MAGEVSKI, G.C.; CZEPAK, M. P.; SCHMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; FERNANDES, A.A. Propagação vegetativa de espécies silvestres do gênero *Piper*, com potencial para uso como porta enxertos em pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu-SP, v.13, especial, p.559-563, 2011.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUZA, L.A.C.; TEIXEIRA, J.B.; In vitro selection for resistance to Fusarium wilt in Banana. **Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases, IAEA**. Vienna, n. 1, p. 101-113. May, 2010.

MORAES, F. K. C.; LEMOS, O. F.; PINHEIRO, H. A.; CASTRO, G. L. S.; SANTOS, L. R. R. Influencia de doses de NAA no enraizamento *in vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino. Resumo: **XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais**, v.1, p1. 2013.

MENEZES, I. C.; CIDADE, F. W.; SOUZA, A. P.; SAMPAIO, I. C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). **Conservation Genetics Resources**. v.1. p. 209-212. June, 2009.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiros. v.13. 627 p. 2008.

SILVA, R. S.; SOUZA, C. R. B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazonica**, Manaus-AM, v. 39, p. 255-260, 2009.

SINGH, S.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, G.; SCHUFF, C.; LAMPASONA M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, Antioxidant and Antimicrobial Potentials of White Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oil and Oleoresins. **Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.** n. 83 v. 3 p. 357–366 Jan, 2013.

SVABOVÁ, L.; LEBEDA, A. *In vitro* Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. **Journal Phytopathology**, v.153, p. 52–64, 2005.

TELLES-PUPULIN, A. R.; DINIZ, S. P. S. S.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of fusárico acid on respiration in maize root mitochondria. **Biologia Plantarum**, v.38, n.3, p.421-429, 1996.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Belém, PA - Embrapa Amazônia Oriental, 21 ed., 23 pag. Agosto, 2010.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. **QUANT. A software plant disease severity assessment**. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, p.105, 2003.

YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.** n. 18, p. 29-103, 1980.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum* L. **LWT - Food Science and Technology**. n. 50, p. 634 – 641. July, 2013.