



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO
GABRIELA TAVARES PIRES

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, CLONAGEM
DE PLANTAS E INDEXAÇÃO DE QUATRO GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-
DO-REINO**

BELÉM
2019

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO
GABRIELA TAVARES PIRES

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, CLONAGEM
DE PLANTAS E INDEXAÇÃO DE QUATRO GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-
DO-REINO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Agronomia.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Joanne Moraes de Melo Souza.

Coorientador: Oriel Filgueira de Lemos.

BELÉM

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribeiro, Ana Carolina Melo

Meio de cultura para germinação *in vitro*, clonagem de plantas e indexação de quatro genótipos de pimenteira-do-reino / Ana Carolina Melo Ribeiro, Gabriela Tavares Pires. – Belém, 2019.
39 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Agronomia, Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
Orientadora: Dr. Joanne Moraes de Melo Souza.

1. Pimenta-do-reino. 2. Propagação de plantas. 3. *Piper nigrum* L. I. Pires, Gabriela Tavares Pires. II. Souza, Joanne Moraes de Melo, *orient.* III. Título.

CDD – 633.84

ANA CAROLINA MELO RIBEIRO
GABRIELA TAVARES PIRES

**MEIO DE CULTURA PARA GERMINAÇÃO *IN VITRO*, CLONAGEM
DE PLANTAS E INDEXAÇÃO DE QUATRO GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-
DO-REINO**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Agronomia e ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia. Área de concentração: Biotecnologia.

11/11/2019
Data de Aprovação

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Presidente da Banca e Coorientador

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Amazônia Oriental



Prof. Dr. Rafael Gomes Viana

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA



Msr. Marcellia Gabriella T. Monteiro

Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo renovando a minha fé e por ter sido o meu refúgio em todos os momentos, obrigada Aba.

Agradeço a minha família, aos meus pais, Edmilson e Andréa, por sempre apoiarem as minhas decisões e por investirem nos meus estudos, as minhas irmãs e cunhados, Ester, Priscila, Darlan e Bruno por todo apoio.

Agradeço à Ufra pela oportunidade de realizar este curso, aos professores por toda dedicação e ensinamentos, vocês foram essenciais na minha trajetória acadêmica.

Ao meu querido grupo PET Agronomia, pelo acolhimento, convívio, oportunidades e todo o aprendizado, sem dúvida ter feito parte desse grupo fez toda a diferença na minha formação e contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional. Em especial, aos excelentes tutores Carlos Costa e Rafael Viana, o meu eterno carinho, respeito e gratidão, agradeço também a todos que compartilharam comigo essa experiência durante esse ciclo.

A Embrapa pela oportunidade de realizar o estágio na área da pesquisa. Aos estagiários do Laboratório de Biotecnologia, especialmente a nossa “mãezona” Gabriella Monteiro pelo afeto e por não medir esforços em ajudar. Aos funcionários Gilberto, Augusto e Isaías pelo suporte técnico e aos doutores Raimundo Parente e Moisés Mourão, o meu muito obrigada.

Muito grata aos colegas da turma C por me confiarem a responsabilidade em representar a turma nos últimos semestres e por todas as experiências adquiridas em conjunto. Agradeço também aos que me cativaram durante esses anos, em especial a Maura Brochado, Igor Cristhian, Matheus Yan, Francisco Souza, Augusto César, Karoline Souza, Anielle Costa, Carol Ferreira, Erika Chagas e as duas pessoas que no final da graduação tornaram os meus dias mais leves, Eduardo Torres e João Guilherme, vocês foram o meu porto seguro.

Agradeço aos meus amigos de infância, Dawanne Lima e Joabe Lima, e as amigas Daniele Pinon e Brenda Pinheiro que mesmo de longe torceram por essa conquista.

Ao grupo de trabalho que tornou-se irmandade, agradeço por cada ombro amigo, por cada sorriso e por cada palavra gentil, Jeane Oliveira, Diana Jhulia e Grazielle Rabelo, vocês “foram a família que eu fui descobrindo aos poucos”. Agradeço também a tia do coração Mariana pelo acolhimento durante todos esses anos.

A Dr. Joanne Moraes por não hesitar em nos orientar, por toda atenção, compreensão e ajuda nos momentos de dificuldade, muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Oriel Lemos pelo seu exemplo de simplicidade, por toda confiança depositada durante esses quase dois anos de orientação, pelas experiências e ensinamentos. Com toda certeza você foi fundamental durante a minha jornada acadêmica, tens a minha admiração e inspiração.

Não poderia deixar de agradecer à pessoa que foi imprescindível para a realização desse trabalho, minha amada dupla de TCC e amiga Gabriela Tavares, a você toda a minha gratidão pela confiança, por superar junto comigo as dificuldades no decorrer da pesquisa e por estender a mão sem pedir nada em troca durante todos esses anos.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão de mais essa etapa, toda a minha gratidão!

Ana Carolina Melo Ribeiro

Agradeço a Deus pela graça da vida e por ter sido meu alicerce durante toda essa caminhada!

A minha família, principalmente meus avós, Maria Catarina e Jorge meus grandes mentores e que nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor criação. A minha querida mãe Simone que sempre foi meu exemplo de mulher guerreira, sempre acreditou que eu poderia realizar meus sonhos e sempre me incentivou, afinal nada vem de graça a não ser pelo esforço próprio. A minha amada tia Ivanilde Cristina, minha mãezinha da vida, que sempre me apoiou nessa minha caminhada, me abrigou e nunca deixou faltar nada, que todos os dias me ensina sobre bondade, generosidade, paciência, humildade, respeito e principalmente a honrar minha família e amigos.

A UFRA, a instituição que me proporcionou vivências únicas, e que com certeza me tornou uma profissional humana, madura e consciente sobre peculiaridades e adversidades que temos em nossa sociedade.

Ao grupo PET Agronomia por ter me acolhido e contribuído para que minha formação fosse para além de uma sala de aula comum, representou uma sala de aula da vida real, forma diversas experiências que me tornaram alguém muito além de um profissional com conhecimentos técnicos. Meus agradecimentos especiais vão ao Professor Carlos Costa e ao Professor Rafael Viana, grandes mentores do grupo, agradeço a todos com os quais tive a honra que compartilhar essa vivência.

Também a Embrapa pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa. E a todos os estagiários do Laboratório de Biotecnologia, em especial a Gabriella Monteiro por toda ajuda e por ter sido essa “mãezona”. Aos assistentes do Laboratório Augusto, Gilberto e Isaías, também ao pesquisador Raimundo Parente e ao pesquisador Moisés Mourão.

A minha querida turma B, que mesmo em meio aos “trancos e barrancos” permaneceu unida e se tornou o refúgio mais próximo que tive nesses cinco anos compartilhados. Em especial aos meus queridos amigos Cinara Oliveira, Lizandra Siqueira, Samuel Miranda, Lêda Aragão, Érika Chagas, Raphael Sousa, Wenderson Ferreira e Leonardo Savino pelos bons e maus momentos que dividimos, essa amizade foi para além das salas de aulas e espero levar para vida.

Aos meus amigos de vida Wágner Rocha e Karina Melo que mesmo de longe sempre me apoiaram. Também aos meus queridos amigos Eduardo Torres e João Guilherme (Jota) por terem sido amigos, apoio e motivação nessa reta final.

A Dra. Joanne Moraes por aceitar nos orientar, pelos ensinamentos e conhecimentos trocados, principalmente pela paciência.

Meus eternos agradecimentos ao Dr. Oriel Lemos pelas orientações, acolhimento e a toda paciência que teve durante essa caminhada, pelos valores de humildade, generosidade e bondade que passou com maestria. Deus não poderia ter escolhido melhor pessoa para me guiar nessa fase. Espero ser ao menos um terço do profissional que és. Obrigada!

Agradecimentos especiais a minha querida dupla de TCC e amiga Ana Carolina Ribeiro. Você foi essencial para que pudéssemos chegar até aqui, agradeço por toda paciência e compreensão, pela amizade e cuidado que tens comigo. Obrigada por ter me aceitado e espero continuar dividindo mais caminhadas com você!

E agradeço a todos os que foram fundamentais para que eu pudesse chegar ao fim de mais esse ciclo.

Gabriela Tavares Pires

RESUMO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) tem elevada importância econômica por ser uma especiaria de grande valor e comercializada mundialmente. No entanto, uma das dificuldades na produção dessa cultura é a presença de doenças que influenciam diretamente a produtividade. Novas cultivares têm sido lançadas e métodos eficientes de propagação de plantas estão em desenvolvimento para garantir a qualidade fitossanitária da produção de mudas saudáveis. A obtenção de plântulas saudáveis *in vitro* a partir de sementes e a clonagem desse material apresentam-se como alternativa para a produção de plantas livres de patógenos. Visando dar suporte ao programa de melhoramento, o trabalho objetivou germinar, indexar e clonar plantas provenientes de polinização controlada do programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino. A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal e Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Foram selecionados frutos maduros oriundos de quatro diferentes genótipos do programa de melhoramento genético, cultivadas na área experimental da Embrapa, em seguida foram submetidas à assepsia. As sementes obtidas foram divididas em três grupos e inoculadas para germinar em tubos de ensaio contendo 10 mL de 3 diferentes combinações de meio básico MS de cultura. A extração de ácido nucléico foi realizada a partir de folhas jovens de plantas de pimenteira-do-reino provenientes da germinação *in vitro*. As amostras foram analisadas quanto à presença do PYMoV utilizando o teste molecular PCR (Reação em cadeia de Polimerase). Após serem estabelecidos *in vitro*, os genótipos foram submetidos ao primeiro subcultivo, os quais foram selecionados os melhores indivíduos das cultivares Iaçará e Panakotta e dos cruzamentos Panakotta x Iaçará e Uthirankotta x Kuthiravally inoculados em oito diferentes meios de cultivo. Após a coleta de dados foram realizados testes estatísticos. O cultivar Iaçará leva em média 68 dias a partir da radícula para formar plântula, já o cruzamento Uthirankotta x Kuthiravally foi com 71 dias, para os genótipos Panakotta x Iaçará e Iaçará com 96 e 101 dias respectivamente. Nos materiais avaliados não foi detectado a presença do vírus PYMoV. Para a germinação *in vitro* de sementes de genótipos de pimenteira-do-reino, deve ser utilizado o meio de cultura básico MS completo, 0,17 de NaH₂PO₄, carvão ativado 0,2% e suplementado com BAP e ANA 0,5 mg.L⁻¹. Os genótipos mostraram viabilidades variáveis no processo de multiplicação, destacando-se o híbrido Uthirankotta x Kuthiravally.

Palavras-chave: propagação de plantas, cultivo *in vitro*, *Piper nigrum* L.

ABSTRACT

The black pepper tree (*Piper nigrum* L.) is of great economic importance because it is a spice of great value and marketed worldwide. However, one of the difficulties in the production of this crop is the presence of diseases that directly influence productivity. New cultivars have been launched and efficient methods of plant propagation are under development to ensure the phytosanitary quality of healthy seedling production. Obtaining healthy seedlings in vitro from seeds and cloning this material is an alternative for the production of pathogen-free plants. In order to support the improvement program, the work aimed to germinate, index and clone plants from the controlled pollination of the genetic improvement program of the black pepper tree. The research was carried out in the laboratories of Genetic Resources and Plant Biotechnology and Plant Pathology of Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Ripe fruits from four different genotypes of the genetic improvement program, cultivated in the Embrapa experimental area, were selected and then submitted to asepsis. The obtained seeds were divided into three groups and inoculated to germinate in test tubes containing 10 mL of 3 different combinations of basic MS culture medium. The extraction of nucleic acid was performed from young leaves of chili plants from in vitro germination. The samples were analyzed for the presence of PYMoV using the PCR (Polymerase chain reaction) molecular test. After being established in vitro, the genotypes were submitted to the first subcultivation, which were selected the best individuals from the Iaçará and Panakotta cultivars and the Panakotta x Iaçará and Uthirankotta x Kuthiravally crossings inoculated in eight different culture media. After data collection, statistical tests were performed. The Iaçará cultivar takes an average of 68 days from the radicle to form seedlings, while the Uthirankotta x Kuthiravally cross was 71 days old, for the Panakotta x Iaçará and Iaçará genotypes 96 and 101 days old respectively. The presence of PYMoV was not detected in the evaluated materials. For in vitro germination of seeds of the pepper genotype, complete basic culture medium MS, 0.17 NaH₂PO₄, activated carbon 0.2% and supplemented with BAP and ANA 0.5 mg.L⁻¹ should be used. The genotypes showed variable viability in the multiplication process, highlighting the hybrid Uthirankotta x Kuthiravally.

Keywords: plant propagation, in vitro cultivation, *Piper nigrum* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estádios de germinação da pimenteira-do-reino, onde A (ERD), B (EHP), C (ERP), D (EFC), E (EE) e F (PF).....	19
Figura 2- Germinação <i>in vitro</i> de genótipos de pimenteira-do-reino em diferentes meios de cultivo até formação de plântulas. Embrapa. Belém/PA. 2019.....	20
Figura 3- Desenvolvimento interrompido e formação de estruturas anormais em genótipos de pimenteira do-reino germinados <i>in vitro</i> em diferentes meios de cultivo. Embrapa. Belém/PA.....	22
Figura 4- Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Iaçará em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.....	23
Figura 5- Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Panakotta em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.....	24
Figura 6- Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Panakotta x Iaçará em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.....	26
Figura 7- Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Uthirankotta x Kuthiravally em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.....	27
Figura 8 - Gel de PCR para PYMoV a partir de folhas jovens de pimenteira-do-reino provenientes de sementes. (M) Marcador 1kb ladder; (1 a 17) amostras. (18) Controle positivo; (19) Controle negativo.....	28
Figura 9- Número de brotos de pimenta-do-reino no primeiro no primeiro subcultivo em função das concentrações de BAP (mg.L ⁻¹) e AIA (mg.L ⁻¹).....	30
Figura 10- Genótipos Panakotta (A), Panakotta x Iaçará (B), Iaçará (C) e Uthirankotta x Kuthiravally (D)	32
Figura 11- Número de brotos de genótipos de pimenta-do-reino no primeiro subcultivo em função dos diferentes meios de cultivo.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DA CULTURA.....	10
3.2 IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA	11
3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CULTURA	12
3.4 APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS NA PIMENTEIRA-DO-REINO	12
3.5 VIROSES EM PIMENTEIRA-DO-REINO.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	15
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	16
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE POR PCR.....	17
4.4 MULTIPLICAÇÃO	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 GERMINAÇÃO	18
5.2 INDEXAÇÃO	27
5.3 MULTIPLICAÇÃO	29
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A Pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), pertencente à família Piperacea é a especiaria mais apreciada mundialmente devido seu sabor único. Uma planta originária da Ásia, altamente produtiva e de alto valor econômico, para os pepericultores tem grande importância dada sua rentabilidade (LIMA et al. 2010). Suas sementes são comercializadas desde o século VII, é uma cultura perene, semi-lenhosa, trepadeira e produzida em regiões de clima tropical (CHRIST, 2016).

Esse condimento pode ser usado como tempero de alimentos, no processamento de alimentos industrializados, conservante, na indústria farmacêutica e cosmética, e outros usos (LOURINHO et al., 2014; SILVA et al., 2017). Os maiores produtores mundiais são Vietnã, Indonésia, Índia e Brasil (SILVA et al., 2017).

No Brasil, seu cultivo foi iniciado no século XVII, após introdução por imigrantes portugueses nos estados litorâneos. Todavia, seu cultivo comercial se deu com a introdução da cultura no estado do Pará por colonos japoneses, em 1933 no município de Tomé-Açu, sendo a cultivar Cingapura a primeira a ser produzida (MENDONÇA e SILVA, 2019).

Na conjuntura atual, temos como maiores produtores do país e responsáveis pelo sucesso brasileiro os Estados do Pará, responsável por cerca de 50% da produção brasileira (79.371 t), seguido do Espírito Santo (ES) com 44% (IBGE, 2017). No Pará, as microrregiões produtoras mais importantes são Guamá, Tomé-Açu, Cametá e Bragantina, correspondendo a 80, 53% da quantidade produzida (IBGE, 2017). Seu cultivo se destaca pela possibilidade de ser produzido tanto por grandes como por pequenos produtores.

Nos plantios comerciais o método de propagação vegetativa é a mais empregada, especificamente a estaquia. A principal vantagem de uso desse método incide na uniformidade dos plantios devido a manutenção das características genéticas das plantas matrizes (FREIRE, 2013). Contudo, se não usado corretamente pode favorecer a disseminação de viroses e principalmente da fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e outros microorganismos fitopatogênicos, isso se deve ao uso de plantas doadoras contaminadas de lavouras próprias ou de terceiros (ALBUQUERQUE e DUARTE, 1977). A ocorrência dessas doenças tem exigido a renovação dos pimentais, em média a cada seis anos, elevando os custos de produção, reduzindo o período produtivo da cultura e tornando seu cultivo menos rentável (SANTOS, 2009).

No Brasil há relatos de viroses, como o PYMoV (*Piper yellow mottle vírus*) identificado no estado do Pará, um isomérico ainda não identificado, que pode causar redução significativa na produção da cultura. A sintomatologia consiste em manchas cloróticas, mosqueados, clareamento de nervuras, mosaico, nanismo, deformações foliares e queda na produção de frutos (ALBUQUERQUE et al., 1999; BRIOSO et al., 2000; PANTOJA et al., 2009). Entretanto, é possível identifica-lo também em plantas assintomáticas (SOUSA et al., 2011).

Os principais vetores para transmissão do vírus são as cochonilhas. Boari et al. (2010), identificou a cochonilha *Ferrisia virgata* e Sousa et al. (2010), a espécie *Planococcus minor* como vetores do PYMoV em território brasileiro. A propagação vegetativa também é um agente de disseminação do patógeno em campo.

As cultivares de pimenteira-do-reino disponíveis para cultivo são todas suscetíveis a fusariose devido a sua estreita base genética, de forma que não possuem mecanismos de defesa contra a infecção do agente patogênico, e o meio de disseminação tem sido a via propagativa, usando como fonte de estacas plantas doentes (ALVES et al., 2005). Dessa forma, a vulnerabilidade genética das cultivares a doenças e a acelerada disseminação dos patógenos contribuem para diminuir o ciclo produtivo da cultura (LEMOS, 2011).

Segundo Santos (2009) há necessidade de métodos eficientes de propagação de plantas vigorosas e sadias das cultivares recomendadas para cultivo visando a revitalização das plantas matrizes. Também o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas para obtenção de novos genótipos, com o objetivo de aumentar a diversidade genética. Esses avanços são relevantes para desenvolver plantas mais tolerantes ou resistentes a doenças, produtivas e adaptadas as diversas regiões produtoras.

Com base nisso, os programas de melhoramento genético têm adotado os cruzamentos como alternativa mais apropriada para criação de novos genótipos e maior variabilidade genética (WENZEL, 1985; MENDONÇA e SILVA, 2019). A partir dos genótipos obtidos via cruzamentos controlados é acompanhado o processo de germinação, que é uma forma de propagação onde busca-se variabilidade genética, especificamente para pimenteira-do-reino, é uma necessidade devido ao baixo índice de variação nos materiais disponíveis (MENDONÇA e SILVA, 2019). Essa metodologia visa o aproveitamento dessas plantas para a multiplicação *in vitro* e avaliação das progênes geradas dentro do programa de melhoramento genético, podendo selecionar combinações desejáveis (SANTOS, 2009). De modo a produzir mudas de alta qualidade

via cultura de tecidos, fornecendo propágulos sadios e mudas livres de organismos fitopatogênicos (ALVES et al.,2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Germinar, indexar e clonar plantas provenientes de polinização controlada do melhoramento genético da pimenteira-do-reino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a)Definir um meio de cultura para germinação *in vitro* de genótipos de pimenteira-do-reino oriundos do programa de melhoramento genético;

b)Avaliar o comportamento de quatro genótipos de pimenteira-do-reino na fase de multiplicação de plantas no processo de micropropagação;

c)Avaliar a ocorrência do vírus PYMoV em plantas de quatro genótipos de pimenteira-do-reino oriundos do programa de melhoramento genético.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DA CULTURA

O gênero *Piper* apresenta mais de 1.000 espécies, com destaque nas regiões tropicais para a *Piper nigrum* L. (LOURINHO, 2014),pertencente a classe das Dicotiledôneas, ordem Piperales e família Piperaceae, tem origem indiana, nativa das florestas de Kerala, região sul da Índia, sendo a especiaria que mais atraiu a atenção na época em que o comércio era feito pelo Oriente Médio e Europa, período da colonização portuguesa, os quais denominaram o condimento por pimenta-do-reino, termo pelo qual é conhecido até os dias atuais (DUARTE, 2004).

A pimenteira-do-reino é uma espécie semi-lenhosa, perene e de hábito trepador, cresce aderida ao tronco de árvores ou tutores mortos (DUARTE, 2004). Sua parte aérea é formada por dois tipos de ramos, os de crescimento (ortotrópicos) de onde saem raízes adventícias das regiões dos nós e ajudam a fixação da planta ao tutor, e os ramos de produção (plagiotrópicos) que crescem paralelamente ao solo, dos quais são emitidas as inflorescências que darão origem aos frutos. As folhas são alternadas, dos tipos cordiformes ou lanceoladas, variando os tons de verde de acordo com a cultivar (SERRANO et al., 2006; FREIRE, 2013).

O sistema radicular é composto por raízes laterais fasciculadas, encontradas em uma profundidade de no máximo 30 cm e raio de aproximadamente 60 cm ao redor da planta, ajudando a melhorar a fixação no solo (DIAS, 2006). As inflorescências são do tipo espiga pendulosa, também chamada de amentilho, com 5 a 20 cm de comprimento, com flores pequenas desprovidas de cálice e corola, na maioria hermafroditas. Os frutos são drupas sésseis, globosos, pequenos e indeiscentes, verdes quando imaturos e avermelhados quando maduros (GARCIA et al., 2000). A polinização natural ocorre por geitonogamia com a dispersão do pólen por gotículas de água ou da chuva, e o fruto se forma seis meses após a polinização (POLTRONIERE et al., 1999; MAGEVSKI, 2012; FREIRE, 2013).

3.2 IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA

O Brasil tem importância histórica na produção dessa especiaria, nos anos de 1980 a 1983 foi o que mais produziu pimenta, além de ter sido o maior exportador mundial nos anos 1980, 1982 e 1984, fato que apesar da crise veio a se repetir nos anos de 1990 e 1991, equivalente ao realizado em 1982 (HOMMA, 2008).

O cultivo de pimenteira-do-reino no Brasil é visto de forma positiva em diversos aspectos, seja econômico devido sua alta rentabilidade, principalmente quando se agrega valor ao produto, seja relacionado ao aspecto social, pois pode ser feito por agricultores familiares e gera empregos no campo, já que exige emprego de muita mão-de-obra (MOREIRA et al., 2006; ANDRADE et al., 2017).

Atualmente, a produção brasileira está distribuída nas regiões norte, nordeste e sudeste, especificamente os estados do Pará, Bahia e Espírito Santo. Sendo a região norte a maior produtora, especificamente a produção paraense, que foi introduzida por imigrantes japoneses em 1930, alavancando a produção brasileira (CARNEIRO JUNIOR et al., 2017). Diante disso, a produção foi estimulada e expandida no estado paraense.

A pepericultura é uma das atividades de maior relevância para o agronegócio paraense, assume papel de destaque nas exportações agrícolas e na ocupação de mão-de-obra no meio rural (CARNEIRO JUNIOR et al., 2017). Visto que, cada tonelada de pimenta colhida equivale a uma mão de obra empregada, gerando milhões de dólares em receitas e milhares de empregos (LEMOS et al., 2011).

3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO DA CULTURA

Os programas de melhoramento convencionais ou não convencionais possibilitam a criação de variabilidade genética na população seguinte por meio da seleção de genótipos de interesse (WENZEL, 1985). A maior parte da variabilidade genética presente tem ocorrência de forma natural, onde são preservadas em banco de germoplasma. No entanto, os genes de interesse presentes em indivíduos distintos são obtidos por meio de métodos convencionais e avançados. Os cruzamentos são estratégias simplificadas que possibilitam a produção de novas recombinações de genes desejáveis (LEMOS et al., 2011).

A seleção é fundamental para os melhoristas no momento de reconhecer dentro de uma população em que há variabilidade os melhores genótipos requeridos pelos produtores agrícolas, agroindústrias e consumidores. Buscam-se plantas mais adaptadas às mudanças ambientais; mais tolerantes a pragas e doenças; mais eficientes na utilização de nutrientes e mais produtivas e de melhor qualidade (LEMOS et al., 2011).

A recombinação, hibridação e mutação, de forma espontânea ou induzida, são os aspectos mais fundamentais para gerar variabilidade em plantas (DONINI e SONNINO, 1998). Para a pimenteira-do-reino no estado do Pará, se faz necessária adquirir variação, devido a baixa variabilidade nos materiais disponíveis (CASSELS, 1998).

Uma das estratégias utilizadas é a obtenção de híbridos intraespecíficos oriundos de polinizações controladas, para obter combinações que possam expressar caracteres produtivos superiores aos progenitores (vigor do híbrido) (LEMOS et al., 2011).

3.4 APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS NA PIMENTEIRA-DO-REINO

As técnicas de cultura de tecidos e de biologia molecular têm grande relevância por promover diversas aplicações como, multiplicação acelerada de genótipos superiores, micropropagação em massa, conservação e intercâmbio e germoplasma, clonagem de genes e obtenção de plantas transgênicas, mutagênese, variação somaclonal, cultura de antera, limpeza clonal, produção de sementes artificiais. Essas ferramentas contribuíram de forma significativa com o avanço da pesquisa, tornando-se essenciais para auxiliar no melhoramento de muitas culturas, principalmente aquelas das quais os problemas não são possíveis de solucionar por intermédio do melhoramento convencional (NITZSCH, 1983; KRIKORIAN, 1990).

A cultura de tecidos é uma técnica com vasta aplicação na agricultura, a qual pequenos fragmentos de tecido vivo, denominados explantes, são separados de um organismo vegetal, desinfestados assepticamente e cultivados em condições químicas e físicas controladas, visando a obtenção de uma nova planta idêntica à original. O explante pode ser um fragmento de caule, raiz ou de algum tecido que ao inoculado ao meio de cultura responda de forma positiva à regeneração *in vitro*. Essa competência é chamada de totipotência, onde células vegetais expressam-se em momentos distintos e sob estímulo apropriado com capacidade de originar um novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000).

O cultivo *in vitro* possui elevado potencial para dar suporte ao programa de melhoramento vegetal, pois essa técnica possibilita a multiplicação em larga escala, em menor área e com tempo reduzido de materiais elite e de plantas livres de patógenos (RAMOS, 2018). De acordo com Lameira et al., (1996), a multiplicação *in vitro* de um explante possibilita a produção de até 1.500 plantas por ano.

As estratégias de cultura de células e tecidos viabilizam a regeneração de plantas por meio da organogênese (formação de gemas caulinares) ou pela embriogênese (embriões somáticos). Essas vias de regeneração de plantas, podem ser uni ou multicelular, originam-se de forma direta proveniente de células do tecido primário ou de maneira indireta via formação de calos (VIEIRA e GLÓRIA, 2001).

A micropropagação ou propagação clonal proporciona a multiplicação de plantas geneticamente iguais. Além disso, possibilita a obtenção de materiais sadios, por meio da assepsia realizada nos explantes e das condições estéreis adotadas (RAVEN; EVERT; EICHOHORN, 2001). Essa técnica é empregada para potencializar o número de plantas regeneradas com a preservação da herança genética, assim contribuindo para ampla diversidade das condições de cultivo *in vitro*, objetivando a obtenção de novas cultivares e para fornecer outras possibilidades aos programas de melhoramento (CARVALHO et al., 2006)

A técnica de micropropagação via organogênese *in vitro* é considerado complexo, devido ação de vários fatores internos e externos, incluindo a influência do meio de cultura, fonte de explante e fatores do ambiente (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Além disso, também depende da atuação dos reguladores de crescimento e da competência do tecido em responder as transformações hormonais no decorrer do período de cultivo (ASSIS e MAFIA, 2007).

Contudo, ainda que essa técnica tenha avançado muito nos últimos anos, são poucos os trabalhos encontrados em piperáceas, apesar de apresentarem grande viabilidade na regeneração de espécies recalcitrantes (ASSIS e MAFIA, 2007). Alguns estudos de regeneração por meio de diferentes tipos de explantes e criação de protocolos têm sido definidos para espécies de piperáceas: *P. colubrinum* (KELKAR et al., 1996), *P. methysticum* (ZHANG et al., 2008), *P. umbellatum* (SCHWERTNER et al., 2008), *P. nigrum* (AHMAD et al., 2010); *P. longum* (RANI e DANTU, 2012) e *P. aduncum* (SOUSA, 2013).

3.5 VIROSES EM PIMENTEIRA-DO-REINO

Um dos problemas que a cultura da pimenteira-do-reino enfrenta são as doenças causadas por vírus. No mundo, foram identificados quatro vírus, um Closterovirus, o *Cucumber mosaic virus* (CMV), um isométrico ainda não identificado e o *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) (BHAT; CHANDEL; MALIK, 1995).

Em destaque, o vírus *Piper yellow mottle virus* (PYMoV), pertencente à família *Caulimoviridae* e gênero *Badnavirus*, é composto por partículas baciliformes de 125 x 30 nm de dimensão, com DNA de fita dupla, causando a doença denominada mosqueado amarelo, a qual acarreta em grandes perdas de produção quando acometida em elevada frequência no pimental, e quando associada a fusariose (BOARI et al., 2010).

Os sintomas ocasionados pelo PYMoV são, clareamento de nervuras, clorose, deformação foliar, descoloração dos vasos e pontos necróticos nos tecidos internos dos ramos, folhas com numerosas manchas cloróticas tornam-se completamente amareladas; mancha de coloração amarelo limão brilhantes mosqueado, má-formação foliar. Em folhas intensamente infectadas podem aparecer bolhas no limbo. Causa redução da produção de frutos por espiga. Além disso, o crescimento das plantas é lento, sendo fonte para manter o vírus como por longo tempo (DUARTE et al., 2000).

Contudo, Boari et al. (2010) constataram que é comum no campo a planta estar assintomática e apresentar o PYMoV, mostrando assim que não se deve confiar na sintomatologia para seleção de plantas sadias. O que o torna preocupante para a produção da cultura.

Há duas formas de disseminação desse vírus, por cochonilhas ou por mudas contaminadas (OLIVEIRA et al., 2010). Foram detectadas a presença de sintomas de viroses em mudas oriundas de sementes de plantas contaminadas, indicando a transmissão de vírus por sementes na Embrapa Amazônia Oriental, contudo é necessário o teste

molecular para comprovar esta transferência do PYMoV. No entanto, Silva, Jones e Shaw (2002) verificaram que o PYMoV não é transmitido pelas sementes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal e no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, o qual procedeu-se em etapas:

4.1 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

Para a germinação, inicialmente foram coletados frutos maduros de plantas de dois cruzamentos intraespecíficos de pimenteira-do-reino (Panakotta x Iaçará), (Uthirankotta x Kuthiravally) e de duas cultivares (Panakotta e Iaçará) cultivadas na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental. Os frutos inicialmente foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5% e colocadas em estufa a 37 °C por 12 horas, após esse período, foram despulpadas e lavadas com detergente neutro. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes, obtidas após a maceração dos frutos, foram colocadas em solução fungicidas (Nativo® a 0,4 % e Derosal® a 0,2 %) por 20 minutos, em álcool a 70% por 1 minuto e por em solução de NaClO 1 % por 15 minutos, para em seguida serem lavadas em água destilada autoclavada por cinco vezes.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de 3 diferentes combinações de meio básico de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), o primeiro meio (T1), foi composto de MS e vitaminas de White, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e acrescido de 0,5 mg.L⁻¹ BAP (6- benzilaminopurina) e 0,5 mg.L⁻¹ ANA (ácido 1-naftalenoacético). O segundo meio (T2), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade da concentração dos macro e micronutrientes) MS e vitaminas de White, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e com 0,5 mg.L⁻¹ BAP e 0,5 mg.L⁻¹ ANA. O terceiro (T3), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade das concentrações dos macros e micronutrientes) MS e vitaminas de White, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹. Todos os meios foram suplementados com sacarose a 3% e phytagel a 0,2 %, com o pH do meio de cultura ajustado para 5,8, e a autoclavagem realizada a 120 °C e 1 atm por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 X 4, sendo três meios de cultura e 4 genótipos de pimenteira-do-reino, totalizando 12 tratamentos, e o número de repetições variou de acordo com as sementes disponíveis de cada genótipo provenientes de cruzamentos controlados ou polinização aberta. As sementes foram transferidas para tubo de ensaio, uma por tubo, contendo o meio de

cultura, mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ \text{C}$), fotoperíodo de 16 h, e luminosidade de 3.000 lux.

As avaliações foram quanto ao número de dias que cada genótipo levou para emitir cada estrutura do processo de germinação, considerando as variáveis emissão de radícula, hipocótilo, raiz, folhas cotiledonares, epicótilo e plântula após DAS (Dias Após o Semeio). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo programa Sisvar, e teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de ácido nucléico foi realizada a partir de folhas jovens de plantas de pimenteira-do-reino, segundo o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997), modificado. Para a extração de DNA, foram coletadas folhas de acessos de pimenteira-do-reino do Banco de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém (PA). Como controle positivo foi utilizado folhas de uma planta infectada com o PYMoV e como controle negativo foi usado folhas de uma planta sadia.

Foram pesados 100 miligramas de tecido foliar e em seguida colocadas em cadinhos de porcelana previamente gelados, adicionando-se depois 1600 μL do tampão de lavagem Wash buffer e 50 μL β -Mercaptoetanol e, após, maceradas com auxílio do pistilo previamente gelado. Após a maceração, o macerado foi transferido para um tubo (eppendorf) de 2,0 ml e centrifugado por 5 minutos à 4°C e 13.200 rpm. Em seguida descartou-se o sobrenadante, e adicionou-se 800 μL do tampão de extração CTAB, vortexado até ressuspender completamente e incubado em banho-maria a 55°C por 30 minutos. A seguir foram adicionados 800 μL de Clorofórmio: álcool iso-amílico (24:1) e vortexado por 1 minuto e então realizada a centrifugação por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo de 2,0 ml e novamente adicionou-se 800 μL de Clorofórmio: álcool iso-amílico (24:1) e vortexado por 1 minuto e mais uma vez centrifugado por 10 minutos. Após essas etapas a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL adicionando-se 700 μL de Isopropanol (álcool isopropílico) gelado e 60 μL de Acetato de amônio, e inverteu-se o tubo por 15 vezes. Posteriormente o conteúdo do tubo foi centrifugado por mais 10 minutos e o sobrenadante foi descartado, lavou-se o pellet adicionando 1 mL de Etanol 70% e centrifugou-se por 2 minutos, descartando-se novamente o sobrenadante e deixando o pellet secar completamente. Dando continuidade ressuspendeu-se o pellet em 50 μL de H₂O ultrapura e a estocagem foi realizada a -20°C . Todas as amostras foram submetidas ao processo de Eletroforese

para que fosse observada a qualidade da extração. Para a realização da eletroforese foi preparado o gel para corrida, composto por 150 mL de tampão TBE e 1,2 g de Agarose, após o preparo do gel foi feita uma mistura de 2 mL de corante + 2 mL de Gelred + 3 mL de DNA de cada amostra.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE POR PCR

As amostras foram submetidas ao teste de RCA para replicação unidirecional de ácido nucleico. Nessa etapa foram utilizados 2,5 µL de tampão e 0,5 µL de DNA, e as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos e imediatamente permaneceram no gelo por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2,5 µL de tampão da reação e 0,1 µL de Enzima, e posteriormente as amostras foram mantidas em uma BOD por 18 h em temperatura de 28°C. Após isso as amostras permaneceram por 10 minutos a uma temperatura de 65°C, e foi realizada a diluição na proporção de 1 µL de RCA para 9 µL de H₂O.

Posteriormente as amostras foram analisadas quanto à presença do PYMoV utilizando o teste molecular PCR (Reação em Cadeia de Polimerase). Para isso utilizou-se os primers PYMoV-F e PYMoV-R, 3 µL do ácido nucléico, 2,5 µL do tampão de reação 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,15 µL da Taq DNA Polimerase, e 16,85 µL de água ultrapura. Logo após o material foi levado para o termociclador, onde a reação consistiu de 30 ciclos de 94°C, 48°C e 72°C, com duração de um minuto além de duas extensões de 72°C por 2 minutos. Fragmentos de DNA foram observados e fotografados sob luz UV após a corrida eletroforética em gel de agarose (1,0%) e coloração em GelRed.

4.4 MULTIPLICAÇÃO

As plantas provenientes de sementes foram multiplicadas e estabelecidas *in vitro*. Posteriormente foram escolhidos e multiplicados alguns acessos para ser feito o subcultivo. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 40 mL de 8 diferentes combinações (tabela 1) de meio de cultura MS com vitaminas de White e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina BAP (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg.L⁻¹) e duas concentrações de ácido 3-indolacético AIA (0,0 e 0,2 mg.L⁻¹), suplementado com sacarose a 3%, e phytigel a 0,2 %.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 8 X 4, oito meios de cultura e 4 genótipos de pimenteira-do-reino, num total de 32 tratamentos, com

4 repetições. Foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 3^\circ \text{C}$), fotoperíodo de 16h, e luminosidade de 3.000 lux. Os dados foram submetidos às análises de variância pelo programa Sisvar, e teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Tratamentos e doses de BAP e AIA utilizadas.

TRATAMENTO	BAP(mgL ⁻¹)	AIA(mgL ⁻¹)
T1	0,25	0,2
T2	0,50	0,2
T3	0,75	0,2
T4	1,00	0,2
T5	0,25	0,0
T6	0,50	0,0
T7	0,75	0,0
T8	1,00	0,0

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 GERMINAÇÃO

No processo germinativo das sementes dos genótipos de pimenteira-do-reino estudados neste trabalho, houveram diferenças para cada etapa da morfogênese considerando os efeitos dos genótipos, meios de cultura e a interação genótipos e meios de cultura (tabela 2).

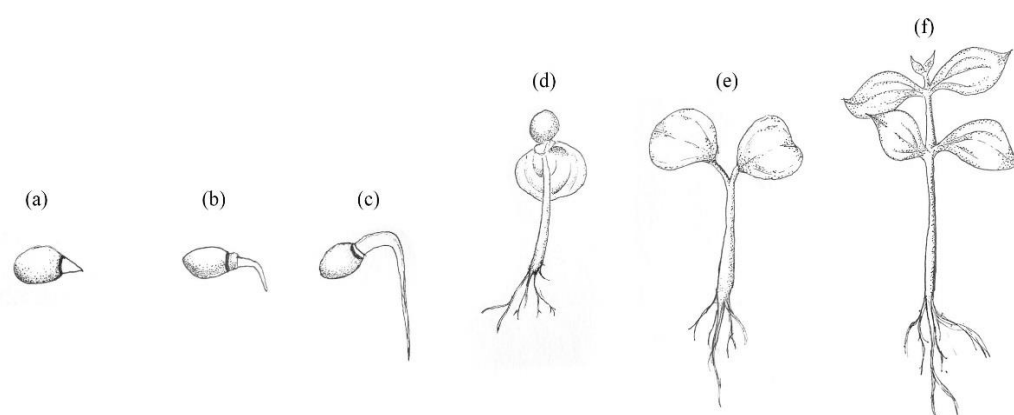
Tabela 2 – Teste F das médias de dias para formação de cada estrutura morfológica de plântulas de pimenteira-do-reino.

F.V	TESTE F					
	ERD	EHP	ERP	EFC	EE	PF
GENÓT.	1.35 ^{ns}	3.10 ^{**}	3.55 [*]	1.04 ^{ns}	1.94 ^{ns}	98.03 ^{**}
MEIO	7.47 ^{**}	5.13 ^{**}	1.85 ^{ns}	1.27 ^{ns}	0.52 ^{ns}	2.81 ^{**}
G X M	7.35 ^{**}	3.64 ^{**}	1.94 ^{ns}	1.48 ^{ns}	1.43 ^{ns}	3.10 [*]
CV (%)	37.70	68.03	94.88	103.37	106.59	102.06

F. V: fontes de variação; * e ** significativo a 1 e 5% respectivamente de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada.

De acordo com Bewley e Black (1994), a primeira etapa da germinação se processa com a absorção de água pela semente, mediante embebição, caracterizando o intumescimento a nível de embrião. A absorção da água é determinada pela sua disponibilidade, pela composição química da semente, permeabilidade do tegumento, temperatura e qualidade fisiológica da semente (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Na segunda etapa, o embrião rompe a casca e emite a radícula e as primeiras raízes laterais. É importante frisar que o embrião é composto por dois meristemas, o caulinar e o radicular e são independentes, segue emitindo o hipocótilo, posteriormente tem a formação da raiz principal e pelos radiculares; abertura das folhas cotiledonares vem em seguida; depois emissão do epicótilo, desenvolvimento do primeiro par de folhas definitivas, que terão a função de fotossíntese, e por último a queda das folhas cotiledonares (MOTOKANE, 2018) (figura 1).

Figura 1- Estádios de germinação da pimenteira-do-reino, onde a (ERD), b (EHP), c (ERP), d (EFC), e (EE) e f (PF).

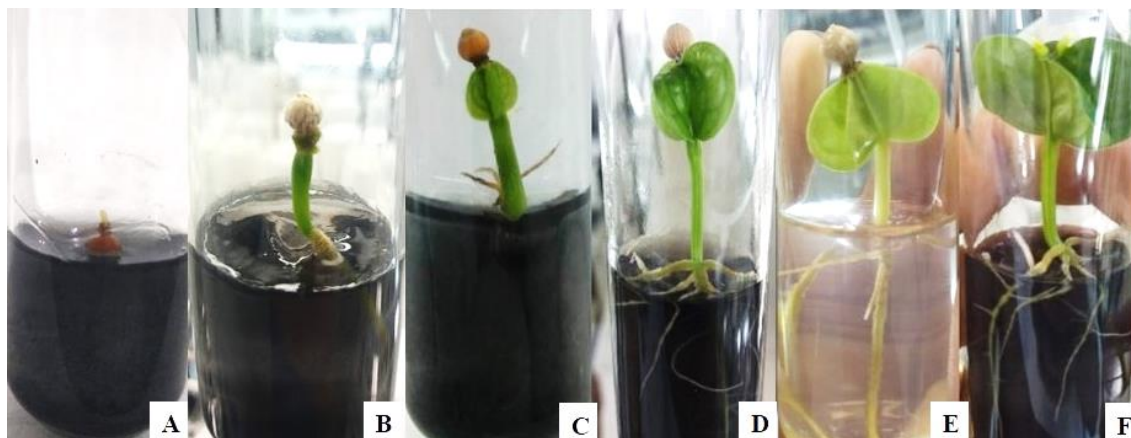


Fonte: VIEIRA (2019).

Além disso, para germinação *in vitro*, usou-se suplementação de BAP e AIA em dois meios de cultivo. Nessa etapa o material ainda não consegue sintetizar e está usando suas reservas, por isso usa-se a mesma concentração de ambos os reguladores. Para germinação *in vitro* do cultivar Bragantina usou-se meio MS suplementado com BAP 0,5 mg.L⁻¹ e ANA 0,5 mg.L⁻¹ (RIBEIRO et al., 2019).

No trabalho, não foi avaliado intumescimento, pois a variação de dias para intumescer e emitir radícula foi muito acentuado. No entanto, foi possível acompanhar e identificar as etapas seguintes do processo de diferenciação de formação de plântulas normais dos genótipos estudados (figura 2).

Figura 2 – Germinação *in vitro* de genótipos de pimenteira-do-reino em diferentes meios de cultivo e formação de plântulas. Embrapa. Belém/PA. 2019.



Fonte: autores.

Na tabela 3, observamos as médias para cada fase morfológica, levando em consideração como fonte de variação somente as diferentes combinações de meio MS. Para a variável radícula, não houve diferença entre os diferentes meios de cultivo, ou seja, a composição do meio não interfere no tempo de emissão da radícula, de forma que essa estrutura depende das reservas e influencias hormonais contidos na própria semente. Todavia, quando comparadas as médias dos genótipos (Tabela 4), observou-se diferença entre os materiais, os genótipos Iaçará e Uthirankotta x Kuthiravally foram mais precoces, já os demais foram tardios. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido a herança genética dos parentais e/ou os embriões estarem em estádios de maturação mais avançados. Com relação ao hipocótilo, não houve diferença entre os distintos meios de cultura. No entanto, na comparação entre os genótipos verificou-se que o híbrido Uthirankotta x Kuthiravally alcançou menor média, contrastando com o cruzamento Panakotta x Iaçará com maior média.

Tabela 3 – Germinação média (em dias) *in vitro* de sementes de diferentes genótipos de pimenteira-do-reino em diferentes composições de meio de cultura.

F.V	MÉDIAS					
	ERD	EHP	ERP	EFC	EE	PF
M1	36.97	54.23	37.47	42.56	59.89 a	80.62
M2	37.56	53.17	35.37	34.53	42.76 ab	59.00
M3	37.02	47.88	26.97	31.25	38.40 b	57.80

F. V: fontes de variação; M: meio de cultura; Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de

epicótilo; PF: plântula formada.

Após a formação do hipocótilo ocorreu a emissão das raízes. Para essa variável tanto nos meios de cultivo quanto na comparação entre os genótipos não foram verificadas diferenças significativas. Quando comparado os genótipos em relação ao tempo de emissão das folhas cotiledonares, o material Uthirankotta x Kuthiravally destacou-se com a menor média de dias. Contudo, ao avaliar nos meios de cultivo não houve distinção nas médias de dias. Já para emitir o epicótilo, aferiu-se diferença significativa entre os meios de cultivo, no qual o meio ½ MS sem adição de reguladores de crescimento foi o que registrou a menor média de dias para a formação dessa estrutura. Da mesma forma, quando avaliado os distintos genótipos, o cruzamento Uthirankotta x Kuthiravally continuou o mais precoce. Em seguida, para a formação de plântula sobressaiu-se o híbrido Uthirankotta x Kuthiravally quando comparado aos outros genótipos, todavia nas diferentes composições de meio de cultura não ocorreu diferença.

Tabela 4 – Comparação de médias em dias para os genótipos de pimenteira-do-reino germinadas *in vitro* em diferentes meios de cultura.

GENÓTIPOS	MÉDIAS					
	ERD	EHP	ERP	EFC	EE	PF
Iaçará	25.52 b	31.85 bc	35.95	43.61 b	52.47 ab	64.28 ab
Panakotta	38.86 a	55.49 ab	31.84	35.48 ab	47.51 ab	68.00 ab
Panakotta x Iaçar	48.27 a	66.44 a	48.38	49.83 a	57.33 a	81.94 a
Uthirankotta x Kuthiravally	20.00 b	18.00 c	23.83	10.41 c	15.83 b	16.83 b

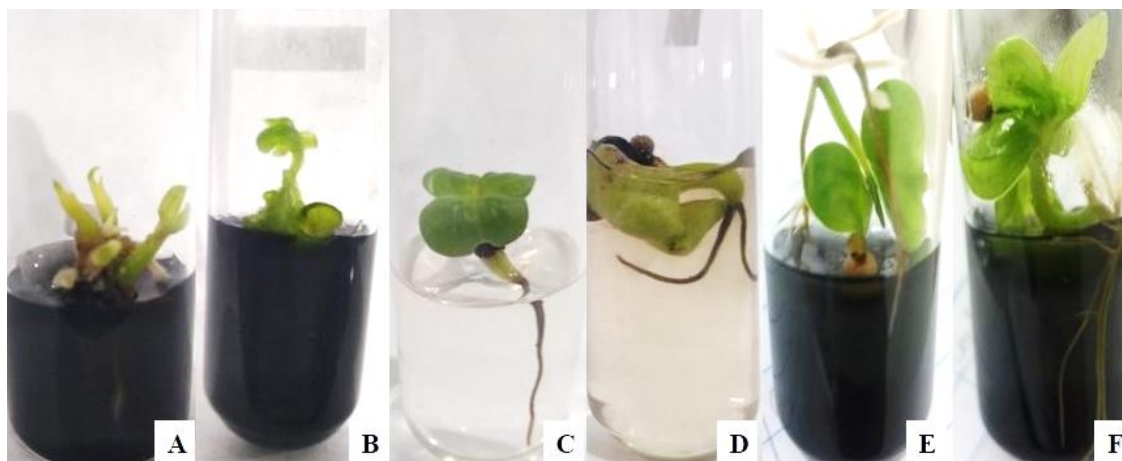
Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada.

Além disso, é necessário salientar que o alto CV verificado (tabela 2), foi ocasionado pelo baixo número de sementes que conseguiram completar todo esse processo. Neste processo de germinação, cada semente representou um indivíduo, consequentemente é comum que o processo seja heterogêneo e que alguns materiais não completem o ciclo. A perda de sementes ocorreu por contaminação, principalmente por fungos, mas em níveis baixos; por sementes que não chegaram a iniciar a germinação, ou seja, que perderam viabilidade; também foi observado durante o experimento que alguns indivíduos começaram seu desenvolvimento, porém, emitindo estruturas anormais (figura 3). Essas anormalidades podem ter sido causadas por possíveis danos que o embrião sofreu durante o manuseio até inoculação ou ainda por má formação do próprio embrião.

Ademais, a perda de viabilidade das sementes, entre outros motivos pode se

relacionar com as condições de cultivo, cultivar, a planta matriz pode ter produzido material com baixa viabilidade, contaminação por microrganismos maléficos (SANTOS; LEMOS; RODRIGUES, 2009).

Figura 3 – Desenvolvimento interrompido e formação de estruturas anormais em genótipos de pimenteira do-reino germinados *in vitro* em diferentes meios de cultivo. Embrapa. Belém/PA. 2019.



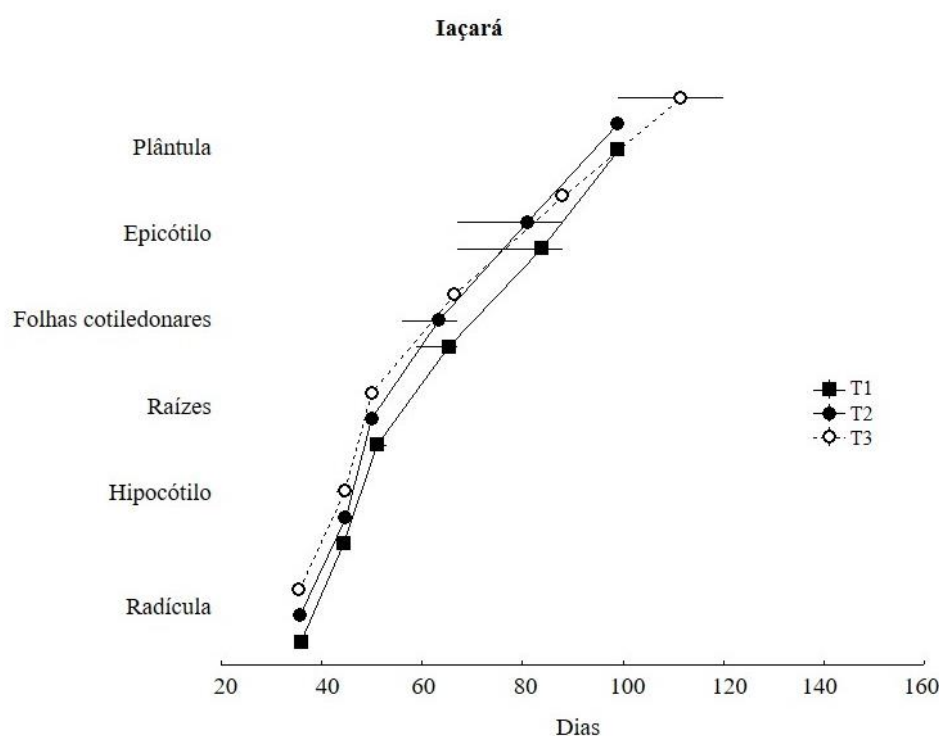
Fonte: autores.

A reprodução sexuada é uma via que normalmente se adota quando se tem material selecionado e melhorado, que responde com boa uniformidade e tem curto período de germinação, sendo facilmente estabelecidas em plantios comerciais. Contudo, para espécies como a pimenteira-do-reino, plantas obtidas dessa maneira além de serem distintas da planta-mãe, também apresentam longo período juvenil o que retarda o período produtivo (PIO et al., 2005). Dessa forma, espera-se que as sementes apresentem diferenças nesse processo e que formem materiais distintos, porém, necessários já que se busca variabilidade genética neste trabalho.

Na figura 4, pode ser observado o comportamento do cultivar Iaçará para emissão de cada estrutura germinativa nos diferentes meios de cultivo, entretanto, foi analisado anteriormente que estes não diferiram e que pode ser posto para germinar em qualquer uma das três composições. A radícula pode ser observada entre 30 a 40 DAS (Dias após o semeio); o hipocótilo entre 40 a 50 DAS; as raízes se desenvolvem entre 50 a 60 DAS; folhas cotiledonares se abrem entre 60 e 80 DAS; o epicótilo se desenvolve com aproximadamente 90 DAS e temos o primeiro par de folhas definitivas entre 100 e 120 DAS. No geral, se levar em consideração o tempo total para formação de plântula e descontar o tempo que leva para emissão da radícula, temos que esse genótipo leva em média 68 dias para obter a plântula (tabela 5). Segundo Santos, Lemos e Rodrigues (2009), em seu ensaio sobre germinação usando cultivares de pimenteira-do-reino, o processo de germinação que leva em média 90 DAS pode continuar ocorrendo, pois não

há uniformidade quando se trabalha com sementes dessa espécie. Ou seja, a cultivar Iaçará teve bom desempenho quando se descontou o tempo antes da emissão da radícula, haja vista que uma semente só germina quando o seu embrião atinge o máximo de maturidade, sendo assim uma forma de equiparar as condições para cada uma das sementes.

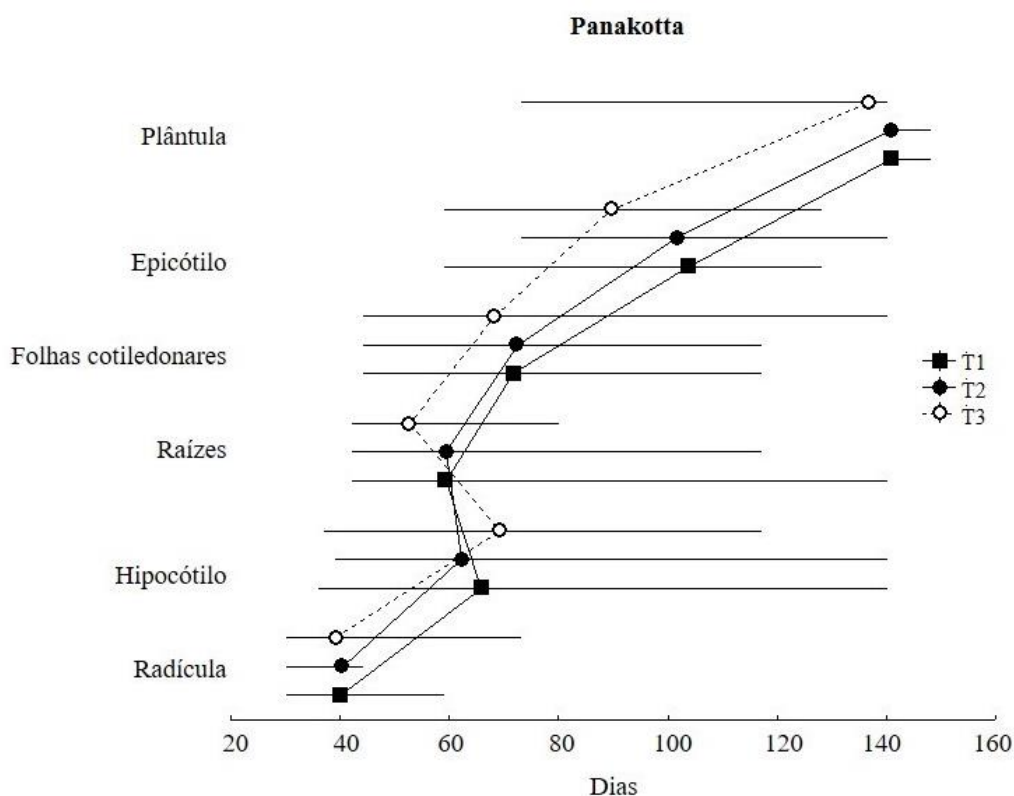
Figura 4 – Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Iaçará em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.



Observou-se no genótipo Panakotta (figura 5) um padrão de germinação entre os meios de cultivo. A emissão da radícula ocorreu aos 40 DAS aproximadamente; posteriormente, houve a formação das raízes, entre 50 e 60 dias; seguindo o crescimento do hipocótilo com cerca de 70 dias; as folhas cotiledonares abriram entre 70 e 80 dias; já o epicótilo foi emitido entre 90 e 100 dias; e o crescimento do primeiro par de folhas definitivas foi com mais ou menos 140 dias. De forma, que esse processo não está seguindo a sequência normal de germinação, e esse fenômeno fica mais acentuado no meio T3, onde a variação de dias entre desenvolvimento de raízes e posteriormente o hipocótilo é maior. Essa anormalidade pode ser ocasionada pela falta de reservas no endosperma, levando a um desequilíbrio para o pleno amadurecimento do embrião e a formação dos meristemas caulinares e radiculares. O segmento mais essencial da semente

é o eixo embrionário, por ter capacidade de desenvolver-se, devido a existência de dois tecidos meristemáticos nas extremidades. Com isso, promove o crescimento desses eixos nas duas direções, o apical e o das raízes, assim formando uma plântula (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Figura 5 – Tempo de emissão das estruturas morfológicas do genótipo de pimenteira-do-reino Panakotta em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.



Portanto, o uso de reguladores de crescimento e fontes de nutrição externas são importantes para completar o desenvolvimento. Já nos demais meios usados, há a formação dessas estruturas de forma desordenada, porém é em menor escala quando comparada ao T3. Os principais reguladores para pimenteira são citocininas e auxinas, que podem atuar tanto como promotores como inibidores de crescimento, também estão associados com a ocorrência de dormência e germinação (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Além disso, foi adotado o período do semeio até formação de plântula e observou-se que os materiais se desenvolveram em períodos bem distintos, foram observadas sementes bem precoces e sementes tardias, demonstrando que haviam embriões com diferentes estádios de maturação. E ao se trabalhar com médias gerais para analisar esse tipo de dado, os valores podem ter ficado mascarados e causando grandes alterações nas

médias resultantes, portanto, esse gráfico pode não ter representado o fenômeno de forma coerente. Contudo, ao adotar a emissão da radícula como o dia zero é possível verificar a germinação de forma mais precisa, pois foi considerado o estágio em que os embriões estiveram em plena maturidade, e assim quantificado o tempo para formar a plântula (tabela 5).

Tabela 5 - Médias de dias para formar plântula adotando a emissão de radícula como dia 0.

GENÓTIPOS	MÉDIA
Iaçará	68
Panakotta	101
Panakotta x Iaçará	96
Uthirankotta x Kuthiravally	71

Já na figura 6, pode ser verificado o comportamento do híbrido Panakotta x Iaçará quanto a germinao. Mesmo sem diferir nas análises estatísticas,  possível perceber que há diferenças interessantes para cada meio de cultivo utilizado. Para emissão da radícula foi verificado três médias distintas em cada condição de cultivo, sendo que o mais precoce ocorreu ente 20 e 30 DAS no meio T1, contendo fitorreguladores, NaH₂PO₄ e carvão ativado, e o mais tardio ocorreu entre 80 e 90 DAS em meio T3, sem reguladores e sem carvão.

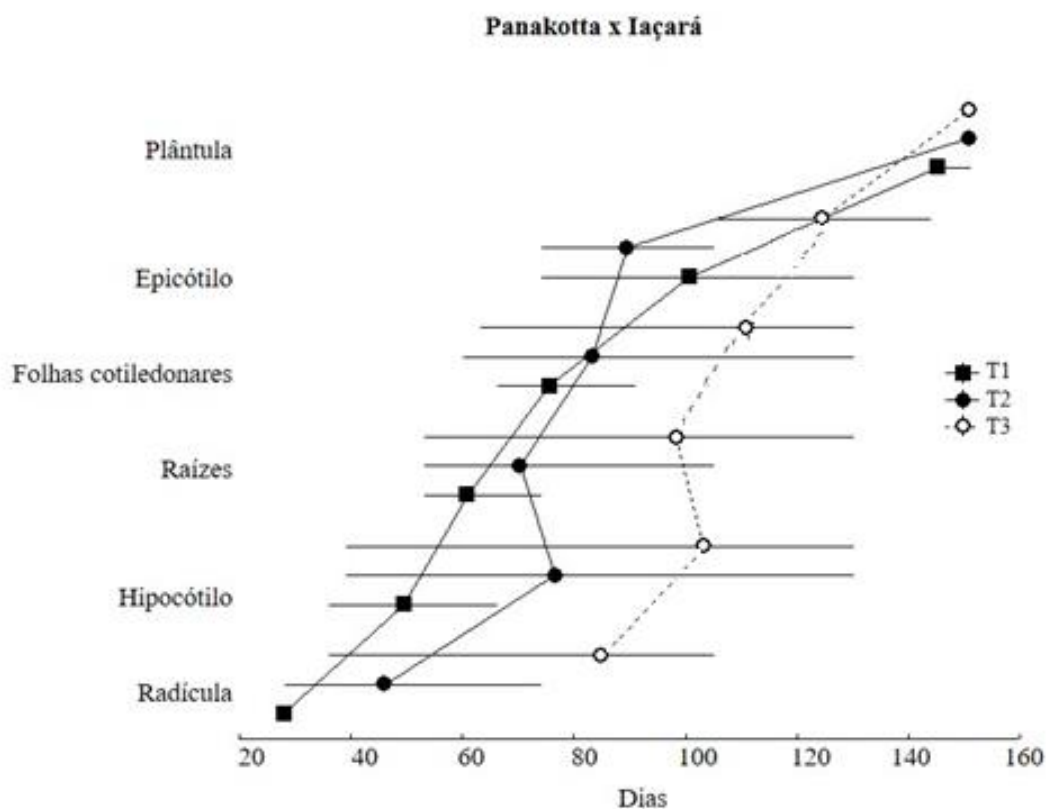
O desenvolvimento do hipoctulo para o meio T1 ocorreu entre 40 e 60 DAS, para os demais meios ocorre um padrão de crescimento semelhante ao acesso Panakotta (figura 4), na qual ocorreu primeiro a formação de raízes. Há nesse caso uma situação de parentesco, na qual o genótipo apresenta genes do cultivar Panakotta, onde também está ocorrendo primeiro a emissão das raízes e depois hipoctulo, contudo no meio T1 está emitindo o hipoctulo e depois as raízes, considerado a via de crescimento padrão.

 possível verificar a abertura do par de folhas cotiledonares entre 70 e 110 DAS, sendo o meio completo T1 o mais precoce; a emissão do epictulo entre 80 e 120 DAS, e as sementes do meio T3 levaram mais dias para forma essa estrutura, sinalizando novamente que a falta de reguladores de crescimento pode prejudicar a germino; foi possível observar o primeiro par de folhas definitivas entre 140 e 150 DAS.

A germino de sementes de pimenteira-do-reino ocorre em média com 90 dias ou mais após o semeio (SANTOS; LEMOS; RODRIGUES, 2009). Nesse sentido, o material avaliado foi mais tardio que a média, no entanto se considerar que as sementes

estavam em estádios diferentes de maturação e avaliar a partir da emissão da radícula o período para formar planta, a média foi em 96 dias (tabela 5).

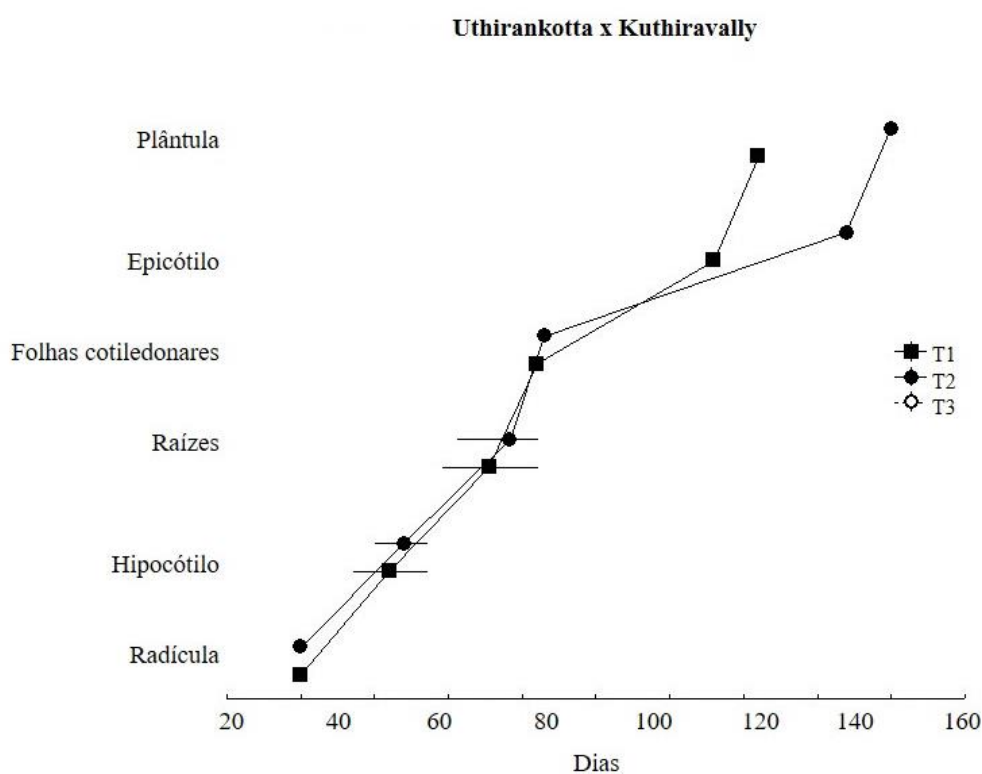
Figura 6 – Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Panakotta x Iaçará em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.



Em relação ao cruzamento Uthirankotta x Kuthiravally (figura 7), foi verificado que o meio do T3 não respondeu, devido não ter sido observada germinação. Pode ter ocorrido por incompatibilidade do genótipo com a condição de cultivo, pois as sementes inoculadas nos demais meios passaram pelas mesmas condições e ocorreu germinação. Nesse material, podemos verificar a radícula com aproximadamente 30 DAS em ambos os meios; o hipocótilo entre 50 e 60 DAS; raízes entre 60 e 80 DAS; o par de folhas cotiledonares são vistas entre 80 e 90 DAS; já o epicótilo varia entre ambos os meios, sendo o mais precoce T1 entre 100 e 120 DAS e o mais tardio entre 120 e 140 DAS; e emissão do par de folhas definitivas no T1 foi observado entre 120 e 130 DAS e no T2 com aproximadamente 150 DAS. No geral, esse material teve diferença de 20 dias para formação de plântulas quando subtraído os dias para emissão da radícula, indicando que tem processo de germinação tardio. Essa diferença é interessante visto que quanto mais tempo para germinar maiores os investimentos para manutenção no laboratório e maior período para obtenção de explantes para micropropagação. Portanto, para este material é

importante que o meio onde será germinado seja suplementado com a concentração padrão de meio MS e que contenham fitorreguladores, além de carvão ativado e o sal NaH_2PO_4 . Estudos indicam que utilização de carvão ativado nos meios de cultivo tem efeito positivo na formação de plântulas normais, e o uso de NaH_2PO_4 favorece a germinação de sementes de pimenteira-do-reino (LEMOS, 2018). A falta de reguladores na formulação dos meios de cultura pode limitar a germinação das sementes pela ausência da síntese de hormônios ou reservas suficientes, e a ausência de estímulos do meio de cultura para desencadear o processo (RIBEIRO, 2019).

Figura 7 – Tempo de emissão das estruturas morfogênicas do genótipo de pimenteira-do-reino Uthirankotta x Kuthiravally em função dos meios de cultura. Embrapa. Belém/PA. 2019.



5.2 INDEXAÇÃO

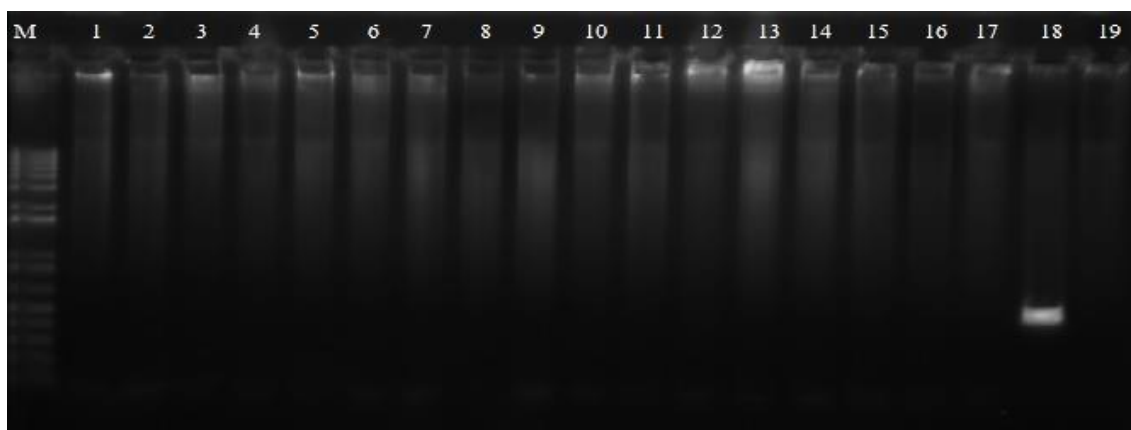
Os genótipos (Panakotta x Iaçará), (Uthirankotta x Kuthiravally) e de duas cultivares (Panakotta e Iaçará) foram submetidos a análise de PCR por meio de dois *primers* específicos para o vírus PYMoV, para diagnosticar a fitossanidade.

Nos materiais avaliados não foram detectados a presença do vírus PYMoV (figura 8). Os vírus são transmitidos principalmente via propagação vegetativa e por insetos vetores. Desse modo, a forma de propagação da pimenteira-do-reino possibilita a ampla disseminação do vírus, sendo a indexação uma alternativa importante para selecionar

acessos com qualidade fitossanitária, para clonagem e multiplicação da cultura (RAMOS, 2017).

Os resultados obtidos com a utilização de plantas provenientes de sementes demonstraram ser promissores, pois a não detecção de vírus nas amostras testadas torna viável a utilização da propagação sexuada como filtro dessa virose, e a possibilidade de aproveitamento genético de cultivares afetadas com características agrônomicas superiores. Com isso, pode-se aferir que não houve transmissão via sementes, mesmo estas sendo proveniente de material com vírus. Haja vista, que sementes infectadas com vírus tem o seu desenvolvimento prejudicado.

Figura 8- Gel de PCR para PYMoV a partir de folhas jovens de pimenteira-do-reino provenientes de sementes. (M) marcador 1kb ladder; (1 a 17) amostras; (18) controle positivo; (19) controle negativo.



O processo de germinação *in vitro* é uma metodologia a qual permite fazer uma seleção que naturalmente poderia ocorrer. De forma que, a presença do vírus pode causar problemas no processo de desenvolvimento do embrião até a germinação, ou seja, as sementes que não germinaram ou que germinaram, mas tiveram a formação de estruturas anormais, como na (figura 1) não foram selecionadas para indexação. Portanto, a germinação *in vitro*, também pode ter sido um fator de seleção de plantas saudáveis.

É notória a eficiência da técnica de PCR para detecção de virose em pimenteira-do-reino, sendo uma ferramenta essencial para correta identificação do patógeno e possibilitando estratégias de controle fitossanitário (RAMOS, 2017). Diante disso, os materiais podem ser utilizados como plantas doadoras de explantes para serem micropropagadas e formação de mudas, objetivando o estabelecimento de uma coleção de matrizes livres do vírus PYMoV.

5.3 MULTIPLICAÇÃO

No primeiro subcultivo, as interações significativas ocorreram quando comparamos as médias obtidas entre os genótipos, já as diferentes concentrações de AIA e BAP, influenciaram semelhantemente na formação de explantes oriundos de segmentos nodais de forma não significativa (tabela 6).

Tabela 6 – Análise de variância quanto ao número de gemas formadas após 1º subcultivo em diferentes genótipos de pimenteira-do-reino em meios de cultivo com 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolilacético (AIA).

F.V	G. L.	F
BAP	3	0.98 ^{n.s}
AIA	1	0.40 ^{n.s}
GEN	3	6.51**
BAP*AIA	3	0.55 ^{n.s}
BAP*GEN	9	0.63 ^{n.s}
AIA*GEN	3	1.15 ^{n.s}
BAP*AIA*GEN	9	0.87 ^{n.s}
CV (%)		40.27

F. V: fontes de variação; G.L.: graus de liberdade; * e ** significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{n.s} não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

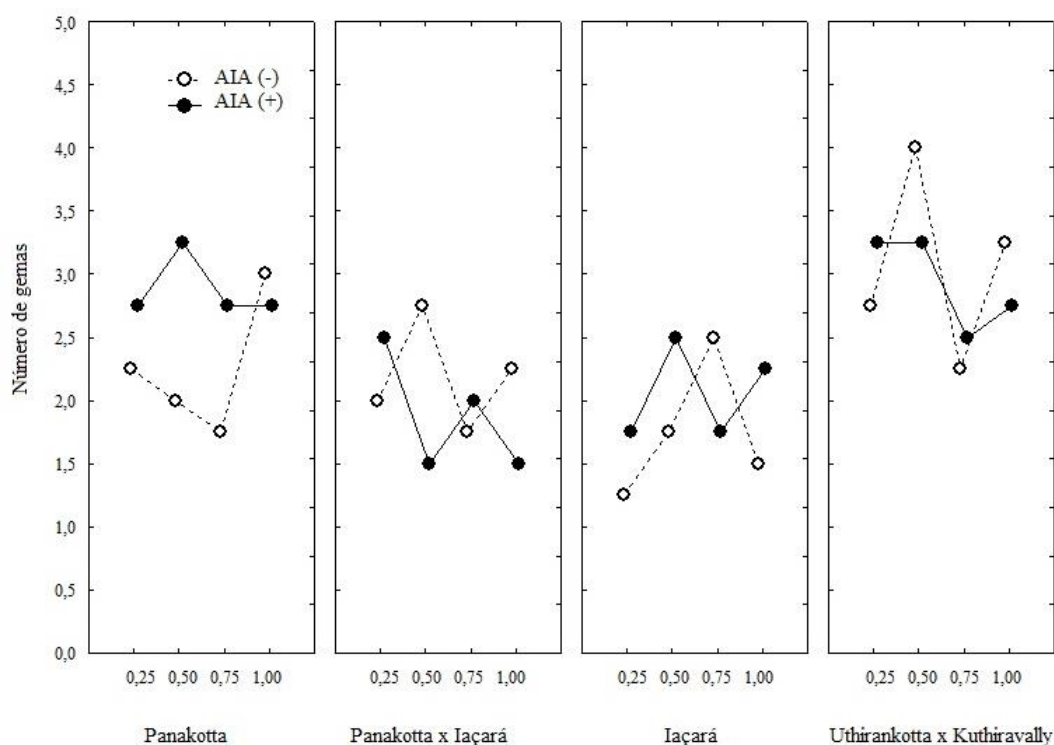
A regeneração *in vitro* é um processo que se bem conduzido consegue obter altas taxas de multiplicação e produzir grande número de mudas em pouco tempo e com qualidade fitossanitária superior ao que se obteria em campo. Diversos aspectos podem influenciar, como o tipo de explante, a matriz doadora, níveis de reguladores de crescimento, assepsia do material, controle dos fatores físicos, dentre outros (MOURA, 2008). Em seu ensaio Moura et al. (2008), verificou que para regeneração *in vitro* de plântulas de pimenteira-do-reino, os ápices caulinares usados como explantes foram eficientes.

Outro fator importante a se relacionar com o trabalho é a fase de estabelecimento, visto que é a fase em que o material ainda está se adaptando as condições *in vitro*, e ao fazer a introdução de novos acessos é de se esperar que ocorram diferentes respostas das plantas que estão sendo estudadas, ademais são materiais de diferentes genótipos, outra fonte de variação.

A propagação *in vitro*, usando segmentos nodais funcionam como melhores fontes de explantes quando se trata de pimenteira-do-reino (MOURA et al., 2008), de forma que cada segmento é formado de tecido meristemático, portanto, capaz de compor uma nova

planta e idêntica a matriz (BHAT; CHANDEL; MALIK, 1995). Na figura 9, observamos as variações quanto ao número de nós produzidos relacionado as diferentes concentrações de BAP e AIA no meio de cultura no primeiro subcultivo. Contudo, como verificado na tabela 5, as diferenças não foram significativas, de forma que essas distintas combinações funcionaram de maneira semelhante. Todavia, é nítido que se avaliado cada genótipo nos meios de cultivo (figura 9), as respostas variaram quanto a presença ou ausência de AIA, o genótipo Panakotta formou o máximo de nós caulinares quando inoculado em meio suplementado com 0,2 mg.L⁻¹ de AIA e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, um pouco mais de três nós (3 a 3,5), já quando o meio foi composto 0,0 mg.L⁻¹ de AIA e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP foi possível coletar cerca de 3 explantes nodais. Ou seja, apesar de não significativas, ocorreram respostas interessantes para as composições do meio.

Figura 9 - Número de brotos de pimenta-do-reino no primeiro subcultivo em função das concentrações de BAP (mg.L⁻¹) e AIA (mg.L⁻¹).



Os reguladores de crescimento funcionam como sinais que induzem as células a diferentes respostas, e são balanceados para determinar algo que se deseja obter. Auxinas são importantes no crescimento e morfogênese dos vegetais, principalmente pela ação de indução do alongamento, diferenciação e divisão celular, estando diretamente ligado a diferenciação do sistema radicular, dominância apical, desenvolvimento de órgãos, além

de responder as variações da gravidade e respostas a luz, sendo muito usado para induzir crescimento em cultura de tecidos, já citocininas promovem o crescimento por indução da divisão celular, está comumente relacionado por estimular o crescimento da parte aérea e indução de gemas (BARBOSA, 2010).

Existem várias formas de auxinas e citocininas, são compostos que possuem estruturas diferentes e para que atuem nas células precisam primeiro ser absorvidas, pois deve existir afinidade entre substrato e o explante, ou seja, precisam passar pela parede semi-impermeável da célula vegetal. Dessa forma, em cada fase, como na multiplicação e germinação, é necessário selecionar a melhor forma que os reguladores são absorvidos. Para clonagem *in vitro* o AIA combinado ao BAP tem sido as melhores fontes de auxinas e citocininas, demonstrando que as células nessa etapa absorvem melhor esses compostos. Para clonagem de oito cultivares de pimenteira-do-reino, o meio de cultura usado foi MS, contendo BAP 0,5 mg.L⁻¹ e AIA 0,2 mg.L⁻¹ (PINHO et al., 2009).

Para o híbrido Panakotta x Iaçará, na ausência de AIA e 0,5 mg. L⁻¹ de BAP foi obtido o maior número de explantes, já ao se adicionar 0,5 mg. L⁻¹ de AIA e 1,0 mg. L⁻¹ de BAP, ocorreram as menores médias, podemos inferir que nessas concentrações a presença de AIA pode inibir o desenvolvimento desse material. A cultivar Iaçará na presença e ausência de AIA, verificou-se respostas diferentes. Nas concentrações de 0,2 mg.L⁻¹ de AIA mais 0,5 mg.L⁻¹ de BAP, e na ausência de AIA combinado com 0,75 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente, foram coletados números semelhantes de nós (2,5 nós). Quando não foi acrescentado AIA mesmo na presença de BAP, os valores foram os menores, portanto, esse genótipo necessitou de um balanço hormonal peculiar, mas é possível micropropagá-la sem acréscimo de AIA.

A coleta de explantes nodais para o cruzamento Uthirankotta x Kuthiravally variou, na combinação de 0,0 mg. L⁻¹ de AIA mais 0,5 mg. L⁻¹ de BAP, obteve-se os maiores números de nós (4 nós), e a composição de 0,0 mg. L⁻¹ de AIA e 0,75 mg. L⁻¹ de BAP, com a menor média (1,5 a 2 nós). Ou seja, esse material conseguiu obter melhores resultados sem adição de AIA, e a melhor concentração de BAP foi 0,5 mg. L⁻¹.

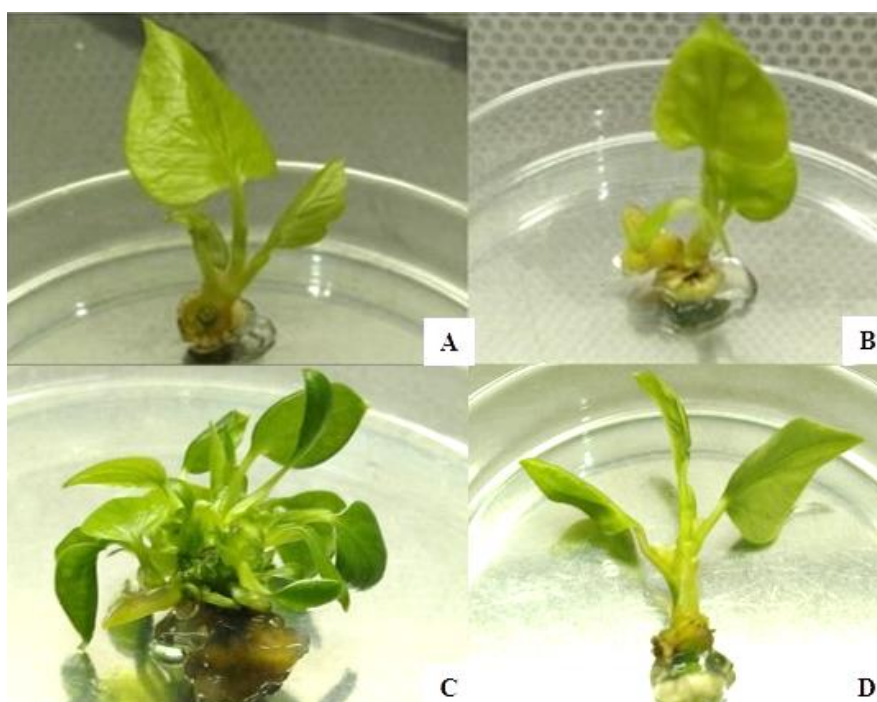
Nessa etapa, usou-se concentrações variadas de BAP e AIA, pois os materiais já conseguem sintetizar seus próprios metabólitos, mesmo que em menor escala, e no próprio explante já há uma reserva proveniente da matriz doadora, de forma que esses reguladores externos seriam para complementar seu desenvolvimento e induzir a uma resposta desejada. No cruzamento Uthirankotta x Kuthiravally (figura 9), a maior média

no número de explantes foi obtida quando o meio não foi composto com AIA, ressaltando que esse material já tem reservas suficientes e que já pode sintetizar sua própria auxina.

De maneira geral, os meios de cultura foram muito semelhantes independente do genótipo testado. Porém, quando analisamos a interação genótipo x genótipo, para as médias avaliadas verificou-se que houve diferença significativa (tabela 5), resultado que já se esperava ao usar materiais distintos.

Após seis semanas de cultivo *in vitro* os quatro materiais testados foram multiplicados (figura 10), configurando o primeiro subcultivo. A avaliação foi quanto ao número de gemas nodais que cada explante inicial conseguiu desenvolver. Na figura 11, temos as médias para cada genótipo independente do meio de cultivo usado. É possível identificar que há resultados contrastantes e que a variação genética é um fator essencial para que se possa identificar materiais desejáveis.

Figura 10 – Genótipos Panakotta (A), Panakotta x Iaçará (B), Iaçará (C) e Uthirankotta x Kuthiravally (D).



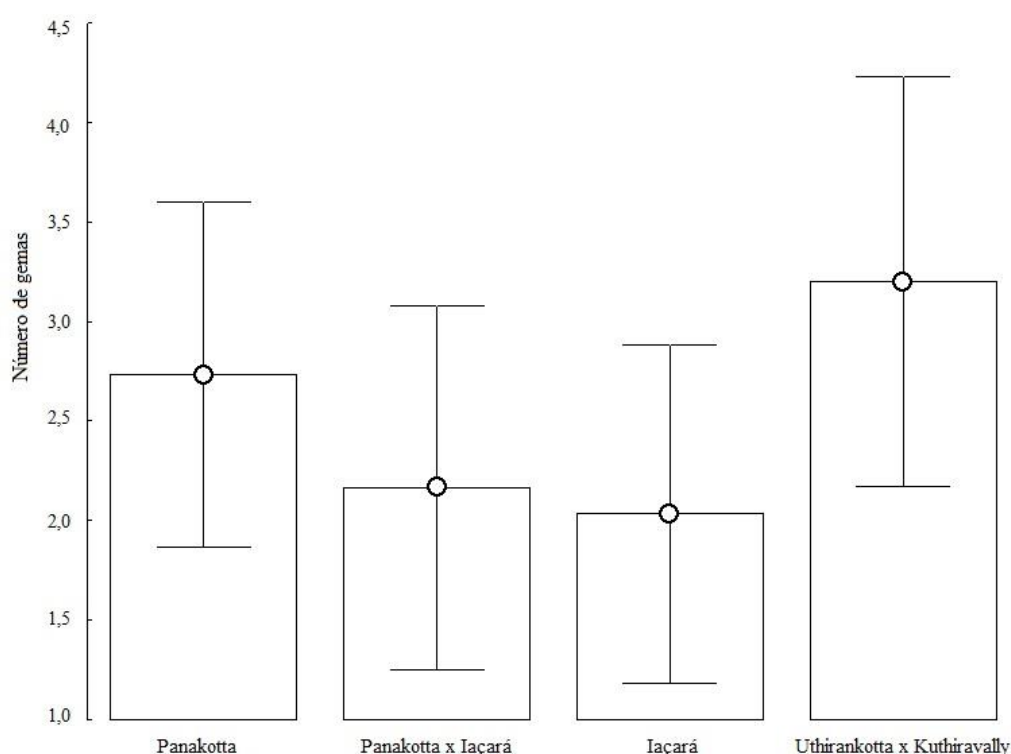
Fonte: autores

Inicialmente podemos identificar que o híbrido Uthirankotta x Kuthiravally foi o que produziu mais explantes (4 a 4,5 nós), ficando bem acima da média dos demais (figura 11). Pode-se inferir que ocorreu um fenômeno denominado “vigor híbrido”, usado quando observa-se que a média dos filhos é superior à dos parentais, entretanto, para isso teríamos que ter no mesmo experimento os parentais Uthirankotta e Kuthiravally.

Todavia, em estudos com germinação *in vitro* utilizando a cultivar Kuthiravally, seguidos de clonagem das plântulas obtidas, depois cultivadas e manejadas em campo, foi observado que esse genótipo produz resultados agronômicos bem positivos, como arquitetura de planta aberta, entrenós longos, bom enchimento de espigas, maturação homogênea e facilidade de colheita (RODRIGUES e LEMOS, 2019).

Em ensaios feitos na Índia, onde há maior variabilidade genética da espécie e orientando assim a escolha de parentais com distinção genética almejada, foi estudado dez grupos com 51 cultivares de *P. nigrum* L e analisados diversos caracteres morfológicos, e então selecionado como promissor o híbrido resultado das cultivares Uthirankotta e Cheriyaaniyakkadan (MATHEW et al., 2001). Indicando assim, que estudos para exploração de novas combinações genicas para selecionar indivíduos com características potenciais se justifica.

Figura 11 - Número de brotos em cada genótipo de pimenteira-do-reino no primeiro subcultivo dos diferentes meios de cultivo.



Posteriormente é possível analisar que há relação de parentesco entre o cruzamento Panakotta x Iaçará com os materiais Iaçará e Panakotta. Estatisticamente esses genótipos foram semelhantes, ou seja, o híbrido não conseguiu obter média superior a dos parentais, ficando na média. A resposta dessa combinação via cruzamento

controlado não surtiu o efeito esperado, que foi a obtenção de um genótipo com vigor híbrido. Estudos envolvendo cruzamentos interespecíficos com *P. nigrum* L. e piperáceas nativas resistentes a *F. solani* f. sp *piperis* apresentam dificuldades para obtenção de híbridos, podendo apresentar incompatibilidades (POLTRONIERI et al., 2000).

6 CONCLUSÕES

Para a germinação *in vitro* de sementes de genótipos de pimenteira-do-reino, deve ser utilizado o meio de cultura básico MS completo, 0,17 de NaH₂PO₄, carvão ativado 0,2% e suplementado com BAP e ANA 0,5 mg.L⁻¹.

Não há ocorrência do vírus PYMoV em plântulas vigorosas provenientes sementes de genótipos originados de polinização controlada dentro do programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino, sendo viável a utilização dessas plantas para criação de matrizeiros livres desse vírus.

Os genótipos mostram viabilidades variáveis no processo de multiplicação, destacando-se o híbrido Uthirankotta x Kuthiravally.

7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; RASHID, M.; MAHMOOD, T.; FÁTIMA, N. **Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated tissues of *Piper nigrum* L.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 102, p. 129-134, 2010.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. **Pimenta do reino e suas doenças na região amazônica.** Ciência Agrícola, v.2, p.114-119, 1977.
- ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R.; BRIOSO, P. S. T.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. **Evidências preliminares da ocorrência do vírus do mosqueado da pimenteira-do-reino (*Piper yellow mottle virus* - PYMoV) no Brasil.** Summa Phytopathologica, v. 25. n.1, p. 36-36, 1999.
- ALVES, S. A. O.; CARDOSO, J. N. O.; OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; NETO, C. F. O.; LOBATO, A. K. S.; MAIA, P. S. P.; AMARAL, L. M. S. **Enraizamento *in vitro* e Aclimatização em Vermiculita de Pimenteira-do Reino (*Piper nigrum* L.).** In: Seminário de Iniciação Científica da UFRA, 2. Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. Ciência e Tecnologia com Inclusão Social: anais. Belém –PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.
- ANDRADE, C. G. C.; SILVA, M. L.; SALLES, T. T. **Fatores impactantes no valor bruto de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) no Pará.** Floresta e Ambiente, 2017; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.145615>. Acesso em: 30 de Out. de 2019.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem.** In: BORÉM, A. (Ed.). Biotecnologia Florestal. Viçosa: Editora da UFV, 2007. p. 93-121.

BARBOSA, R. R. **Participação das vias de produção e percepção do hormônio etileno entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana***. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Goytacazes, RJ, 2010.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K.; MALIK, S. K. **Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species**. Plant Cell Reports, v.14, p.398-402, 1995.

BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A.C.S; PRADO, E.; PANTOJA, K. F. C.; SOUSA, C. M. ***Ferrisia virgata* (Cockerell): vetora do *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino**. In: 50 Congresso brasileiro de olericultura, 2010, Guarapari. **Anais do 50 Congresso brasileiro de Olericultura**. Brasília: Sociedade brasileira de horticultura, 2010. v. 28.

BRIOSO, P. S. T.; POZZER, L.; SILVA, S.; KITAJIMA, E. W.; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R. **Amplificação de fragmento específico do PYMoV a partir de pimenta do reino**. Fitopatologia Brasileira, v. 25. p. 438-438, 2000.

CARNEIRO JUNIOR, J. F. C.; LIMA, J. M.; SILVA, A. L. P.; NASCIMENTO, M. N. C. F. **Análise de Mercado da Pimenta do reino no Período de 1990 a 2015**. Tecnol. & Ciên. Agropec. João Pessoa, v.11, n.6, p.139-145, 2017.

CASSELLS, A. C. **In vitro-induced mutation for disease resistance**. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. London: Kluwer Academic Publisher, 1998. P. 367-378, cap. 18.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2000.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. **Considerações gerais sobre organogênese**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. ISSN 0103-0205. Campina Grande, PB. 2006.

CHRIST, J. A. **Diversidade Morfológica e Molecular em *Piper* (Piperaceae) em Um Fragmento de Floresta Atlântica**. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, UFES, Alegre, ES, 2016.

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

DONINI, P.; SONNINO, A. **Induced mutation in plant breeding: current status and future outlook**. In: JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. London: Kluwer Academic Publishers, 1998. cap.14, p. 255-292.

DUARTE, M. de L. R. **Cultivo da pimenta-do-reino na região norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004.

DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; KITAJIMA, E. W.; BRIOSO, P. S. T. **Mosqueado amarelo da pimenta-do-reino**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 20p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 62)

FREIRE, R. R. **Diagnóstico da produção de mudas em viveiros registrados e propagação vegetativa da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) no Norte do Espírito Santo**. Dissertação (mestrado em Agricultura Tropical), Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2013.

GARCIA, J.; KAMADA, T.; JACOBSON, T. K. B.; CURADO, M. A.; OLIVEIRA, S. M. **Superação de dormência em sementes de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2000.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. **A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by Rt-PCR**. Journal of virology methods, v. 63, p. 9-16, 1997.

HOMMA, A.K.O. **Extratativismo, biodiversidade e biopirataria na Amazônia**. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção agrícola municipal: Pará**. Rio de Janeiro: IBGE; 2017. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 28 de Ago. 2019.

KELKAR, S. M.; DEBOO, G.B.; KRISHNAMYRTHY, K.V. **In vitro plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link**. Plant Cell Reports, v. 16, p. 215-218, 1996.

KRIKORIAN, A. D. **Baseline and cell studies for use in banana improvement schemes**. In: PLOETZ, R.C. (Ed.). **Fusarium wilt of banana**. St. Paul: APS Press, 1990. p. 127-133.

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.

LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. M.; MENEZES, I. C.; MONDIM, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em associação com as técnicas de biotecnologia**. Ed.1. Belém/Pa. Embrapa Amazônia Oriental, 2011. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921237/1/DOC375.pdf>>. Acesso em: 31 de Ago. 2019.

LEMOS, O. F. et al. **Germinação *In Vitro* de Sementes da Cultivar Cingapura de Pimenteira-do-reino**. Anais do V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, Fortaleza – CE, 2018.

LIMA, J. S. S.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, W.; OLIVEIRA, P. C.; QUARTEZANI, W.Z. **Análise espacial de atributos químicos do solo e da produção da cultura pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. IDESIA(Chile), v.28, nº 2, p. 31-39, Ag., 2010.

LOURINHO, M. P.; COSTA, C. A. S.; SOUZA, L. C.; OLIVEIRA, C. F. **Conjuntura da pimenta-do-reino no mercado nacional e na região norte do Brasil**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Belém, PA, 2014.

MAGEVSKI, G. C. **Propagação Vegetativa de Espécies do Gênero *Piper* e suas Potencialidades**. Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, UFES, São Mateus, 2012.

MATHEW, P. J.; MATHEW, P. M.; KUMAR, V. **Graph clustering of *Piper nigrum* L. (black pepper)**. Euphytica, v. 118, n. 3, p. 257-264, Apr. 2001.

MENDONÇA, D. P.; SILVA, F. B. B. ***Trichoderma* e bactérias endolíticas para promoção de crescimento na aclimatização e formação de mudas de pimenteira-do-reino provenientes do cultivo *in vitro***. Trabalho de Conclusão de (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

MOREIRA G.R.; CALIMAN F.R.B.; SILVA D.J.H.; RIBEIRO C.S.C. **Espécies e variedades de pimenta**. Informe Agropecuário 2006; 27(235): 16-29.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. **Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenteira-do-reino**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, jan-fev, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n1/a12v38n1>>. Acesso em: 28 de Out. 2019.

MOTOKANE, M.T. **Fisiologia Vegetal – Aula 09- Reprodução – Germinação**. Publicado pelo canal Univesp – Universidade Virtual do Estado de São Paulo, 2018. Disponível: <<https://www.youtube.com/watch?v=IXBeOxtNy00>>. Acesso: 02 nov. 2019.

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

NITZSCH, W. Germoplasm preservation. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 782-805.

OLIVEIRA, A. C. S.; BOARI, A. J.; SOUSA, C. M.; PANTOJA, K. F. C.; SOUZA, C. A. **Deteção de *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas**. Horticultura Brasileira 28: S952-S956. 2010.

PANTOJA, K. F. C.; BOARI, A. J.; OLIVEIRA, A. C. S.; SOUSA, C. M.; SOUZA, C. A. **Levantamento de Viroses em Pimenteira-do-reino no Estado do Pará**. In: Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. Belém – PA, 2009.

PINHO, J. V. da S; LEMOS, O. F. de; OLIVEIRA; H. S. de. **Clonagem *in vitro* via cultivo de meristema de pimenteira-do-reino: assepsia e estabelecimento de cultura.** Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. EMBRAPA Amazônia Oriental – Belém, PA, 2009.

PIO, R.; BASTOS, D.C.; BERTI, A.J.; FILHO, J.A.S.; FILHO, F. A. A.M.; ENTELMANN, F.A.; ALVES, A.S.R.; NETO, J.E.B. **Enraizamento de diferentes tipos de estacas de oliveira (*Olea europaea* L.) utilizando ácido indolbutírico.** Ciência Agrotécnica, v. 29, n. 3, p. 562-567, 2005.

POLTRONIERI, M.C.; LEMOS, O.F. de; ALBUQUERQUE, F.C. **Pimenta-do-reino.** In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Programa de melhoramento e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia oriental. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. p.127-137.

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. 246-248, 2000. Suplemento. Anais do 33º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2000, Belém, PA.

RAMOS, G. K. S. **Comportamento de dois genótipos de pimenteira-do-reino livres do vírus PYMoV na micropropagação.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicado a Agropecuária), Universidade Federal Rural da Amazônia, 2017.

RAMOS, G. K. S. et al. **Ácidonaftalenoacético na rizogênese e benzelaminopurina na indução de brotos de genótipos de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em Cultivo *In Vitro*.** III Congresso Internacional das Ciências Agrárias, João Pessoa/PB, 2018.

RANI, D.; DANTU, P.K. **Direct shoot regeneration from nodal, internodal and petiolar segments of *Piper longum* L. and *in vitro* conservation of indexed plantlets.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 109, p. 9–17, 2012.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 6. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

RIBEIRO, A. C. M.; LEMOS, O. F.; PIRES, G. T.; NEVES, C. R. O.; COSTA, T. T. A. **Germinação *in vitro* de sementes da cultivar bragantina de pimenteira-do-reino.** 23º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, 2019.

RODRIGUES, S. M., LEMOS, O. F. **Tecnologias para inovação na cultura da pimenteira-do-reino: desafios e oportunidades.** –Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>>. Acesso em: 29 Out. 2019.

SANTOS, L. R. R.; LEMOS, O. F.; RODRIGUES, S. M. **Germinação *in vitro* de diferentes cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).** In: Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. Belém – PA, 2009.

SCHWERTNER, A. B. S.; NAGAO, E. O.; HIDALGO, A. F.; ZAFFARI, G. R. **Efeito do 6- benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 10, n. 1, p. 76-81, 2008.

SERRANO, L. A. L.; LIMA, I. M.; MARTINS, M. V. V. **A Cultura da Pimenteira-do-reino no Estado do Espírito Santo**. Vitória, INCAPER, 36 p. 2006.

SILVA, L. R.; LIMA, L. F.; SOUZA, L. S. F.; PEREIRA, B. W. F.; VIANA, R. G. **Conjuntura do Mercado de Pimenta-do-reino no Pará**. In: II Congresso Internacional de Ciências Agrárias, 2017. **Anais do II Congresso Internacional de Ciências Agrárias**, Natal – RN, 2017.

SILVA, D. P. P.; JONES, P.; SHAW, M. W. **Identification and transmission of Piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*)** in Sri Lanka Plant Pathology, v. 51, n.5, p. 537–545, 2002.

SOUSA, C. M.; BOARI, A. J.; PRADO, E.; PANTOJA, K. F. C.; SOUSA, A. S. ***Planococcus minor* Maskell: virus-vector to piper yellow mottle virus on black pepper**. In: XXI Encontro Nacional de Virologia e V Encontro de Virologia do Mercosul, 2010, Gramado. **Anais. Virus: reviews & research**. Gramado: SBV, 2010. v. 15. p. 306-307.

SOUSA, C. M.; PANTOJA, K. F. C.; BOARI, A. J. **Detecção de *Piper yellow mottle virus* em Espécimes de Cochonilha de Pimenteira-do-reino por meio de PCR**. In: 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental. **Anais do 15º Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental**. Belém – PA, 2011.

SOUSA, P.C.A. **Organogênese, embriogênese somática e o uso do óleo mineral como estratégias de propagação e conservação *in vitro* de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C. DC**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

VIEIRA, M. L. C.; GLORIA, B. A. **Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento**. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. C. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento: plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 911-938. cap. 28.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009. 272p.

ZHANG, Z.; ZHAO, L.; CHEN, X.; ZHENG, X. **Successful micropropagation protocol of *Piper methysticum***. *Biologia Plantarum*, v. 52, n. 1, p. 110-112, 2008.

WENZEL, G. **Strategies In unconventional breeding for disease resistance**. Annual Review Phytopathology, v. 23, p. 149-172, 1985.