



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA
PROGRAMA EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA



CAMILA BEATRIZ LIMA DE SOUZA

CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMA E MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS DE
Piper nigrum L.

BELÉM
2015

CAMILA BEATRIZ LIMA DE SOUZA

Embrapa
Amazônia Oriental

**CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMA E MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS DE
Piper nigrum L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Co-orientador: Dra. Alessandra de Jesus Boari

**BELÉM
2015**

Souza, Camila Beatriz Lima de

Cultivo *in vitro* de meristema e micropropagação de plantas de *Piper nigrum* L. / Luciana Priscila Costa Macedo. – Belém, PA, 2015.

92 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia aplicada à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Oriel Filgueira de Lemos

1. Meristema - Cultivo *in vitro* 2. Aclimatização 2. Mudas - formação – clonagem 3. Limpeza Clonal 4. Brotos - Multiplicação 5. Plantas - Propagação I. Lemos, Oriel Filgueira de, Orient. II. Título.

CDD – 575.489

CAMILA BEATRIZ LIMA DE SOUZA

**CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMA E MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS DE
Piper nigrum L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, área de concentração: Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária.

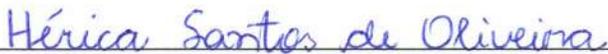
Orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Aprovado em 28 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA

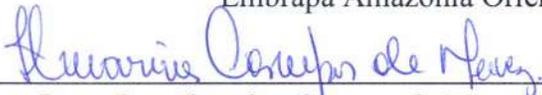


Pesq. Dr. Oriel Filgueira de Lemos- Orientador
Embrapa Amazônia Oriental



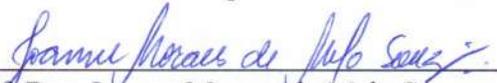
Prof. Dra. Hérica Santos de Oliveira - 1º Examinador

Embrapa Amazônia Oriental



Pesq. Dra. Ilmarina Campos de Menezes- 2º Examinador

Embrapa Amazônia Oriental



Prof. Dra. Joanne Moraes de Melo Souza - 3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

DEDICO

Ao meu amado esposo, Adécio Agel Marinho da Silva, ao qual tenho muito orgulho e admiração, muito obrigada por me ajudar a chegar até aqui, por tudo que fez e faz por mim, pelo seu apoio e incentivo para que eu possa crescer como profissional e como mulher, por lutar comigo e por vencer comigo, obrigada por sua paciência e companheirismo sua dedicação e amor por mim.

OFEREÇO

Ao meu maravilhoso DEUS, por me amar incondicionalmente, por fazer - me sentir especial. Obrigada meu DEUS por sonhar por mim, e realizar a sua vontade em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao meu DEUS, que me proporcionou o dom da vida e a oportunidade de chegar aonde eu cheguei, por me ajudar a vencer a cada obstáculo com a certeza que estar à minha frente guiando o meu caminho para que eu possa me tornar sempre uma vencedora em seu nome.

À Fapespa pelo financiamento dos meus estudos.

À minha amada Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela qual tenho muito orgulho de ter realizado minha formação acadêmica e estar realizando o curso de mestrado em biotecnologia aplicada à agropecuária.

À Embrapa Amazônia Oriental, ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos e o laboratório de fitopatologia por todo apoio concedido, para que este trabalho fosse realizado.

Ao Professor e coordenador do curso de pós-graduação, Reginaldo Alves Festucci Buselli pela sua dedicação e disposição em fazer seu melhor para elevar o nível do curso.

Ao meu orientador Dr. Pesq. da Embrapa Amazônia Oriental Oriel Filgueira de Lemos, primeiramente por me ensinar quais são os valores de um verdadeiro líder. E por ser um verdadeiro orientador, por sempre transmitir seus conhecimentos e sempre disponibilizar o que estiver ao seu alcance para a realização desse trabalho.

A minha co-orientadora Dra. Pesq. da Embrapa Amazônia Oriental Alessandra de Jesus Boari pelo auxílio sempre que necessário para o desenvolvimento deste estudo.

À Dra Ilmarina Menezes pela amizade, carinho e auxílio na pesquisa e aos momentos de descontração.

À Dra Simone Rodrigues pelo auxílio na pesquisa e aos momentos de descontrações.

À professora Joanne Souza, por todo carinho e aprendizado no estágio de docência.

As Dras Kenny e Keiko por toda ajuda concedida na disciplina da pós-graduação.

À Dra Herica de Oliveira pelo auxílio na pesquisa e aos momentos de descontrações.

As minhas grandes amigas da graduação por quem eu tenho muito amor e carinho Catiane das Chagas, Monique Bezerra, Mayara do Nascimento e Christiane Almeida que sempre lutaram comigo e viram minha jornada.

À minha nova e grande amiga que está lutando agora comigo Meiciane Campelo, por sua ajuda e companheirismo em toda fase deste trabalho, pelo apoio e carinho seu e de sua família.

À amiga Dávia Leite por todos os momentos vividos de luta na pós – graduação, obrigada.

À todos os alunos do curso de biotecnologia aplicada à agropecuária.

Às novas amigas da Pós-Graduação Fabricia Moraes, Helaine Pires, Marly Pedroso, Gledson Castro e Lana Reis por toda ajuda fornecida quando solicitada.

Aos estudantes de iniciação científica e aos funcionários do laboratório de Biotecnologia da Embrapa, Orlando Marciel, Marlon, Suzana, Mayara, Nayara, Glace Kelly, Ruanny, José Carlos por toda ajuda fornecida quando solicitada.

Ao meu grande novo amigo Gilberto Costa, por toda ajuda fornecida no decorrer deste trabalho pelo carinho e momentos de descontração e pelo chazinho mais gostoso do mundo.

À minha família que é tudo para mim, obrigada por todo amor, apoio e dedicação, obrigada por lutarem comigo, obrigada por segurarem em minha mão em cada fase da minha vida.

MUITO OBRIGADA!!

LISTA DE TABELA

Tabela 2. Graus de avaliação de oxidação do tecido meristemático.	33
Tabela 3. Diferentes concentrações e antioxidantes para imersão e umidificação do meristema.	34
Tabela 4. Diferentes concentrações do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e do antibiótico sulfato de estreptomicina em meio de cultura.	36
Tabela 5. Diferentes concentrações do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.	37
Tabela 6. Meios com diferentes combinações de reguladores de crescimento empregados na etapa de multiplicação de brotos in vitro de genótipos de pimenteira-do-reino.....	67
Tabela 7. Combinações de diferentes substratos para a aclimatização de brotos de pimenta- do-reino.....	69
Tabela 8. Análise da variância do primeiro subcultivo quanto a proliferação de gemas e brotos e comprimento de broto em dois tipos de explantes em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.	71
Tabela 9. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação de gemas em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.....	72
Tabela 10. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação in vitro de broto em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.....	72
Tabela 11. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto ao comprimento de broto em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.....	73
Tabela 12. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto a proliferação de gemas em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.	73
Tabela 13. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto a proliferação de brotos e em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.	74

Tabela 14. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto ao comprimento de broto em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.	74
Tabela 15. Teste de comparação de média do segundo ao quinto subcultivo quanto ao número de gemas, número de broto e comprimento de broto.	76
Tabela 16. Análise de variância do enraizamento in vitro dos Três genótipos de pimenteira-do-reino.....	79
Tabela 17. Teste de médias do enraizamento in vitro dos Três genótipos de pimenteira-do-reino.....	80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Etapas para estabelecimento de meristema in vitro de pimenteira-do-reino. Belém, PA. 2015. 27
- Figura 2. Mudanças de pimenteira-do-reino produzidas em casa de vegetação para a retirada de ápices e gemas para obtenção de explantes meristemáticos. 28
- Figura 3. Pré-asepsia dos ápices e gemas para retirada de explante meristemático (a) ácido cítrico, (b) lavagem em água corrente, (c) detergente neutro, (d) lavagem em água corrente, (e) fungicida derosal. 29
- Figura 4. Asepsia dos ápices e gemas para retirada do explante meristemático em câmara de fluxo laminar (a) ápices e gemas; (b) álcool 70%; (c) cloreto de mercúrio; (d) Frasco com água destilada autoclavada; (e) Sulfato de estreptomicina. 30
- Figura 5. Graus de oxidação do tecido meristemático (a) Não oxidado; (b) Levemente oxidado; (c) Moderadamente oxidado; (d) Totalmente oxidado. 33
- Figura 6. Teste de PCR para Piper yellow motile virus para amostras de pimenta-do-reino. M. marcador Kb ladder, 1. controle positivo PYMoV; 2. controle negativo de *P. nigrum*, 3 a 10 amostras provenientes da casa de vegetação da Embrapa Amazônia oriental. 38
- Figura 7. Percentagem de oxidação do explantes da cultivar Kuthiravally até às 72 horas. 39
- Figura 8. Meristema totalmente oxidado em um período de 72 horas. 39
- Figura 9. Percentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema da cultivar Kuthiravally. 40
- Figura 10. Percentagem de sobrevivência no período de uma semana em diferentes tipos e doses de antioxidantes na retirada de meristema. Sendo (T1) Polivinilpirrolidona (3%); (T2) Ácido Cítrico (5mM); (T3) Ácido Ascórbico (3 mM); (T4) Ditiotreitól (3mM); (T5) β - Mercaptoetanol (3mM). 41
- Figura 11. Percentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema no segundo experimento. 41
- Figura 12. Porcentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema no terceiro experimento, onde (T1) 0,0 g L⁻¹ + 0,4 %; (T2) 0,0 g L⁻¹ + 0,5 %; (T3) 0,0 g L⁻¹ + 0,6 %; (T4) 0,05 g L⁻¹ + 0,4 %; (T5) 0,05 g L⁻¹ + 0,5 %; (T6) 0,05 g L⁻¹ + 0,6 %; (T7) 0,1 g L⁻¹. 43
- Figura 13. Percentual de oxidação de meristemas no terceiro experimento utilizando diferentes concentrações de PVP, onde (T1) 0,0 g L⁻¹ + 0,4 %, (T2) 0,0 g L⁻¹ + 0,5

%,(T3) 0,0 g L-1 + 0,6 %;(T4) 0,05 g L-1 + 0,4 %,(T5) 0,05 g L-1 + 0,5 %,(T6) 0,05 g L-1 + 0,6 %	
2.3.5 Experimento meristema 4 – Diferentes doses do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.	45
Figura 14. Percentual de oxidação de meristemas no quarto experimento após 4 semanas de cultivo, onde T1 (0,8%) ;T2 (1,0%);T3 (2,0%);T4 (3,0%).	46
Figura 15. Perdas por oxidação total de meristemas no quarto experimento.	47
Figura 16. Porcentagem de contaminação fungica e bacteriana de meristemas no quinto experimento.	47
Figura 17. Sequência das etapas desenvolvidas no processo de multiplicação de genótipos de pimenteira-do-reino.	64
Figura 18. Processo de multiplicação realizado para os três genótipos de pimenteira-do-reino.	66
Figura 19. Teste de PCR para Piper yellow motlle virus para amostras de pimenteira-do-reino.1 M. marcador Kb ladder, 2 controle positivo PYMoV; 3 controle negativo de Piper nigrum L.e de 4 a 13 amostras provenientes do BAG.	70
Figura 20. Teste de RT-PCR para Cucumber mosaic virus para amostras de Pimenteira-do-reino. 1 M. Marcador Kb ladder, 2 Controle positivo e 3 Controle negativo de fumo e de 4 a 12 amostras provenientes do BAG.	71
Figura 21. Gemas por explante de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L-1) com AIA (0,2mg.L-1).....	77
Figura 22. Número de brotos por explante de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L-1) combinados com AIA (0,2mg.L-1).	78
Figura 23. Comprimento do brotos por explante de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L-1) combinados com AIA (0,2mg.L-1).	78
Figura 24. Taxa de brotos enraizados de três genótipos de pimenteira-do-reino após 28 dias de cultivo in vitro em meio de cultura ½ MS suplementado com 0,05 mg.L-1 de ANA. ..	79
Figura 25. Brotos de genotipos de pimenteira-do-reino cultivados em meio ½ MS com adição de (0,05mg.L-1) da ANA (A) Alencar; (B) Kuthiravally e (C) Guajarina.	80
Figura 26. Percentual da taxa de sobrevivência na aclimatização de pimenta do reino após 28 dias de cultivo ex vitro.	82

Figura 27. Percentual da taxa de sobrevivência de formação de mudas de três genótipos de pimenta-do-reino após 56 dias de cultivo em casa de vegetação.83

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	17
REFERÊNCIAS	20
2 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MERISTEMA PARA MICROPROPAGAÇÃO De PIMENTEIRA-DO-REINO (<i>Piper nigrum</i> L.) CULTIVAR KUTHIRAVALLY	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
2.1 Introdução	24
2.2 Material e Métodos	27
2.2.1 Indexação do material vegetal	27
2.2.2 Coleta e assepsias do material vegetal	28
2.2.3 Pré-assepsia	29
2.2.4 Assepsia	29
2.2.5 Experimento meristema 1 – imersão e umidificação com β -mercaptoetanol (5mM) e sulfato de estreptomicina a 0,1 g.L ⁻¹ , em meio de cultura e diferentes tamanhos de cortes.	32
2.2.6 Experimento meristema-2 Teste de diferentes tipos e concentrações de antioxidantes na retirada dos meristemas	33
2.2.7 Experimento meristema 3 - Diferentes doses de sulfato de estreptomicina e polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.	35
2.2.8 Experimento meristema 4 – Diferentes doses de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura	36
2.3 Resultados	37
2.3.1 Indexação do material vegetal	37
2.3.2 Experimento meristema 1 – Teste de imersão e umidificação com β -mercaptoetanol (5mM) e sulfato de estreptomicina a (0,1 g.L ⁻¹) em meio de cultura e tamanhos do explante (meristema)	38
2.3.3 Experimento meristema-2 Teste de diferentes tipos e concentrações de antioxidantes na retirada dos meristemas (imersão e umidificação)	40
2.3.4 Experimento meristema 3- Diferentes doses de sulfato de estreptomicina e polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.	42
2.4 Discussão	49
2.5 Conclusões	53

REFERÊNCIAS	54
3 Uso de 6-Benzilaminopurina na MICROPROPAGAÇÃO DE TRÊS GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO (<i>Piper nigrum</i> L.)	60
RESUMO	60
ABSTRACT	61
3.1 Introdução	62
3.2 Material e Métodos	64
3.2.1 Estabilidade fisiológica dos explantes	65
3.2.2 Indexação do material vegetal	65
3.2.3 Multiplicação dos explantes de <i>Piper nigrum</i> L.	66
3.2.4 Enraizamento <i>in vitro</i>	67
3.2.5 Aclimatização	68
3.2.6 Formação de mudas	69
4 Resultados.....	70
4.1 Indexação do material vegetal	70
4.2 Multiplicação dos explantes de <i>Piper nigrum</i> L.	71
4.3 Enraizamento <i>in vitro</i>	79
5 Discussão	84
6 Conclusões.....	88
REFERÊNCIAS	89

CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMA E MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS DE *Piper nigrum* L.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer um protocolo de cultivo de meristema *in vitro* visando a limpeza clonal e otimizar etapas da micropropagação para promover a clonagem e propagação de plantas de diferentes genótipos de pimenteira-do-reino. Foram realizados quatro experimentos visando o estabelecimento do meristema *in vitro* de pimenteira-do-reino. Avaliaram-se a oxidação e contaminação tanto fungica quanto bacteriana dos meristemas por um período de quatro semanas de cultivo. Para controlar a oxidação, dentre os antioxidantes testados, o PVP na concentração de 3% no processo de manipulação e excisão do meristema combinado com 0,8% em meio de cultura promoveu as menores taxas. Para a micropropagação dos três genótipos de *Piper nigrum* L. para multiplicação dos brotos avaliou-se doses de 6-Benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido indolacético (AIA); o efeito do ANA na etapa de enraizamento *in vitro*; e a sobrevivência dos brotos enraizados na aclimatização e formação de mudas. O meio de multiplicação utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, vitaminas MS, 2 g.L⁻¹ do solidificante phytigel e combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) com 0,2 mg.L⁻¹ AIA. A avaliação foi quanto ao número de gemas e brotos por explante e comprimento de brotos. Para o enraizamento foi utilizado o meio ½ MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, vitaminas MS, 2 g.L⁻¹ do solidificante phytigel e 0,05 mg.L⁻¹ do ácido naftaleno acético (ANA). A aclimatização dos brotos enraizados foi em bandejas plásticas com diferentes combinações de substratos (areia e vermiculita), por 28 dias, e aqueles sobreviventes foram transferidos para sacos plásticos contendo terra preta + matéria orgânica para o desenvolvimento de mudas por 56 dias. Os resultados mostraram multiplicação dos brotos em todos os meios de cultura e que o meio M1 (0,5 mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA) se destacou para a diferenciação de novas gemas e brotos/explante. Na aclimatização o substrato vermiculita + areia (1:1) proporcionou as maiores taxas de sobrevivência nos três genótipos. A formação de mudas ocorreu no substrato terra preta, no qual as plantas apresentaram acima de 70% de sobrevivência.

PALAVRAS CHAVE: Aclimatização; Formação de mudas; Limpeza clonal; Multiplicação de brotos; Propagação de plantas.

ABSTRACT

This work was developed with the objective of establishing an *in vitro* meristem culture protocol aiming the clonal cleaning and the enhancement of the micropropagation steps in order to promote plant cloning and propagation of different black pepper genotypes. Four experiments were conducted aiming the *in vitro* meristem establishment of black pepper. Meristem oxidation and contamination by fungi and bacteria were assessed for four weeks of culture. In order to control oxidation, among the tested antioxidants, PVP in a 3% concentration during the manipulation and excision processes combined with a 0.8% concentration in the culture medium promoted the lowest rates. In the micropropagation of the three black pepper cultivars, for the shoot multiplication, it was evaluated the doses of 6-benzylaminopurine (BAP) associated with indoleacetic acid (IAA); the effect of naphthaleneacetic acid (NAA) in the *in vitro* rooting; and the survival of rooted shoots in the acclimatization and seedling formation. The multiplication medium was the MS medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) containing 30 g.L⁻¹ sucrose, MS vitamins, 2 g.L⁻¹ Phytigel and combinations of BAP (0,5; 0,6 and 0,8 mg.L⁻¹) with IAA (0,2 mg. L⁻¹). The evaluations regarded the number of buds and shoots per explant and the shoot length. For the rooting, it was used the ½ MS medium containing 30 g.L⁻¹ sucrose, MS vitamins, 2 g.L⁻¹ Phytigel and 0.05 mg.L⁻¹ naphthalene acetic acid (NAA). The acclimatization of rooted shoots was conducted in plastic trays with different substrates (sand and vermiculite), for 28 days, and the surviving ones were transferred to plastic bags containing soil+organic matter for the seedling development for 56 days. The results showed a multiplication of shoots in all culture media and that the M1 medium (0.5 mg.L⁻¹ BAP+0.2 mg.L⁻¹ IAA) stood out due to the differentiation of new buds and shoots per explant. In the acclimatization, the vermiculite + sand (1:1) substrate allowed the highest survival rates in the three genotypes. The seedling formation occurred in the soil substrate, in which plants presented more than 70% survival.

KEYWORDS: Acclimatization; Seedling formation; Clonal cleaning; Shoot multiplication; Plant propagation.

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O gênero *Piper* apresenta mais de 2.000 espécies, dentre as quais a *Piper nigrum* L. (pimenteira-do-reino) que é altamente valorizada em todo o mundo. Essa especiaria é de origem indiana e devido ao seu sabor único é frequentemente utilizada como condimento alimentar, principalmente no preparo e processamento de alimentos (PRABHAKARAN NAIR, 2011).

A cultura da pimenta-do-reino é de grande importância para a economia brasileira, pois em 2014 gerou uma produção de 42.090 toneladas. Os estados que possuem a maior produção no Brasil são Pará, Espírito Santo, Bahia e Paraíba, sendo que o estado do Pará contribui com mais de 70% dessa produção (IBGE, 2014).

Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, segundo a FAO (2014), problemas fitossanitários tem provocado queda na produção, destacando-se as doenças: fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. *piperis*.; murcha amarela causada pelo *Fusarium oxysporum* e as provocadas por vírus como *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e *Piper Yellow Mottle Virus* (PYMoV), (ALBUQUERQUE et al.,1999; BRIOSO et al., 2000). Essas doenças reduzem intensamente a produtividade de diversas culturas em todo o mundo, inclusive a pimenteira-do-reino.

Uma das alternativas para a eliminação de vírus e outros patógenos sistêmicos de plantas infectadas é através da limpeza clonal, uma das técnicas da cultura de tecidos que envolvem técnicas de cultivo asséptico de células, tecidos e órgãos, em meios nutritivos e condições ambientais controladas (TORRES et al., 1998; JUNGHANS et al., 2004). A eliminação de patógenos, especialmente vírus, é considerada uma das principais utilidades da cultura de tecidos (JUNGHANS et al., 2004).

A limpeza clonal consiste em cultivar meristemas e induzir a formação de material propagativo geneticamente idêntico aos parentais, o cultivo de meristema é uma técnica utilizada em diversas espécies, como abacaxi, morango, citros, batata, alho e dentre outras culturas para a produção de mudas livres de vírus (FERREIRA et al., 1998)

O cultivo de meristema é uma técnica que está condicionada à obtenção de explantes apicais pequenos e avascularizados denominados meristema. Os meristemas apicais têm a capacidade genética e fisiológica de manter a divisão e diferenciação celular gerando novos tecidos, órgãos e formar um indivíduo completo com as mesmas características, porém por não apresentarem feixes vasculares são previamente livres do patógeno, sendo recomendada a

utilização de explantes entre 0,1 a 0,3 mm (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 1998) ou 0,2 a 1 mm (HANWEG, 1999).

De acordo com Souza et al. (2002), a ausência de viroses nas plantas obtidas *in vitro* têm sido consideradas pelas seguintes hipóteses: a) em meristemas não há competição entre partículas virais e a produção de células. A intensa multiplicação celular no meristema inibiria a multiplicação do vírus; b) durante a divisão celular, a capacidade para a síntese de ácidos nucléicos é empregada para a produção de células em detrimento à multiplicação do vírus; c) a ausência de tecidos vasculares no meristema dificulta o transporte de partículas virais de outras partes da planta para esta estrutura; d) presença de inibidores naturais nos meristemas e/ou em substâncias do meio de cultivo que interfeririam na multiplicação dos vírus.

Porem, a oxidação, contaminação e o baixo índice de desenvolvimento meristemático se tornaram um empecilho para o sucesso da fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* de meristema de pimenteira-do-reino. Diante disto, vem sendo realizados estudos de antioxidantes e antibióticos para viabilizar o cultivo via meristema por meio do controle dos efeitos negativos da oxidação fenólica e do controle e eliminações das possíveis contaminações durante o cultivo *in vitro*.

Além da limpeza clonal, para se obter plantas matrizes com qualidade fitossanitária, atualmente vem se utilizando também o processo de micropropagação em pimenteira-do-reino. Esse processo precisa ser otimizado para que ocorra a revitalização de plantas matrizes das principais cultivares, considerando a grande importância, principalmente para atender o setor produtivo e as exigências do setor financeiro quanto a disponibilidade de mudas vigorosas e saudáveis.

A micropropagação é uma alternativa viável, em que há o controle dos fatores essenciais para o desenvolvimento das plantas, como nutrição, luz, temperatura e o fator hormonal o que resulta em plantas saudáveis, vigorosas, assim como permite a clonagem de plantas geneticamente superiores, em larga escala (ALTMAN et al., 2007; OLIVEIRA, 2010; DAGLA, 2012).

Para a fundamentação dos métodos de micropropagação é necessária: a seleção do material vegetal; estabelecimento do explante, multiplicação *in vitro* (subcultivos sucessivos), enraizamento das partes aéreas formadas, aclimatização e formação de mudas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Em pimenteira-do-reino, diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de aprimorar as etapas da micropropagação. O meio de cultura e a aplicação de fitorreguladores

(citocininas e auxinas) têm sido alvo desses estudos, e tem apresentado resultados que apontam possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios e de estimular o alongamento, multiplicação e enraizamento. Como realizado por MOURA et al. (2008) onde ápices caulinares da pimenteira-do-reino responderam em baixas concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP).

Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação, as auxinas são utilizadas com o intuito de estimular o crescimento da parte aérea por meio da expansão e do alongamento celular e induzir raízes adventícias. As citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; KIELSE et al., 2009).

Outro fator que vem sendo analisado é a fase de aclimatização de plantas, que consiste na retirada das mesmas do cultivo *in vitro* e sua transferência para condições *ex vitro*. Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver na etapa de aclimatização devido à transferência brusca do ambiente *in vitro* para *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010). A adaptação a esta condição é considerada delicada devido a influência de diversos fatores como: temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990; KOZAI et al., 1992), no desenvolvimento da planta que afetam diretamente a formação de mudas.

Assim são necessários avanços nas pesquisas com intuito de alcançar a metodologia adequada para as seguintes hipóteses: tecidos meristemáticos com tamanho até 0,3 mm estão livres de vírus e permitem regenerar plantas saudáveis; há diferença na multiplicação *in vitro* de plantas a partir de tipos de explantes, ápices e gemas laterais, de pimenteira-do-reino; o balanço de regulador de crescimento exógeno em meio de cultura tem efeito diferenciado para as cultivares de pimenteira-do-reino durante a fase de multiplicação e enraizamento *in vitro*; o uso de diferentes tipos de substratos interfere na taxa de sobrevivência no processo de aclimatização das diferentes cultivares.

Desta forma o presente trabalho objetivou estabelecer um protocolo de cultivo de meristema *in vitro* visando a limpeza clonal e otimizar etapas da micropropagação para promover a regeneração de plantas de diferentes genótipos de pimenteira-do-reino.

REFERÊNCIAS

- 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. (resumo).
- ALTMAN, A.; TREVOR, THORPE A. **Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history of IAPTC/IAPTC&B/IAPB**. Fonte: IAPB 2014. Org/ About/History, 2007.
- 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. (resumo).
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- DAGLA, H.R. 2012. Cultura de Tecidos de Plantas. Ressonância, 17 (8) ,759-767. 2012
- FAO. Food and Agriculture of the United Nations. **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat> > Acesso em: 22 de outubro de 2014.
- FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH. v. 1, p. 21-43, 1998
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPH/ ABCTP, 1990. p. 99-160.
- HANWEG K. Virus-free granadilla cultivars. *Neltropica Bulletin*, Nelspruit, n.304,p.7-8, 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **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: 20 de março de 2014
- JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; KOBAYASHI, A. K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: Produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p. 97-106.

KIELSE, P. et al. Regeneração *in vitro* de *Parapiptadenia rigida*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1098-1104, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010384782009000400020&script=sci_arttext&tlng=e>. Acesso em: 19 de nov. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782009005000046.

KOZAI, T., Fujiwara, K., Hayashi, M. & Aitkem-Citristie, J. 1992. The *in vitro* environment and its control in micropopagation. *In* Transplant production systems. (K. Kurata & T. Kozai. ed.). Kluwer Academic, Dordrecht, p. 247-282.

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.

OLIVEIRA, H. S. de. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010.

PRABHAKARAN NAIR, K. P. **Agronomy and economy of black pepper and cardamom**. The “King” and “Queen” of Spices. London: Elsevier Science Publishing, 2011. 366 p.

SOUZA, R.J. et al. **Cultura do alho**. Textos Acadêmicos. Lavras: Ed. UFLA, 2002.90p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1., 133-145.

2 ESTABELECIMENTO IN VITRO DE MERISTEMA PARA MICROPROPAGAÇÃO DE PIMENTEIRA-DO-REINO (PIPER NIGRUM L.) CULTIVAR KUTHIRAVALLY

RESUMO

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, com uma produção de 41.919 t no mercado mundial. No entanto, apesar da importância, a produtividade está sendo afetada por vários fatores, dentre os quais os fitossanitários. Onde doenças causadas por vírus como *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) vêm provocando perda relevante na produção. A aplicação da técnica de cultivo de meristemas *in vitro* para limpeza clonal permite a produção de plantas livres de vírus. Portanto, o objetivo deste trabalho foi instituir um protocolo de estabelecimento de cultura de meristema *in vitro* visando a eliminação dos vírus CMV e PYMoV para clonagem da cultivar Kuthiravally de pimenta-do-reino com qualidade fitossanitária. Sendo assim, experimentos foram realizados com diferentes cortes do tecido meristemático (0,1; 0,2 e 0,3 mm), antioxidantes e desinfestantes para o estabelecimento do meristema. O meio de cultura utilizado para o estabelecimento foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose a 3%, vitaminas MS e suplementados com 0,5 mg L⁻¹ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP), 0,2 mg L⁻¹ ácido indolacético (AIA), 100 mg L⁻¹ de sulfato de estreptomicina e diferentes concentrações do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) (0,8%;1,0%;2,0%;3,0%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2% . As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 h luz dia-1, com intensidade de luminosa 3.000 lux à temperatura de 25± 3 °C. Então, para o estabelecimento de meristemas *in vitro* é necessário realizar a indexação do material vegetal para revelar se há infecção dos explantes pelos vírus CMV e PYMoV. O uso do antioxidante PVP a 3% para imersão e na concentração de 0,8% em meio de cultura controlaram a oxidação do material meristemático de pimenta-do-reino . A assepsia com o uso de agentes desinfestantes foi eficiente para controlar a contaminação do cultivo *in vitro* de meristemas.

PALAVRAS CHAVE: CMV; Limpeza clonal; Pimenta-do-reino; PYMoV.

ABSTRACT

Presently, Brazil is one of the biggest black pepper producers, with a 41,919t production in the world market. However, despite its importance, the productivity is being affected by many factors, among which the phytosanitary ones. Diseases caused by viruses such as the Cucumber mosaic virus (CMV) and Piper yellow mottle virus (PYMoV) have been causing relevant production losses. The application of the *in vitro* meristem culture technique for clonal cleaning allows the production of virus-free plants. Therefore, the aim of this work was to set up an *in vitro* meristem culture protocol in order to eliminate CMV and PYMoV viruses for the cloning of the black pepper cultivar Kuthiravally with phytosanitary quality. For that reason, it was conducted experiments with different cuts of meristematic tissue (0.1; 0.2 and 0.3 mm), antioxidants and disinfectants for the meristem establishment. The MS medium (Murashige & Skoog, 1962) was used for the establishment and it contained 3% sucrose and MS vitamins, supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of the growth regulator benzylaminopurine (BAP), 0.2 mg L⁻¹ indoleacetic acid (IAA), 100 mg L⁻¹ streptomycin sulphate and different concentrations of the PVP antioxidant (0.8%;1.0%;2.0%;3.0%). The culture media pH was adjusted to 5.8 and solidified with 0.2% Phytigel. The culture conditions were of 16h photoperiod with 3000 lux light intensity and at 25± 3 °C temperature. Then, for the *in vitro* meristem establishment it is necessary to perform the indexing of the plant material to reveal if there is infection by the CMV and PYMoV viruses. The use of 3% PVP for immersion and 0.3% PVP in the culture medium controlled the oxidation in the black pepper meristematic material. The disinfection with the use of disinfecting agents was efficient for controlling the contamination in the *in vitro* meristem culture.

Keywords: CMV; clonal cleaning; black pepper; PYMoV.

2.1 INTRODUÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma espécie tropical, perene, arbustiva e trepadeira, pertencente à família Piperaceae e ao gênero *Piper*, o qual contempla várias espécies, com destaque para a *Piper nigrum*. É originária das florestas do Sul da Índia (DUARTE, 2005), conhecida como pimenta-da-Índia, pimenta preta, e utilizada principalmente na culinária como condimento, porém seu uso tem se diversificado, como é o caso de óleos essenciais que possuem diversas aplicações nas indústrias (KHAN et al., 2010; SINGH et al., 2013).

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino, com uma produção de 41.919 t no mercado mundial (FAO, 2014). No entanto, apesar da importância econômica da cultura para o país, a produtividade é afetada por vários fatores, como problemas fitossanitários (BASTOS et al., 2008). Há ocorrência de várias doenças como Fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. piperis., murcha amarela causada pelo *Fusarium oxysporum* e as viroses, causadas por *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV), que provocam perdas na produção.

O CMV e o PYMoV são vírus constituídos por nucleoproteínas que possuem a habilidade de causar doenças em plantas (AGRIOS 2005), responsáveis por prejuízos a diversas culturas. A incidência e a severidade dessas doenças pode variar segundo a interação patógeno, hospedeiro, vetor e meio ambiente (PROVVIDENTI, 1996).

No Brasil, o CMV foi relatado pela primeira vez em pimenteira-do-reino no município de Tomé-Açu, no Estado do Pará (COSTA et al., 1969) e atualmente, está presente em outros estados como Minas Gerais e Espírito Santo (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 1990). O CMV é transmitido por mais de 60 espécies de pulgões de maneira não-circulativa através da picada de prova, e já foi relatado causando doenças em mais de 1.000 espécies de plantas, cujos sintomas variam com o cultivar, mas, geralmente são clorose, mosaico, mosqueado, espigas curtas e falhadas, e, conseqüentemente, queda de produção (BOARI et al., 2000).

O PYMoV foi relatado no Brasil pela primeira vez no estado do Pará em 1999 (ALBUQUERQUE et al., 1999). E atualmente foi detectado nos estados do Amazonas, Espírito Santo e Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2010).

Na Índia, Silva et al., (2002) verificaram que este vírus é transmitido pela cochonilha *Planacoccus citri* e pelo percevejo de renda *Corythucha ciliata* e, segundo Bhat et al. (2003), pela cochonilha *Ferrisia virgata*, por enxertia e mecanicamente. No Brasil, observou-se que o

PYMoV é transmitido pelas cochonilhas *Ferrisia virgata* (BOARI et al., 2010) e *Planococcus minor* (SOUSA et al., 2010).

Duarte et al., (2000) relatou a presença de plantas com sintomas de viroses nas principais áreas produtoras do Pará, tais como Tomé-Açu, Santa Isabel do Pará, Acará, Altamira, Abaetetuba e Baião, agravando as perdas de produção da cultura. Porém, não foram realizados testes para diagnosticar quais espécies de vírus estavam presentes.

Desta forma, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos é uma alternativa para se obter plantas sadias, livre de vírus através da limpeza clonal via cultivo de meristema, que consiste em um tecido situado distal ao mais novo primórdio foliar e, de acordo com seu tamanho não deve exceder 1,0 mm, diferente do ápice caulinar que consiste do meristema apical com primórdios foliares subjacentes e tamanho variável de 3 a 20 mm ou mais (TORRES et al., 1998).

Apesar de muitos trabalhos realizados envolvendo a cultura de células e tecidos em pimenteira-do-reino, ainda não há uma metodologia desenvolvida que viabilize a utilização de meristemas para limpeza clonal, sendo que, estudos sobre a eliminação de vírus constituem-se em uma estratégia importante para a clonagem e multiplicação de plantas matrizes.

Para isso, o estabelecimento do meristema em cultura é de extrema importância, pois a sobrevivência dos explantes (meristema) é determinante e o primeiro estágio para a regeneração de plantas. Segundo Torres et al. (1998), o estabelecimento engloba a coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura sob condições assépticas, etapas importante para a execução da limpeza clonal.

Porém, a técnica de limpeza clonal apresenta algumas limitações, dentre as quais a oxidação, contaminação e o desbalanço hormonal na região meristemática que dificulta a regeneração em uma planta completa (TORRES et al., 1998; PARMESSUR et al., 2002), especialmente para espécies lenhosas (NAVARRO, 1988; HANWEG, 1999).

A oxidação é uma problemática frequente na limpeza clonal, o escurecimento do explante é causado pela liberação de compostos fenólicos que são liberados quando os tecidos são lesados, a oxidação dos explantes é prejudicial na fase inicial, provocando uma redução na taxa de multiplicação e muitas vezes, a morte do explante. Isso faz com que os índices de sucesso sejam baixos e o processo seja trabalhoso e lento (AYABE; SUMI, 2001).

Outro problema frequentemente encontrado é a contaminação que pode se estabelecer no meio de cultura ou no explante e acaba competindo pelos nutrientes com a planta e, além

disso, podem liberar substâncias tóxicas no meio inibindo o desenvolvimento do explante, e desta forma, levar à perda deste material (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para conter a oxidação utiliza-se antioxidantes, tanto no meio de cultura quanto para imersão do explante, pois atuam na inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. De acordo com Sies e Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações em comparação à do substrato oxidável, que atrase ou iniba a oxidação deste substrato de maneira eficaz.

Para o controle das bactérias, diversos autores citam a inclusão de antibióticos ao meio de cultura (WILSON e POWER, 1989; GARCIA e RAFAEL, 1990; BARROS e PASQUAL, 1991; LEIFERT et al., 1991). Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de estabelecimento de meristema em cultivo *in vitro* da cultivar Kuthiravally de pimenteira-do-reino visando a eliminação dos vírus CMV e PYMoV a partir da definição de tamanho de explante, concentrações e tipos de antioxidantes e concentrações de antibióticos em meio de cultura MS.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos e no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, e constou das seguintes etapas: I indexação das plantas para vírus, II coleta do material e assepsia dos explantes (ápices caulinares e gema axilares), III retirada do meristema e estabelecimento, sendo estas três de quatro etapas da limpeza clonal (Figura 1). O material vegetal utilizado foi a cultivar kuthiravally de pimenteira-do-reino.

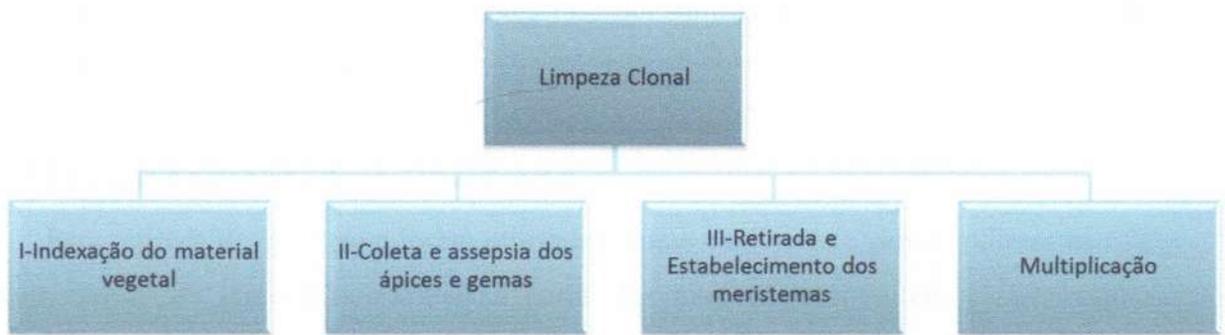


Figura1. Etapas para estabelecimento de meristema in vitro de pimenteira-do-reino. Belém, PA. 2015.

2.2.1 Indexação do material vegetal

Foram selecionadas cinco mudas de pimenteira-do-reino da cultivar kuthiravally da casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental infectadas com sintomatologia dos vírus CMV e PYMoV, para retirar explantes ápices e gemas axilares e se obter o meristema com o intuito de promover a limpeza clonal. Para a confirmação da presença dos vírus nas mudas da casa de vegetação foi realizada a indexação do material.

A extração de ácido nucléico foi realizada a partir de folhas de mudas de pimenteira-do-reino com e sem sintomas de mosaico da casa-de-vegetação, segundo o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997) modificado por meio da adição de 0,1% de β - mercaptoetanol, para verificar a presença dos vírus PYMoV e CMV por PCR e RT- PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), respectivamente. Foram usados controles de plantas de

pimenteira-do-reino para se obter um resultado seguro. Para controle positivo folhas infectadas com vírus e como controle negativo folhas de pimenteira-do-reino sadias.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em um termociclador com programas específicos para os vírus CMV e PYMoV. Sendo utilizados como material o DNA para o vírus PYMoV e o cDNA para o CMV. Utilizou-se 3 μ L do DNA e ou cDNA, 5 μ L de tampão 5X, 3 μ L de MgCl₂ (25mM), 0,25 μ L de primers (10mM), 0,15 μ L de Taq Polimerase, 0,5 μ L de dNTP (10mM), 12,85 μ L de água ultra-pura, e os primers específicos para os vírus, sendo o HP1 (F) e HP2 (R) para PYMoV e o CPR e CPF para CMV. A reação consistiu de 30 ciclos em que ocorreu a desnaturação, amplificação e anelamento.

Posteriormente, o resultado foi analisado através do gel de agarose a 0,8% em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5 mM por 40 minutos por 120w, o resultado do gel foi observado em fotodocumentador.

2.2.2 Coleta e assepsias do material vegetal

Para retirada de meristema foram utilizados ápices caulinares e gemas axilares da cultivar kuthiravally de pimenteira-do-reino a partir das mudas crescidas em casa-de-vegetação oriundas do banco ativo de germoplasma (BAG) localizado na Embrapa Amazônia Oriental – Belém/Pará.

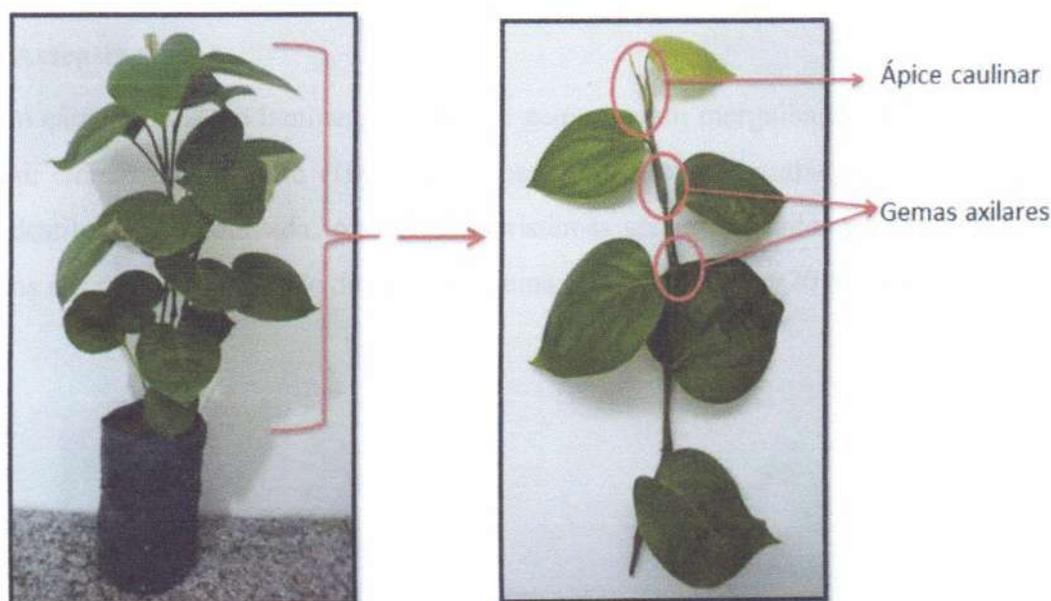


Figura 2. Mudas de pimenteira-do-reino produzidas em casa de vegetação para a retirada de ápices e gemas para obtenção de explantes meristemáticos.

2.2.3 Pré-asepsia

Os ápices caulinares e gemas axilares retirados com o auxílio de um bisturi foram imersos em ácido cítrico (50mM) e no laboratório submetidos à pré-asepsia que constou de lavagem manual dos mesmos em água corrente e detergente neutro e imersão em solução do fungicida Derosal (100 mg.L⁻¹) durante 20 minutos.

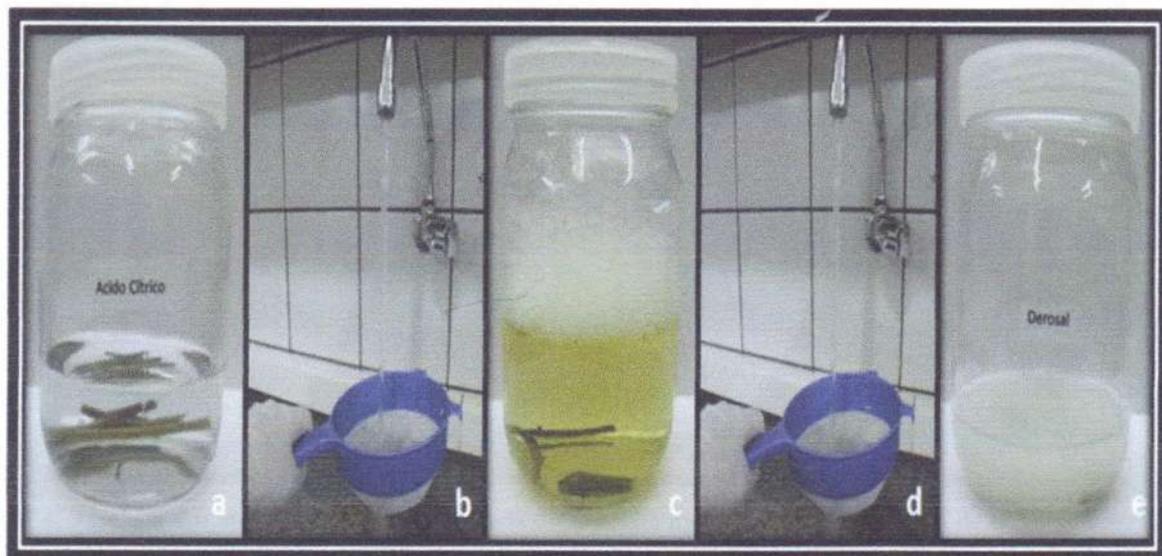


Figura 3. Pré-asepsia dos ápices e gemas para retirada de explante meristemático (a) ácido cítrico, (b) lavagem em água corrente, (c) detergente neutro, (d) lavagem em água corrente, (e) fungicida derosal.

2.2.4 Assepsia

Em câmara de fluxo laminar, os ápices e gemas foram mergulhados em álcool 70% por 1 minuto, cloreto de mercúrio (100 mg.L⁻¹) por 10 minutos, seguidas de cinco lavagens com água destilada e autoclavada. Antes dos meristemas serem excisados para inoculação, foram imersos em solução de sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹) por 20 minutos.

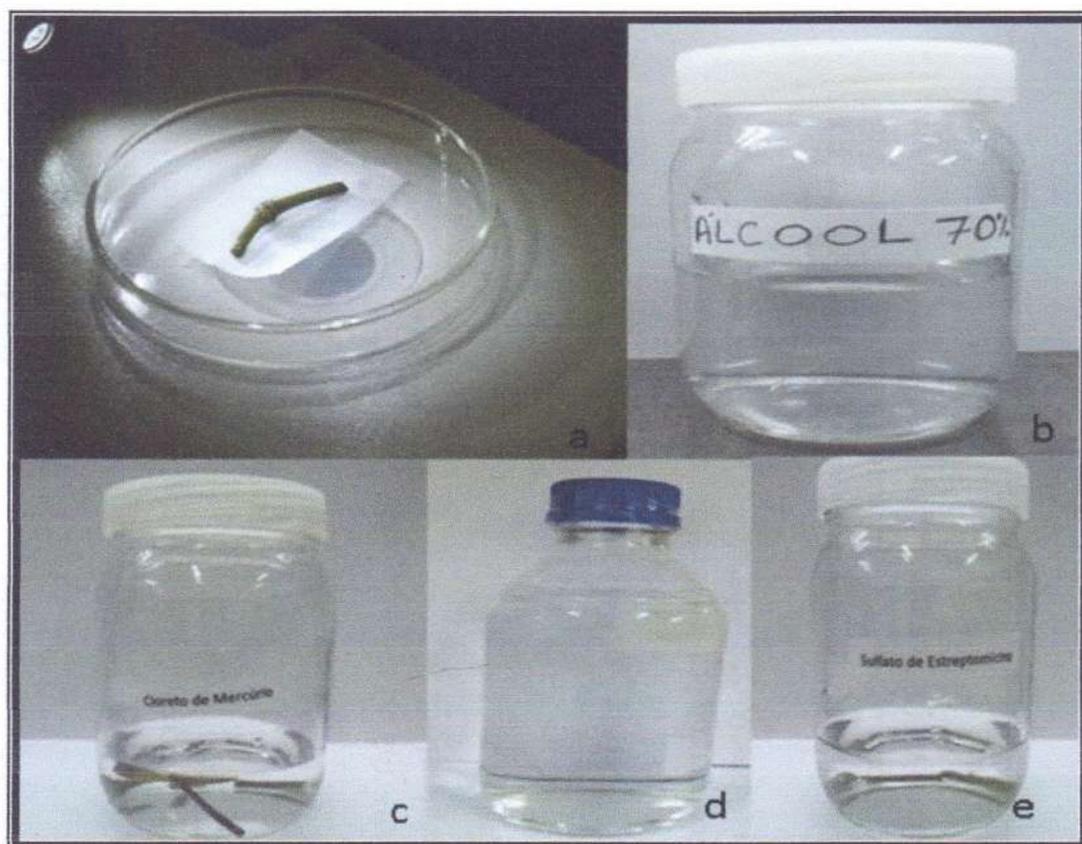


Figura 4. Assepsia dos ápices e gemas para retirada do explante meristemático em câmara de fluxo laminar (a) ápices e gemas; (b) álcool 70%;(c) cloreto de mercúrio;(d) Frasco com água destilada autoclavada;(e) Sulfato de estreptomicina.

A pré-assepsia e a assepsia foram comuns para todos os experimentos, distinguindo-se um do outro, o antioxidante utilizado na imersão e umidificação no processo de excisão do meristema e o meio de cultura para estabelecimento *in vitro*.

Tabela 1. Experimentos realizados para o estabelecimento do meristema da cultivar Kuthiravally de pimenteira-do-reino.

EXPERIMENTO	IMERSÃO	MEIO DE CULTURA	REPETIÇÕES	TRATAMENTO
MERISTEMA 1	<p>Antioxidante: β-Mercaptoetanol (5mM)</p> <p>Antibiótico: Sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹)</p> <p>Cortes: Diferentes tamanhos de cortes</p>	MS + 0,5 BAP+ 0,2 AIA + 0,1 g. L ⁻¹ de Sulfato de estreptomicina	25 repetições e cada repetição composta por um tubo com um meristema	1
MERISTEMA 2	<p>Antioxidante: PVP (3%); Ácido cítrico (5mM); Ácido ascórbico (3mM); DTT (3mM); β-Mercaptoetanol (5mM)</p> <p>Antibiótico: Sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹)</p>	MS + 0,5 BAP+ 0,2 AIA + 0,1 g. L ⁻¹ de Sulfato de estreptomicina	5 repetições por tratamento e cada repetição composta por um tubo com um meristema	5
MERISTEMA 3	<p>Antioxidante: PVP (3%)</p> <p>Antibiótico: Sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹)</p>	MS + 0,5 BAP+ 0,2 AIA + Diferentes concentrações de PVP (0,4%; 0,5% e 0,6%) e Diferentes concentrações de Sulfato de estreptomicina (0,0%; 0,05% e 0,1%)	5 repetições por tratamento e cada repetição composta por um tubo com um meristema	9
MERISTEMA 4	<p>Antioxidante: PVP (3%)</p> <p>Antibiótico: Sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹)</p>	MS + 0,5 BAP+ 0,2 AIA + 0,1 g. L ⁻¹ de Sulfato de estreptomicina + Diferentes concentrações de PVP (0,8%; 1,0%; 2,0% e 3,0%)	5 repetições por tratamento composta por um tubo com um meristema	4

2.2.5 Experimento meristema 1 – imersão e umidificação com β -mercaptoetanol (5mM) e sulfato de estreptomicina a 0,1 g.L-1, em meio de cultura e diferentes tamanhos de cortes.

Retirada dos meristemas

Os explantes meristemáticos assépticos foram excisados a partir dos ápices e gemas com o auxílio de lupa estereomiscrópio da marca LEICA EZ4HD e lamina milimetrada em câmara de fluxo laminar com tamanho de corte variando entre 0,1; 0,2 e 0,3 mm de comprimento. Durante o processo de retirada dos meristemas, os ápices e gemas ficaram imersos em β -Mercaptoetanol e durante a manipulação para excisão do meristema ocorreu a umidificação com β -Mercaptoetanol a 5 mM (anti-oxidante) e Sulfato estreptomicina 100 mg. L⁻¹ (antibiótico) para se evitar a oxidação e contaminação por bactérias antes da inoculação do explante em meio de cultura.

Meio de cultivo

Os meristemas foram inoculados em tubo de vidro com capacidade para 50ml e contendo 20 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose 3%, vitaminas MS e suplementados com 0,5 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP), 0,2 mg. L⁻¹ ácido indolacético (AIA) e 0,1 g. L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2% e os frascos foram vedados com filme de PVC resinite e foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹ com intensidade luminosa de 3.000 lux à temperatura de 25± 3 °C.

Foi utilizados 25 repetições e cada repetição composta por um tubo com um explante cada.

A avaliação do 1º experimento foi feita em um período de 72 horas e foi quanto ao grau de oxidação (Tabela 2) e porcentagem de contaminação.

Tabela 1. Graus de avaliação de oxidação do tecido meristemático.

GRAUS DE OXIDAÇÃO	
Sinal	Grau de oxidação
0	Não oxidação
0 ⁺	Levemente oxidado
0 ⁺⁺	Moderadamente oxidado
0 ⁺⁺⁺	Totalmente oxidado

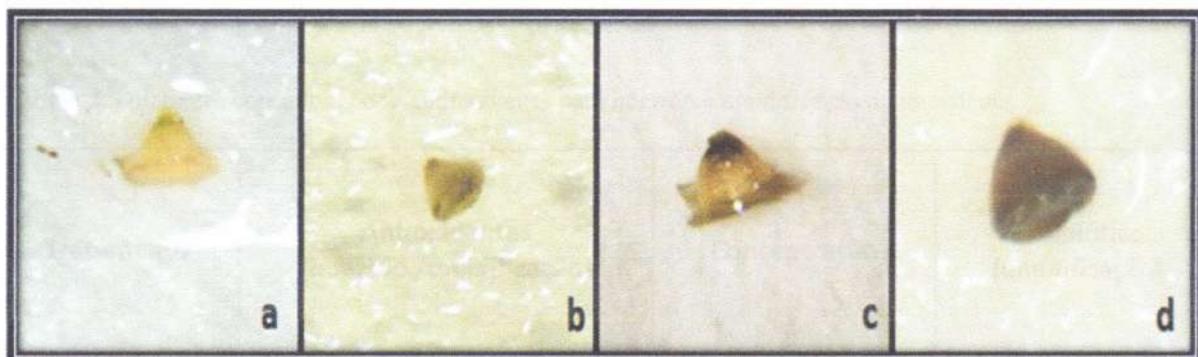


Figura 5. Graus de oxidação do tecido meristemático (a) Não oxidado; (b) Levemente oxidado; (c) Moderadamente oxidado; (d) Totalmente oxidado.

2.2.6 Experimento meristema-2 Teste de diferentes tipos e concentrações de antioxidantes na retirada dos meristemas.

Retirada dos meristemas

A excisão do meristema foi realizada como supracitado e o tamanho dos cortes foram variados entre 0,1; 0,2 e 0,3 mm, porém desta vez com imersão dos ápices e gemas durante os cortes em diferentes antioxidantes (Tabela 3) e no processo de corte a umidificação com os diferentes antioxidantes e Sulfato Estreptomicina (100 mg.L^{-1}) para se evitar a oxidação e contaminação por bactérias dos meristemas.

Meio de cultivo

Os meristemas foram inoculados em tubo de vidro com capacidade para 50ml e contendo 20 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose 3%, vitaminas MS e suplementados com 0,5 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP), 0,2 mg. L⁻¹ ácido indolacético (AIA) e 0,1 g. L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2% e os frascos foram vedados com filme de PVC resinite e foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹ com intensidade luminosa de 3.000 lux à temperatura de 25± 3 °C.

Cada tratamento foi constituído de 5 repetições, representada por um tubo com um explante cada.

Semanalmente foi avaliado o grau de oxidação (Tabela 2) e porcentagem de contaminação.

Tabela 2. Diferentes concentrações e antioxidantes para imersão e umidificação do meristema.

Tratamento	Antioxidantes (imersão /umidificação)	Concentração	Antibiótico (umidificação)
T1	Polivinilpirrolidona (PVP)	3 %	Sulfato estreptomicina 100 mg.L ⁻¹
T2	Acido Cítrico	5 mM	
T3	Acido Ascórbico	3 mM	
T4	Ditiotreitól (DTT)	3 mM	
T5	β-Mercaptoetanol	3 mM	

2.2.7 Experimento meristema 3 - Diferentes doses de sulfato de estreptomicina e polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.

Retirada dos meristemas

Os explantes meristemáticos foram retirados como descrito anteriormente e durante a manipulação os ápices e gemas ficaram imersos em PVP 3% e no processo de corte para retirada do meristema ocorreu a umidificação em PVP 3% e sulfato de estreptomicina (100 mg.L^{-1}).

Meio de cultivo

Os meristemas foram inoculados em tubo de vidro com capacidade para 50ml e contendo 20 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose 3%, vitaminas MS e suplementados com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP), $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ácido indolacético (AIA), $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina e a adição de diferentes doses de polivinilpirrolidona (PVP; 0,4%; 0,5%; 0,6%) combinados com diferentes doses de sulfato de estreptomicina ($0,0 \text{ g.L}^{-1}$; $0,05 \text{ g.L}^{-1}$; $0,1 \text{ g.L}^{-1}$) (Tabela 4). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2% e os frascos foram vedados com filme de PVC resinite e foram autoclavados a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições de cultivo foram fotoperíodo de $16 \text{ h luz dia}^{-1}$ com intensidade luminosa de 3.000 lux à temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi utilizadas 5 repetições por tratamento e cada repetição composta por um tubo com um meristema cada.

Semanalmente, durante o cultivo *in vitro*, foi avaliado o grau de oxidação (Tabela 2) e porcentagem de contaminação de cultivo *in vitro*.

Tabela 3. Diferentes concentrações do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e do antibiótico sulfato de estreptomicina em meio de cultura.

TRATAMENTO	ANTIBIOTICO (sulfato de estreptomicina)	Antioxidante (PVP)
T1		0,4 %
T2	0,0 g.L ⁻¹	0,5 %
T3		0,6 %
T4		0,4 %
T5	0,05 g.L ⁻¹	0,5 %
T6		0,6 %
T7		0,4 %
T8	0,1 g.L ⁻¹	0,5 %
T9		0,6 %

2.2.8 Experimento meristema 4 – Diferentes doses de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.

Retirada dos meristemas

Os explantes meristemáticos foram retirados como descrito anteriormente e durante a manipulação os ápices e gemas ficaram imersos em PVP 3% e no processo de corte para retirada do meristema ocorreu a umidificação em PVP 3% e sulfato de estreptomicina (100 mg.L⁻¹).

Meio de cultura

Os meristemas foram inoculados em tubo de vidro com capacidade para 50ml e contendo 20 ml de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo sacarose 3%, vitaminas MS e suplementados com 0,5 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP), 0,2 mg.L⁻¹ ácido indolacético (AIA), 0,1 g.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina e foi adicionado quatro diferentes doses do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP 0,8; 1,0; 2,0; e 3,0% p/v) (Tabela 5). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2%

e os frascos foram vedados com filme de PVC resinite e foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições de cultivo foram fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹ com intensidade luminosa de 3.000 lux à temperatura de 25± 3 °C.

Foram utilizados 5 repetições por tratamento e cada repetição composta por um tubo com um explante cada. Semanalmente foi avaliado o grau de oxidação (Tabela 2) e porcentagem de contaminação no período de 4 semanas.

Tabela 4. Diferentes concentrações do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.

Cultivar	Reguladores	Antibiótico (Sulfato de estreptomicina)	Antioxidante (PVP)
Kuthiravally	BAP 0,5 mg L ⁻¹ + AIA 0,2 mg L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	0,8 %
			1,0 %
			2,0 %
			3,0 %

2.3 Resultados

2.3.1 Indexação do material vegetal

A indexação das amostras da cultivar Kuthiravally oriundas da casa vegetação foram positiva para o vírus PYMoV. O par de primer para o PYMoV permitiu a amplificação de bandas de 450pb como mostra a (Figura 6). Em seis das dez amostras foi detectadas o vírus PYMoV ,.

A partir desse resultado, foi retiradas das plantas que se apresentaram positivas os ápices e gemas axilares para a realização da retirada do meristema, para tentar realizar a limpeza clonal dessas plantas via tecido meristemático.

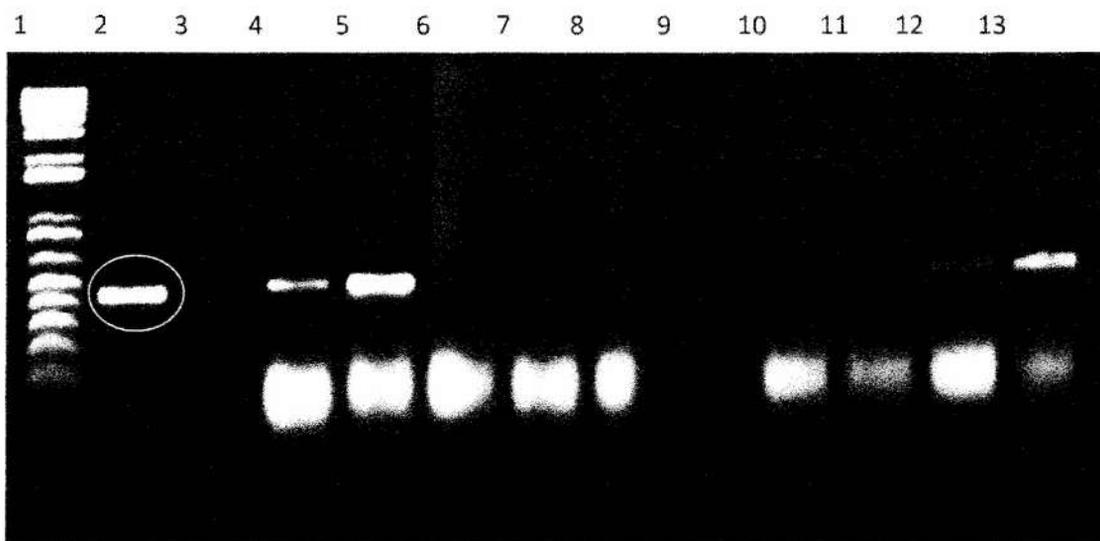


Figura 6. Teste de PCR para Piper yellow mottle virus para amostras de pimenta-do-reino. M. marcador Kb ladder, 1. controle positivo PYMoV; 2. controle negativo de *P. nigrum*, 3 a 10 amostras provenientes da casa de vegetação da Embrapa Amazônia oriental.

2.3.2 Experimento meristema 1 – Teste de imersão e umidificação com β -mercaptoetanol (5mM) e sulfato de estreptomicina a ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) em meio de cultura e tamanhos do explante (meristema).

A imersão e umidificação com solução de 5mM de β -Mercaptoetanol no processo de manipulação e cultivo de explantes que variaram de 0,1; 0,2 e 0,3 mm proporcionaram 88%, 83%, 86% de oxidação moderada, respectivamente para 0,1; 0,2, e 0,3 mm. Os demais levemente oxidados, sendo que não se observou oxidação total nas primeiras 24 horas.

No segundo dia, grande parte dos meristemas com 0,1 e 0,2 mm possuíram respectivamente oxidação total em 81% e 83% e 19% e 17% com oxidação moderada e para o maior tamanho 0,3 mm a maioria dos explantes apresentou-se moderadamente oxidado (84%) e os demais (16%) levemente oxidado. Após 72 horas, 100% dos explantes apresentavam-se totalmente oxidado, sendo que esse nível de oxidação promoveu a morte dos meristemas (Figura 7).

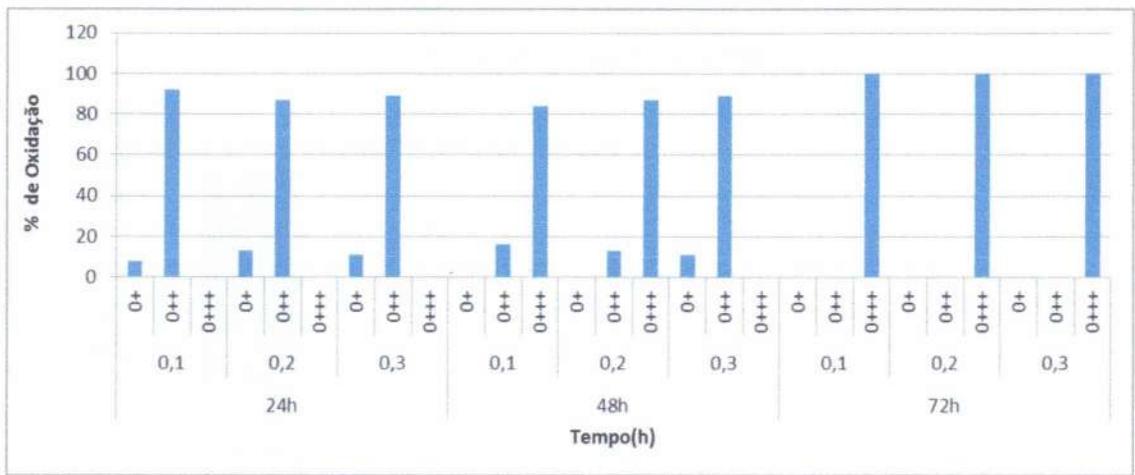


Figura 7. Percentagem de oxidação do explantes da cultivar Kuthiravally até às 72 horas.

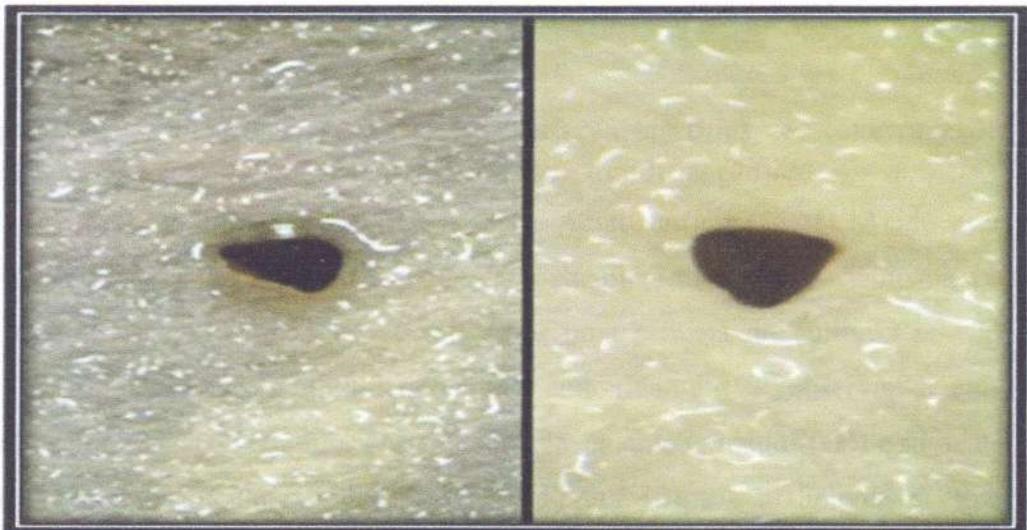


Figura 8. Meristema totalmente oxidado em um período de 72 horas.

Ocorreu baixa incidência de contaminação no primeiro experimento, sendo que (87%) dos meristemas não apresentaram nenhum tipo de contaminação e (8%) por contaminação bacteriana e apenas (5%) fungica (Figura 9). Isto se dá a partir das estratégias adotadas de assepsia, sendo controlada a contaminação que se constitui um dos maiores problemas ao estabelecimento do cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino.

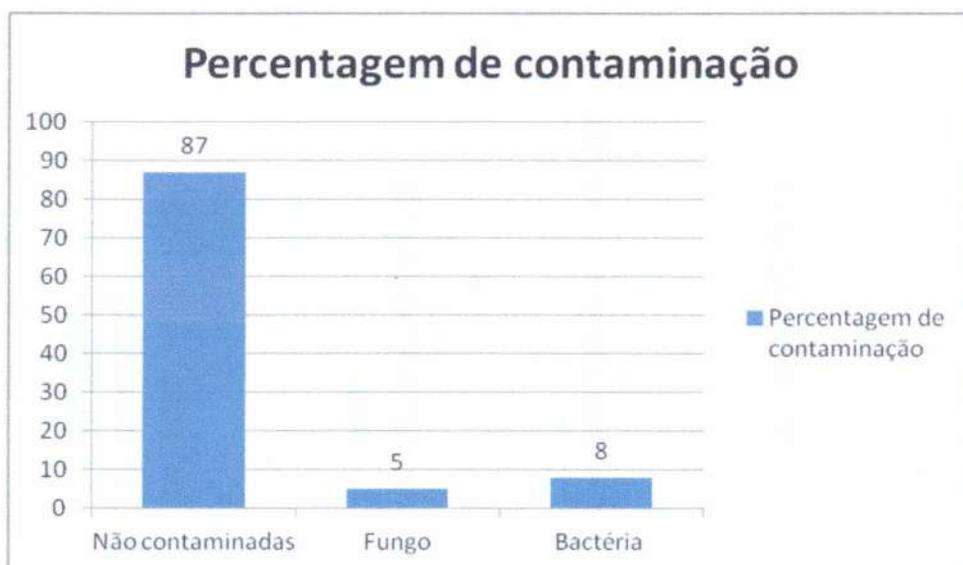


Figura 9. Percentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema da cultivar Kuthiravally.

2.3.3 Experimento meristema-2 Teste de diferentes tipos e concentrações de antioxidantes na retirada dos meristemas (imersão e umidificação).

O efeito de polivinilpirrolidona (PVP) (3%), Acido cítrico (5mM), Acido ascórbico (3mM), Ditiotreitól (DTT) (3mM) e o β -Mercaptoetanol (3mM) usados tanto na imersão quanto na umidificação do material vegetal. Após uma semana do cultivo *in vitro* dos meristemas que foram imersos e umidificado com o antioxidante PVP, observou-se que 40% dos explantes sem oxidação (**O**), 40% dos explantes levemente oxidados (**O⁺**) e somente 20% dos explantes moderadamente oxidados (**O⁺⁺**) (Figura 10), e não houve a morte dos meristemas, apresentando ao final do período avaliado 100% dos explantes vivos.

Os demais antioxidantes, Acido Cítrico, Acido ascórbico, DTT e β -Mercaptoetanol não controlaram a oxidação, pois apresentaram respectivamente, 80 %, 100%, 100% e 100% dos explantes totalmente oxidados (**O⁺⁺⁺**) que provocaram a morte dos explantes quando totalmente oxidados (Figura 10).

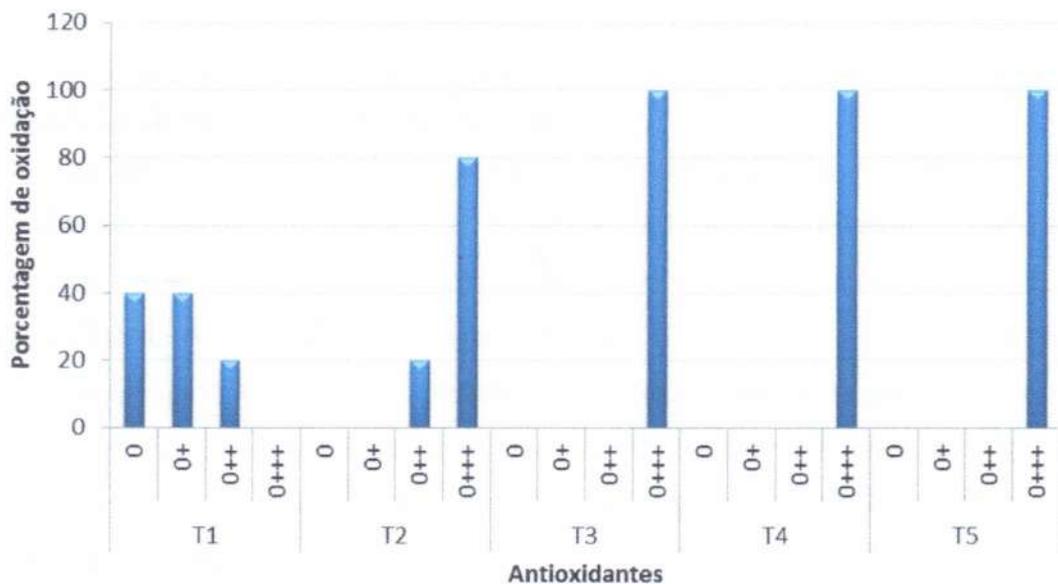


Figura 10. Percentagem de sobrevivência no período de uma semana em diferentes tipos e doses de antioxidantes na retirada de meristema. Sendo (T1) Polivinilpirrolidona (3%); (T2) Acido Cítrico (5mM); (T3) Acido Ascórbico (3 mM); (T4) Ditiotreititol (3mM); (T5) β- Mercaptoetanol (3mM).

No segundo experimento, foram observados que (81%) dos meristemas em um período de quatro semanas apresentavam ausência de contaminação e (19%) dos explantes apresentaram-se contaminados, sendo (5%) por fungos e (14%) por bactérias (Figura 11).

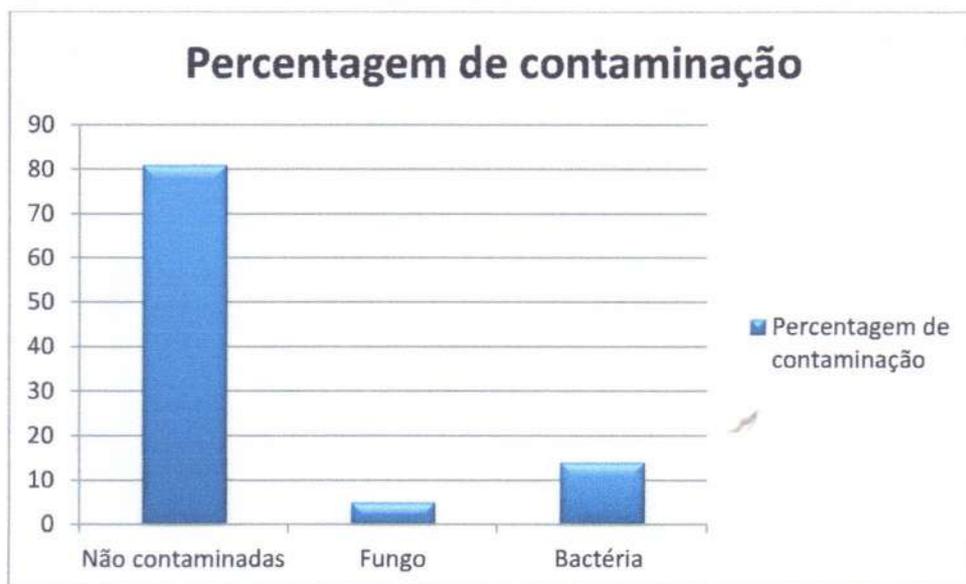


Figura 11. Percentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema no segundo experimento.

2.3.4 Experimento meristema 3- Diferentes doses de sulfato de estreptomicina e polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.

De acordo com os resultados obtidos no experimento 2, com o objetivo de conter a oxidação foi realizado o experimento 3 com a utilização de diferentes concentrações de sulfato de estreptomicina em conjunto com diferentes concentrações de PVP ao meio de cultura (Tabela 4). A análise dos tratamentos T1, T2 e T3 com a ausência do antibiótico sulfato de estreptomicina, pode se observar que todos os meristema apresentaram algum tipo de contaminação, sendo que as contaminações mais frequentes foram as ocasionadas por bactérias onde esses tratamentos apresentaram respectivamente 90%, 100% e 80% de meristema contaminados por bactérias.

Os tratamentos contendo 0,05 do sulfato de estreptomicina T4, T5 e T6, pode observar a presença de meristema sem contaminação, mostrando assim uma possível ação do antibiótico no controle da contaminação bacteriana do material vegetal na etapa de estabelecimento, onde T4, T5 e T6 apresentaram concomitantemente 30%, 0% e 40% de meristemas contaminados por bactéria.

Os tratamentos T7, T8 e T9 o qual se utilizou 0,1 g L⁻¹ de sulfato de estreptomicina mostraram-se eficientes, pois, pode se observar um numero maior de explantes não contaminados, onde T8 e T9 apresentaram menores índices de contaminação com 80% de explante não contaminados e T7 apresentou 60% dos explantes livres de contaminação (Figura 12).

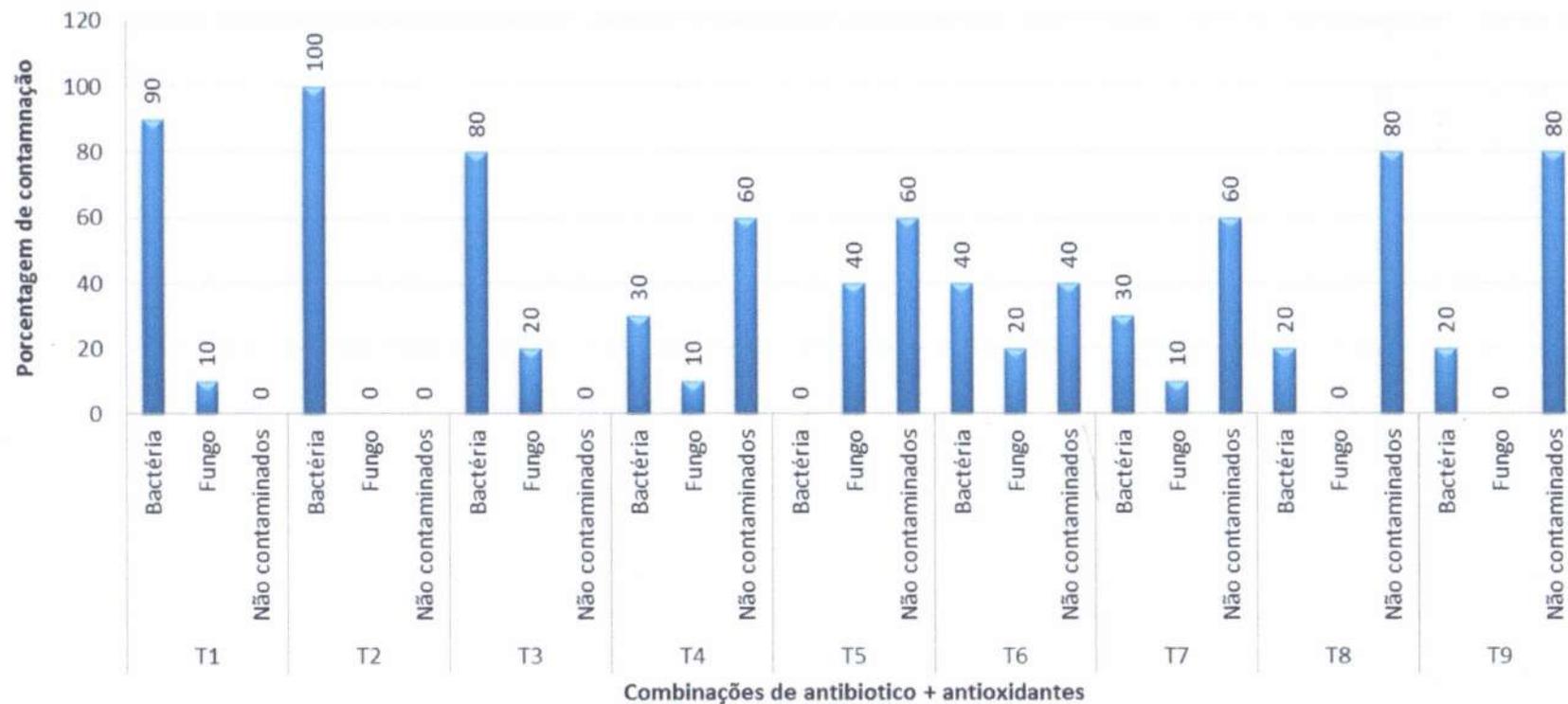


Figura 12. Porcentagem de contaminação fungica e bacteriana em meristema no terceiro experimento, onde (T1) 0,0 g L⁻¹ + 0,4 %; (T2) 0,0 g L⁻¹ + 0,5 %; (T3) 0,0 g L⁻¹ + 0,6 %; (T4) 0,05 g L⁻¹ + 0,4 %; (T5) 0,05 g L⁻¹ + 0,5 %; (T6) 0,05 g L⁻¹ + 0,6 %; (T7) 0,1 g L⁻¹.

Quanto à oxidação observou-se que o tratamento T9 que continha (0,6 % de PVP e 0,1g L⁻¹ de sulfato de estreptomicina) obteve os melhores resultados, pois o mesmo apresentou 60% dos meristemas com baixo grau de oxidação, isto é levemente oxidado, seguido de 20% moderadamente e 20% totalmente oxidado. Diferente dos tratamentos T1, T2, T3, T5, T7 e T8 que apresentaram 40% ou mais meristemas totalmente oxidados. Já os tratamentos T4 e T6 apresentaram meristemas levemente oxidados (20% e 40%), moderadamente oxidados (60% e 40%) e totalmente oxidados (20% e 20%) (Figura 13).

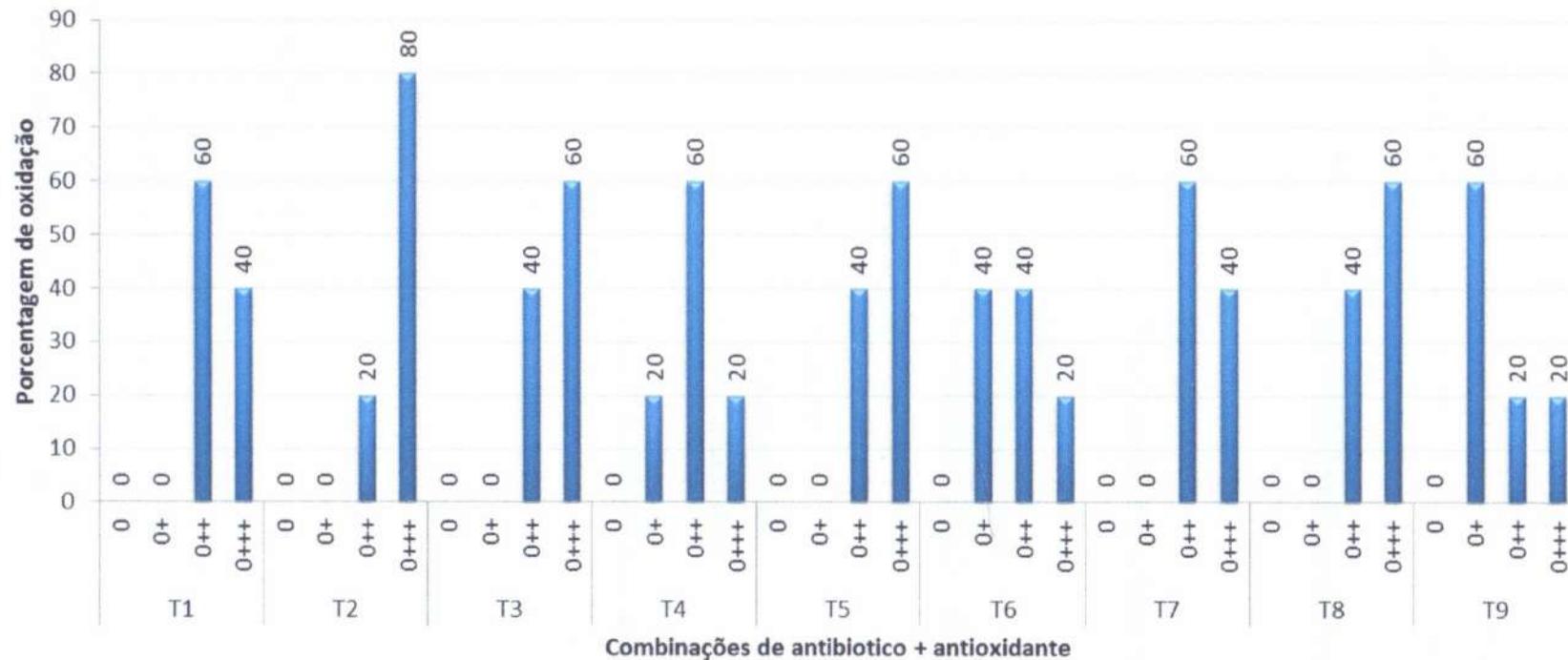


Figura 13. Percentual de oxidação de meristemas no terceiro experimento utilizando diferentes concentrações de PVP, onde (T1) 0,0 g L-1 + 0,4 %, (T2) 0,0 g L-1 + 0,5 %, (T3) 0,0 g L-1 + 0,6 %; (T4) 0,05 g L-1 + 0,4 %, (T5) 0,05 g L-1 + 0,5 %, (T6) 0,05 g L-1 + 0,6 %.

2.3.5 Experimento meristema 4 – Diferentes doses do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) em meio de cultura.

A fim de controlar ainda mais a oxidação, ao testar diferentes concentrações do antioxidante PVP no meio de cultura, T1(0,8%), T2 (1,0 %),T3 (2,0%) e T4 (3,0%), pode-se observar na menor concentração T1 de PVP resultou (42,85%) de explantes sem oxidação (Figura 14), seguidos dos tratamentos T3(28,57%) e T2 e T4 com (14,28%).

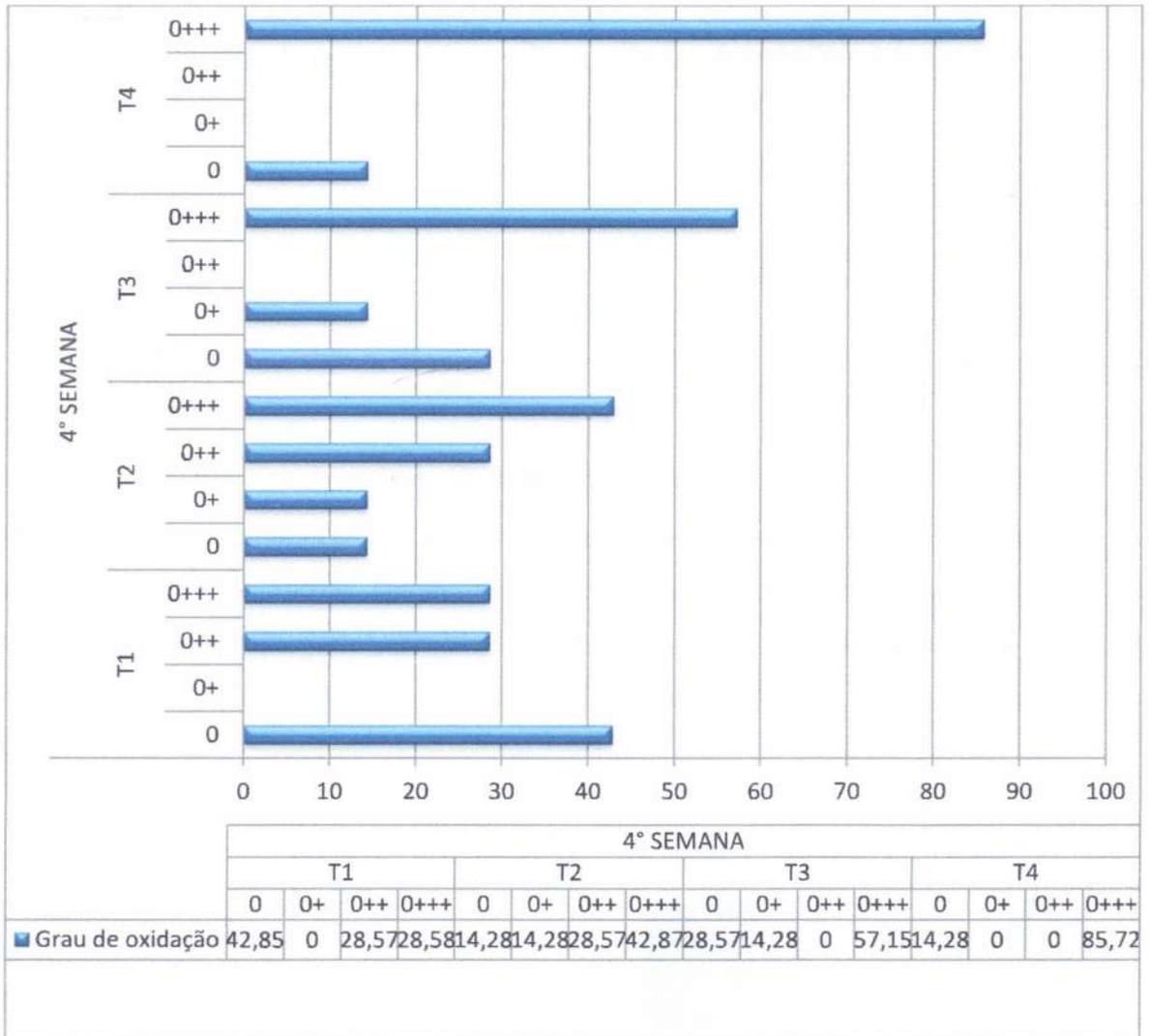


Figura 14. Percentual de oxidação de meristemas no quarto experimento após 4 semanas de cultivo, onde T1 (0,8%) ;T2 (1,0%);T3 (2,0%);T4 (3,0%).

No grafico a seguir (Figura 15) a regressão representa as perdas por oxidação no expermento quatro com doses maiores de PVP em meio de cultura. É possível observar que nos tratamentos T2 e T4 há uma tendência em diminuir a perda de explantes por oxidação a medida que se aumenta o número de semanas. Já nos tratamentos T1 e T3 a um aumento de perda por oxidação até a segunda semana, após a segunda semana ocorre um decrescimo dessas perdas.

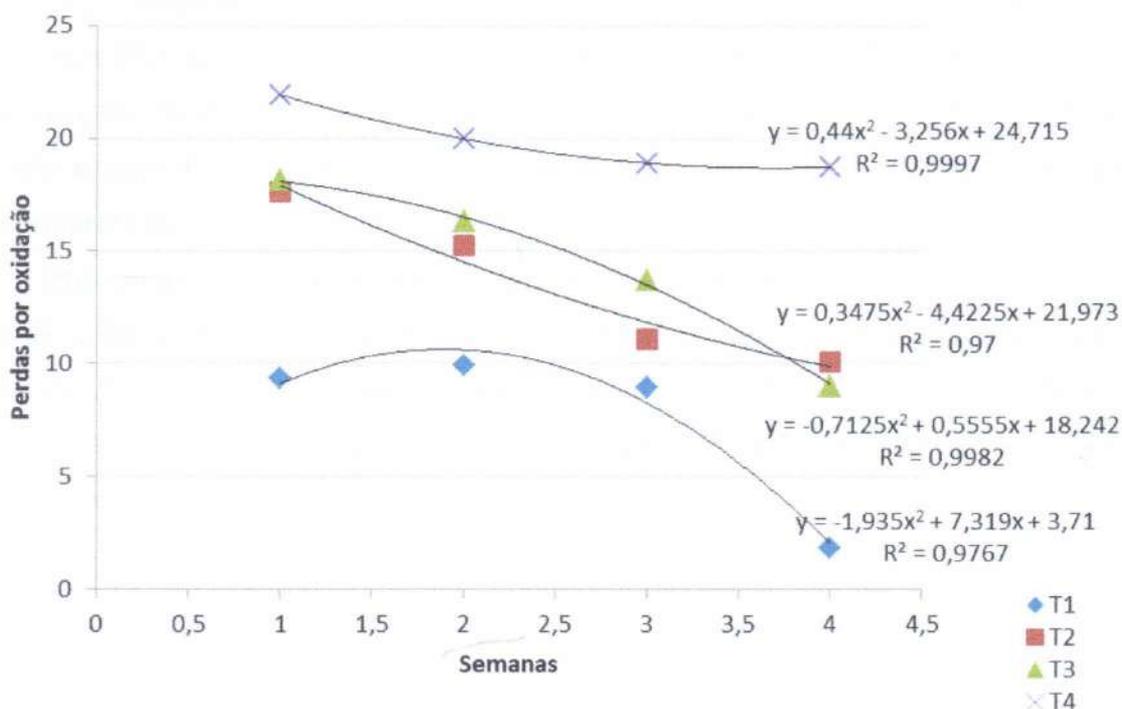


Figura 15. Perdas por oxidação total de meristemas no quarto experimento.

As taxas de contaminação no quarto experimento foram de 18% para as quatro semanas e foi observada apenas contaminação bacteriana (Figura 16), sendo 82% dos explantes ausentes de contaminantes, mostrando assim a eficiência da utilização de 100 mg.L^{-1} sulfato de estreptomicina na umidificação e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ no meio de cultura para controlar a contaminação bacteriana.



Figura 16. Porcentagem de contaminação fungica e bacteriana de meristemas no quinto experimento.

Para controlar a oxidação, dentre os antioxidantes utilizados, destacou-se o antioxidante PVP na concentração de (3%). Em meio de cultura o PVP em combinação com antibiótico, os resultados mostraram que a concentração do antibiótico não interferiu na oxidação e controlou a contaminação, e a combinação 0,6% de PVP e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ apresentou maior controle da oxidação e contaminação em meio de cultura, respectivamente.

Para conter ainda mais a oxidação ao testar diferentes doses do antioxidante PVP em meio de cultura com concentrações maiores (0,8%;1,0%;2,0% e 3%), a concentração de (0,8%) em meio de cultura associado à manipulação do explante no processo de excisão do meristema pela imersão e umidificação do explante em PVP a (3%) apresentou maior controle da oxidação.

2.4 Discussão

Na etapa do estabelecimento do tecido meristemático, as grandes limitações encontradas foram as perdas ocasionadas por oxidação e contaminação bacteriana, e a capacidade de regeneração de uma planta completa a partir do meristema.

Resultados semelhantes foram encontrados por Torres (1998) e Parmessur (2002) ao realizarem a técnica da limpeza clonal que se deparando com problemáticas relacionadas à oxidação, contaminação do material vegetal, além do desbalanço hormonal na região meristemática que dificulta a regeneração em uma planta completa.

Segundo Modgil et al. (1999), a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, o presente trabalho vem mostrando esta problemática pois no experimento 1 o alto grau de oxidação provocou a morte de todos os explantes até o terceiro dia (Figura 7), não permitindo o estabelecimento dos meristemas. A liberação de compostos que promovem o escurecimento do meio, provavelmente fenólicos, compromete o desenvolvimento dos explantes diminuindo a taxa de regeneração (GIATTI 2006).

Para Andrade et al.(2000) a oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos.

Para o controle da oxidação, diversos produtos podem ser adicionados ao meio de cultura, como a cisteína, carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, ou ácido cítrico. Muitas dessas substâncias agem adsorvendo os exsudatos liberados pelos explantes, os quais causam a oxidação (JARRET et al., 1985; GEORGE,1996b).

Foram testados diferentes concentrações e tipos de antioxidantes na imersão e umidificação do material meristemático como o PVP (3%), ácido cítrico (5mM), ácido ascórbico (3mM), DTT (3mM) e o β -Mercaptoetanol (3mM) em diferentes experimentos. Sendo que o antioxidante PVP a 3% foi eficiente na contenção da oxidação nas etapas de imersão e umidificação, pois 40% dos explantes apresentavam-se sem oxidação outros 40% levemente oxidado e 20% moderadamente oxidados (Figura 10).

Para prevenir a ocorrência de oxidação, George (1996) recomenda minimizar os danos causados ao explante por meio da remoção de compostos fenólicos produzidos e de alterações na composição do meio de cultura. A remoção dos compostos pode ser realizada através da

utilização de meios líquidos, de diferentes agentes solidificantes, ou de substâncias de adsorção.

Outra maneira de se conter a oxidação é o uso de antioxidantes em meio de cultura, como realizado por Silva et al. (2001), que utilizou vários antioxidantes na cultura *in vitro* para tentar controlar a oxidação da bananeira (*Musa* sp. cv. Pioneira).

No presente estudo foram testados experimentos com diferentes concentrações do antioxidante PVP (0,4%;0,5%;0,6%;0,8%;1,0%;2,0%;3,0%) adicionados ao meio de cultura de estabelecimento. A concentração de 0,8% de PVP proporcionou 42,85% dos explantes sem oxidação (Figura 14). Segundo Augusto e Biasi (2002), a adição de 1,0 g.L⁻¹ de PVP solúvel no meio sólido controla a oxidação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) e, de acordo com Cordeiro et al. (2002), foi eficiente no controle da oxidação em sementes de paricá.

Vários estudos vêm demonstrando a eficiência desse antioxidante no controle da oxidação como os produzidos por (ANAGNOSTAKIS, 1974; TISSERAT, 1979; TAKAYAMA e MISAWA, 1980; BON et al., 1988; GUERRA e HANDRO,1988 e ZIV e HALEVY, 1983).

O antioxidante PVP tem sido bastante empregado devido os fenóis serem adsorvidos pelo polivinilpirrolidona por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas (PASQUAL et al. 1997), pois em algumas plantas, a liberação de exsudatos constitui um dos maiores problemas para o cultivo *in vitro* (QUERALT et al., 1991).

Para conter a contaminação pesquisas têm sido realizadas para a prevenção ou eliminação dos contaminantes do cultivo *in vitro* de plantas, desde o desenvolvimento de protocolos de assepsia, cuidados com as plantas matrizes, até o uso de produtos antimicrobianos, adicionados ao meio de cultura (PEREIRA et al., 2009).

As combinações dos princípios ativos desinfestantes podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária a adequação de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado.

Neste trabalho, a contaminação foi controlada pela desinfestação realizada na pré-assepsia fora da câmara de fluxo laminar com o uso do fungicida derosal a 100 mg.L⁻¹ em que apenas 5 % dos explantes apresentaram contaminação fungica e para reduzir a contaminação bacteriana, adição de 0,1 g.L⁻¹ do sulfato de estreptomicina ao meio de cultura e na umidificação do material vegetal durante a manipulação para excisão do meristema, no qual se observou apenas 18% de contaminação após quatro semanas de cultivo *in vitro* (Figura16).

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2011) usando o antibiótico sulfato de estreptomicina na concentração de 100 mg.L^{-1} que foi eficiente no controle da contaminação, independente da cultivar de banana utilizada.

Segundo Garcia e Rafael et al. (1990), o uso de meio de cultura com produtos antimicrobianos é uma das alternativas para prevenir, eliminar ou diminuir a contaminação bacteriana. A estreptomicina é considerada um dos antibióticos menos tóxicos do grupo dos aminoglicosídeos e seu efeito decorre da concentração no meio de cultura (POLLOCK et al., 1983).

Segundo Lopes (1988), as contaminações bacterianas são mais drásticas que as fúngicas e trazem duas consequências básicas: a primeira é a perda de tempo e de recursos financeiros ou genéticos pela eliminação de frascos contaminados, e a segunda é o risco de contaminação de outras plantas.

Os agentes descontaminantes promoveram baixíssimos ou nenhum índice de contaminação fúngica pela ação do derosal 100 mg.L^{-1} . Isto foi um avanço neste trabalho, pois esses microrganismos competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos e prejudicam o estabelecimento e respostas *in vitro* dos explantes.

Segundo Cid e Zemmermann (2006) os fungicidas estão destinados à proteção das plantas, destruindo o inoculo antes que se espalhe e forme micélio pela planta, o qual dá origem à doença, quando a mesma já se apresenta na planta o fungicida pode atuar, também, como bloqueia da doença, seja de forma local ou sistêmica.

Os explantes variando de tamanho o meristema (0,1; 0,2 e 0,3mm), independente do tamanho dos explantes não houve interferência na morte do material, pois 100% dos meristemas morreram no período de 72 horas devido à oxidação total dos meristemas (Figura 7).

Estudos relatam que o tamanho do meristema constitui um fator de importância na aquisição de material livre de patógenos, devido essa região ser avascularizada (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TORRES et al., 1998).

O menor tamanho promove instabilidade ao explante, tanto em relação à oxidação, quanto no balanço hormonal, e o desenvolvimento se torna extremamente lento. Esse comportamento é também observado em outras espécies cujo cultivo de meristema é usado para limpeza clonal e o tamanho do explante é decisivo para o êxito do trabalho. Biricolti e Chiari (1994), utilizando meristemas de 0,2 a 0,4 mm de comprimento de plantas de

Passiflora edulis f. edulis com no máximo quatro primórdios foliares, coletados de plantas com um ano de idade não obtiveram regeneração apesar da sobrevivência dos explantes por longo período. Esta situação é de ocorrência comum em espécies lenhosas e semi-lenhosas (MURASHIGE et al., 1972; NAVARRO, 1988; PAZ; PASQUAL, 1998; MNENEY; MANTELL, 2001).

É importante destacar que a realização dos diversos experimentos na imersão, umidificação e no cultivo em meio de cultura para o estabelecimento realizado em conjunto neste trabalho, mostraram-se necessários e complementares para conter a oxidação e contaminação do meristema.

2.5 Conclusões

- A indexação prévia das plantas é necessária para revelar se há infecção dos explantes pelo vírus PYMoV.
- O uso do antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) a 3% para imersão e umidificação e a 0,8% em meio de cultura são eficientes para conter a oxidação do meristema da cultivar Kuthiravally de pimenteira-do-reino.
- O controle da oxidação *in vitro* de meristemas só é eficiente se o antioxidante PVP for utilizado em solução para imersão e umidificação e em conjunto no meio de cultura.
- O tamanho dos cortes não influencia na oxidação do meristema de pimenteira-do-reino.
- A assepsia com fungicida derosal e o antibiótico sulfato de estreptomicina controlam a contaminação *in vitro* de meristemas de pimenteira-do-reino.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, N.G. **Plant Pathology**. 2005. Academic Press. 952 pp.

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* - PYMV) no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25. p. 36, 1999. Edição dos Anais do XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Jaboticabal, 1999.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000

ANAGNOSTAKIS, S.L. Haploid plants from anthers of tobacco - Enhancement with charcoal. **Planta**, Berlin, v.115,p.281-283, 1974.

AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A. 2002. Micropropagation of blackbarry cv. Brazos. **Scientia Agrária**, 3: 113-132 (in Portuguese, with abstract in English).

AYABE, M.; SUMI, S. A novel and efficient tissue culture method – “stem-disc dome culture” – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Report**, Berlin, v. 20, p. 503-507, 2001.

BASTOS, T. X.; PACHÊCO, N. A.; MONTEIRO, D. C. A. **Zoneamento agroclimático para a pimenteira-do-reino no Estado do Pará**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental, Documentos, 321), 2008. 23p.

BARROS, I. de & PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação "in vitro" de explantes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí LCH-2077-2-5-44. **Ciência e Prática**, Lavras, **15**(2):145-153, 1991.

BIRICOLTI, S.; CHIARI, A. Meristem culture and micrografting of *Passiflora edulis* f. *edulis*. **Advances in Horticultural Science**, Viale delle Idee, v.8, n. 3, 171-175, 1994.

BHAT, A.I.; DEVASAHAYAM, S; SARMA, Y.R.; PANT, R.P. Association of a Badnavirus in black pepper (*Piper nigrum* L.) transmitted by mealbug. **Current Science**, v.84, n.12, p.1547-1550, 2003.

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.

BOARI, A.J. ; MACIEL-ZAMBOLIM, E; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Caracterização biológica e molecular de isolados do “*Cucumber mosaic virus*” (CMV) proveniente de oito espécies vegetais. **Fitopatologia brasileira**, v.26,p.49-58, 2000.

BON, M.C.; GENDRAUD, M.; FRANCLLET, A. Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and nature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam v.34, n.3-4, p. 283-291, 1988.

CAI, T.; BUTLER, L. Plant regeneration from embryogenic callus initiated from immature inflorescences of several high-tannin sorghums. **Plant Cell and Organ Culture**, Dordrecht, v.20. p.101-110. 1990.

CID, L. P. B.; ZIRMMERMANN, M. J. A Contaminação *in vitro* de plantas. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília: 2006. 20 p.

CORDEIRO, I.M.C.C.; Lameira, O.A.; Lopes, S.C.; Rios, M.S. 2002. Germinação *in vitro* de parica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 27.

COSTA A. S.; CARNEIRO F DE A, IKEDA H, CARDOSA M. Moléstia da Pimenta do Reino Causada Pelo Vírus do Mosaico do Pepino, **Série: Fitotecnia**. : Instituto de pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Norte. 1969.

DUARTE, M. L. R. **Sistemas de Produção da Pimenta-do-reino**: Importância econômica, 2005. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/index.htm>>. Acesso em: 13 de out. 2013.

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

FRIDBORG, G.e ERIKSSOM. T. Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.34, p.306-308, 1965.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. **Statistical Databases**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat> acesso em 20 setembro 2014.

GARCIA, E.G. de & RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados "in vitro". **Agronomia Tropical**, Maracay, 40(4-6):281-290, 1990.

GIATTI, L.; LIMA, G. P. P. Ação do BAP na regeneração *in vitro* de Blc Owen Holmes Ponkan x Brassavola digbiana nº 2. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2006.

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.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1990. p. 99-167.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI / Embrapa - CNPH, v.1, 1998. p.183-260.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**, part 2 - In Practice, 2nd. ed. Edington: Exegetics Limited, 1996,1361p.
- GUERRA, M.P.; HANDRO, W. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart (Palmae). **Plant Cell Reports**, Baltimore, v.7, p.550-552, 1988.
- HANWEG, K. Virus-free granadilla cultivars. Neltropica Bulletin, Nelspruit, n. 304, p. 7-8, 1999.
- JARRET, R.L.; RODRIGUEZ, W.; FRENANDEZ, R. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.25, p.137-147, 1985
- 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.
- LEIFERT, C ; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A. & WAITES, W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Chisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, **71**(4):307-330, 1991.
- Lopes, C.A. 1988. Contaminacoes bacterianas em cultura de tecidos. *ABCTP Noticias*, 13: 35-40.
- MACIEAL-ZAMBOLIM, E.; CARVALHO, M.G.; MATSUOKA, K. Caracterização parcial do vírus do mosaico do pepino isolado da pimenta-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p.220-225, 1990.
- 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.
- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemans' Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T. S.; NAUER, E. M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, P. B. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free Citrus clones. *Hortscience*, Alexandria, v.7, p. 118-119, 1972.
- MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. In vitro micrografting of cashew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, V. 66, p. 49-58, 2001.
- NAVARRO, L. Application of shoot-tip grafting in vitro to woody espécies. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 227, p. 43-55, 1988.
- OLIVEIRA, H. de. S.; LEMOS, O. F. de.; MIRANDA, V. S.; MOURA, H. C. da. P.; CAMPELO, M. F.; SANTOS, L. R. R. dos. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (musa spp). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3,p.369-376, 2011.
- OLIVEIRA, A.C. S; BOARI, A. J.; SOUSA, C. M.; Pantoja, K.F.C.; SOUZA, C. A. Detecção de *Piper yellow mottle virus* da pimenteira do reino nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Amazonas. In: 50 Congresso brasileiro de olericultura, 2010, Guarapari. **Anais do 50 Congresso Brasileiro de Olericultura**. Brasília : Sociedade brasileira de horticultura, 2010. v. 28. p. 1-7.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA-FAO. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2014
- PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUMTALLY, S.; DOOKUN-SAUMTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, p. 561-566. 2002.
- PASQUAL, M; Hoffmann, A; Ramos J.D. 1997. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos*. Lavras: UFLA /FAEPE. 159 pp.
- PAZ, O. P. da; PASQUAL, M. Microenxertia. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v. 1, p. 147-159.
- PEREIRA, G.A.; RIBEIRO, B.V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M.B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELD, R. The toxicity of antibiotics to plant cell culture. **Plant Cell Reports**, v. 2, 1983, p. 36-39.
- PROVVIDENTI, R. Cucumber mosaic. In: ZITTER, A.; HOPKINS, D.L. & THOMAS, C.E. **Compendium of cucurbit diseases**. APS PRESS: St. Paul. 1996. p.438-39.

QUERALT, M.C.; BERUTO, M.; VANDERSCHAEGHE, A.; DEBERGH, P.C. **Ornamentals**. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H., (Eds.) Micropropagation – Technology and Application. Dordrecht, Kluwer: Academic Publishers, 1991. p.215-229.

SILVA, K.S. *et al.* Utilização de antioxidantes na micropropagação de Bananeira CV. Pioneira. *Magistra*, v.13, n.1, 2001. Disponível em: <http://www.magistra.ufrb.edu.br/publica/magist13/01-13-02c.html>. Acesso em: 12 fev. 2015.

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**, Somerset, v. 51, n. 5, p. 537–545, 2002.

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.

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.

TAKAYAMA, S. e MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n.48, p.121-125, 1980.

TERMIGNONI, Regina Ramos. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2005, 182 p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI, 1998b. v. 1, p. 133-142.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, v. 1, p. 133-145. 1998.

TISSERAT, B. Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.30, n.19, p.1275-1283, 1979.

WILSON, Z.A. & POWER, J.B. Elimination of systemic contamination in explant and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Cell Reports*, Berlin, 7:622-625, 1989.

ZIV, M.; HALEVY, A.H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, Alexandria, v.18, n.4, p.434-436, 1983.

3 USO DE 6-BENZILAMINOPURINA NA MICROPROPAGAÇÃO DE TRÊS GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO (PIPER NIGRUM L.)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a micropropagação de três genótipos de *Piper nigrum* L. avaliando diferentes combinações de 6-Benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido indolacético (AIA) a fim de aprimorar a multiplicação de brotos *in vitro*; o efeito do ANA na etapa de enraizamento *in vitro*; e a sobrevivência dos brotos enraizados na aclimatização e formação de mudas. Nas etapas de multiplicação e enraizamento as condições de cultivo foram controladas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹, com intensidade luminosa de 3.000 lux à temperatura de 25± 3 °C, o meio de multiplicação utilizado foi o meio básico de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, vitaminas MS, 2 g.L⁻¹ do solidificante phytigel e suplementado com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) com 0,2 mg.L⁻¹ AIA. A avaliação foi quanto ao número de gemas e brotos por explante e comprimento de brotos, cujos dados foram analisados estatisticamente. Para o enraizamento foi utilizado o meio ½ MS contendo 30 g.L⁻¹ de sacarose, vitaminas MS, 2 g.L⁻¹ do solidificante phytigel e 0,05 mg.L⁻¹ do ácido naftaleno acético (ANA). A aclimatização foi realizada em casa de vegetação em bandejas plásticas contendo diferentes combinações de substratos, por 28 dias, posteriormente foram transferidas para sacos plásticos contendo terra preta + matéria orgânica para o desenvolvimento de mudas por 56 dias. Nas etapas de aclimatização e formação de mudas foram avaliadas a taxa de sobrevivência. Os resultados mostram que para a multiplicação as variáveis gemas e brotos/explante o meio M1 (0,5 mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA) se destacou obtendo a melhor resposta para a proliferações de gemas e brotos. Os genótipos apresentaram diferenças nas respostas das três variáveis nos cinco subcultivos. Na fase de aclimatização no substrato vermiculita + areia (1:1) ocorreram as maiores taxas de sobrevivência nos três genótipos. A formação de mudas no substrato terra preta, as plantas apresentaram acima de 70% de sobrevivência.

PALAVRAS CHAVE: BAP; Enraizamento; cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

This work aimed the micropropagation of three *Piper nigrum* L. genotypes, evaluating the different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) associated with indoleacetic acid (IAA) in order to enhance the *in vitro* shoot multiplication; the effect of NAA in the *in vitro* rooting step; and the survival of rooted shoots in the acclimatization and seedling formation. In the multiplication and rooting steps, the controlled culture conditions were of 16h photoperiod with 3000 lux light intensity and at 25 ± 3 °C temperature and the multiplication medium was the MS medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) containing 30 g.L⁻¹ sucrose, MS vitamins, 2 g.L⁻¹ Phytigel and combinations of BAP (0,5; 0,6 and 0,8 mg.L⁻¹) with IAA (0,2 mg. L⁻¹). The evaluation regarded the number of buds and shoots per explant and the shoot length, whose data were statistically analyzed. . For the rooting, it was employed the ½ MS medium containing 30 g.L⁻¹ sucrose, MS vitamins, 2 g.L⁻¹ Phytigel and 0.05 mg.L⁻¹ naphthalene acetic acid (NAA). The acclimatization was conducted in a nursery in plastic trays containing different combinations of substrates, for 28 days. Plants were then transferred to plastic bags containing soil + organic matter for the seedlings development for 56 days. In the acclimatization and seedling formation, the survival rate was evaluated. Results show that, for the multiplication, the M1 medium (0.5 mg.L⁻¹ BAP+0.2 mg.L⁻¹ IAA) stood out for the variables buds and shoots per explant, since it yielded the highest responses. The genotypes presented differences in the response of the three variables in the five subculturings. In the acclimatization, the highest rates of survival for all genotypes occurred in the vermiculite + sand (1:1) substrate. For the seedling formation in the soil substrate, the plants presented a survival rate higher than 70%.

KEYWORDS: BAP; rooting; *in vitro* culture.

3.1 Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta originária da Índia, pertence à família Piperaceae e ao gênero *Piper*, também conhecida como pimenta-da-Índia, possui grande importância econômica e social no cenário brasileiro, pois é geradora de renda para pequenos produtores (HOMMA, 2004). Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor mundial e o estado do Pará é o maior produtor nacional (IBGE, 2014).

Como alternativa para obtenção de mudas com qualidade fitossanitária visando a expansão comercial da pimenteira-do-reino tem se buscado o cultivo *in vitro*, que é uma técnica solidificada e muito utilizada na propagação de plantas. O sucesso dessa técnica depende de vários fatores como a espécie, meio de cultura, tempo de cultivo, dentre outros. Por este motivo, pesquisas são elaboradas objetivando a formulação e o estabelecimento de protocolos que garantam resultados satisfatórios em todas as etapas da micropropagação das plantas, a fim de manter bancos de germoplasma *ex situ*, e sejam utilizadas em programas de melhoramento genético.

A micropropagação é considerada de grande importância na cultura de tecidos, pois permitem a produção de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas (SARTOR et al., 2012) e constitui uma alternativa na limitação da expansão da cultura da pimenteira-do-reino através da propagação de mudas em tempo e espaço físico reduzidos, com alta fidelidade genética e com qualidade fitossanitária (GEORGE 2008).

A maioria das espécies apresenta potencialidade para a regeneração *in vitro*, desde que as exigências nutricionais, hormonais e ambientais sejam satisfatórias (PIZA; PINHO, 2002). O sucesso do cultivo *in vitro* de espécies vegetais depende da eficácia nas etapas do processo de micropropagação, e o enraizamento, aclimatização e formação de mudas, são etapas importantes para otimizar a propagação clonal de plantas.

A escolha do meio de cultura adequado ao cultivo de determinada espécie é fundamental para suprir tecidos e órgãos com macronutrientes, micronutrientes, hormônios vegetais e produtos orgânicos necessários ao seu desenvolvimento *in vitro* (MURASHIGE e SKOOG, 1962; KNUDSON, 1946; VACIN WENT, 1949; CAMPOS 2002). Associações de reguladores como citocininas, auxinas e giberelinas também são aplicadas ao meio com o objetivo de suprir as possíveis deficiências de teores endógenos de hormônios responsáveis em estimular o alongamento, diferenciação e a multiplicação dos explantes (TORRES et al., 1998).

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas e citocininas são os mais utilizados na cultura de tecidos, sendo utilizadas tanto individualmente quanto em associação (OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2011), e a concentração é o que mais influencia no sucesso da diferenciação e multiplicação *in vitro* de brotos e as melhores concentrações variam de 0,5 e 5,0 mg. L⁻¹ para ambos fitorreguladores (MORALES et al., 1999). Para este fim, geralmente são testados tipos e concentrações de citocininas, que estão associados à quebra de dominância apical em gemas axilares e ápices caulinares, promovendo a indução de brotações (BHOJWANI e RAZDAN, 1996).

As citocininas participam da divisão celular e do desenvolvimento das gemas laterais, porém em conjunto com auxinas, além de inibir a formação de raízes, retardam a queda das folhas. A 6-Benzilaminopurina (BAP) têm sido a citocinina mais utilizado no cultivo *in vitro* e muito eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies (SANTOS et al., 2006)

As auxinas por sua vez são substâncias essenciais no cultivo de plantas, pois promovem modificações na parede celular vegetal durante o processo de divisão celular, permitindo a extensibilidade da célula, além de serem responsáveis pela dominância apical (ROCHA et al., 2009; TAIZ e ZEIGER, 2012) e de ter a maior efetividade na promoção do enraizamento, cujo principal efeito está ligado à ação sobre a indução e iniciação dos primórdios radiculares (LIMA et al., 2008).

As auxinas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, no meio de enraizamento, tais como o ácido indolacético (AIA), ácido indolilbutírico (AIB) e ácido α -naftalenoacético (ANA) que são as auxinas mais empregadas, em concentrações que variam conforme a espécie e/ou cultivar.

O processo de enraizamento *in vitro* incluem fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos (fatores internos) que interagem com os fatores externos. A diferenciação de raízes adventícias é indispensável para a aclimatização, pois o insucesso do enraizamento torna a taxa de sobrevivência de plantas aclimatizadas baixa e/ou nulas (SANTOS 2012) prejudicando assim a etapa de formação de mudas.

Neste sentido, objetivou-se com o presente trabalho avaliar: diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) associada ao ácido indolacético (AIA) a fim de aprimorar a fase de multiplicação de brotos no processo de micropropagação *in vitro*; e analisar o efeito do ANA na etapa de enraizamento *in vitro*, sobrevivência na aclimatização e na etapa de formação de mudas de três genótipos de *Piper nigrum* L.

3.2 Material e Métodos

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Biotecnologia e Recursos Genéticos e de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

Utilizou-se como fonte de explantes (ápice e gemas laterais) do material vegetal de plantas já estabelecidos *in vitro* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma – BAG da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Os genótipos utilizados foram: Alencar, Guajarina e Kuthiravally. Sendo Alencar e Guajarina oriundas de sementes e kuthiravally provenientes de tecidos meristemáticos.



Figura 17. Sequência das etapas desenvolvidas no processo de multiplicação de genótipos de pimenteira-do-reino.

3.2.1 Estabilidade fisiológica dos explantes

Em câmara de fluxo laminar com o auxílio de bisturi cirúrgico foram obtidos explantes (ápice e gemas laterais) de brotos das cultivares *in vitro* para o estabelecimento em cultura e formação de novos brotos nas mesmas condições de cultivo e estágio de desenvolvimento vegetativo. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) que continha sacarose a 3%, vitaminas MS e suplementados com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ do regulador de crescimento benzilaminopurina (BAP). O pH ajustado para 5,8 e foi utilizado phytigel a 0,2%, distribuídos 40 mL em frasco de vidro com capacidade para 300ml e vedados com filme de PVC resinite e autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. O período de estabelecimento foi de seis semanas mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de $16 \text{ h luz dia}^{-1}$, com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.2 Indexação do material vegetal

A indexação foi realizada para os três genótipos, com o intuito de verificar a presença dos vírus *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e *Piper Yellow Mottle Virus* (PYMoV) e a influencia no desenvolvimento e multiplicação dos brotos. A extração de ácido nucléico foi realizada a partir das folhas de pimenteira-do-reino *in vitro*, segundo o protocolo de Gibbs e Mackenzie (1997) modificado por meio da adição de 0,1% de β - mercaptoetanol, para posteriormente verificar a presença dos vírus PYMoV e CMV através da PCR e RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), respectivamente. Para obter um resultado seguro foram usados controles de plantas de pimenteira-do-reino. Para controle positivo folhas infectadas com vírus e como controle negativo folhas de pimenteira-do-reino sadias.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em um termociclador com programas específicos para os vírus CMV e PYMoV. Sendo utilizados como material o DNA para o vírus PYMoV e o cDNA para o CMV. Utilizou-se $3 \text{ }\mu\text{L}$ do DNA e ou cDNA, $5 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão 5X, $3 \text{ }\mu\text{L}$ de MgCl_2 (25mM), $0,25 \text{ }\mu\text{L}$ de primers (10mM), $0,15 \text{ }\mu\text{L}$ de Taq Polimerase, $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ de dNTP (10mM), $12,85 \text{ }\mu\text{L}$ de água ultra-pura, e os primers específicos para os vírus, sendo o HP1 (F) e HP2 (R) para PYMoV e o CPR e CPF para CMV. A reação consistiu de 30 ciclos em que ocorreu a desnaturação, amplificação e anelamento.

Posteriormente, o resultado foi analisado através do gel de agarose a 0,8% em uma cuba de eletroforese contendo tampão TBE 0,5 mM por 40 minutos por 120w, o resultado do gel foi observado em fotodocumentador.

3.2.3 Multiplicação dos explantes de *Piper nigrum* L.

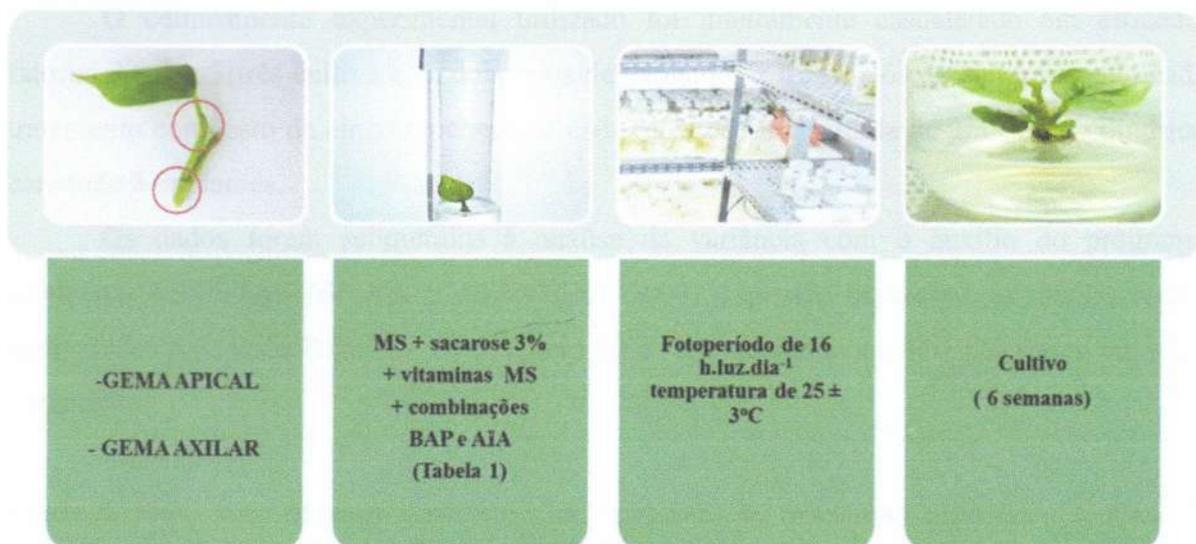


Figura 18. Processo de multiplicação realizado para os três genótipos de pimenteira-do-reino.

Após a fase de estabelecimento, realizou-se a fase de multiplicação de brotos em cinco subcultivos, sendo o primeiro realizado em tubo de ensaio e os demais em frascos cilíndricos. Os brotos foram segmentados em ápices caulinares e gemas axilares e inoculados em tubos de ensaio com capacidade de 50 mL, contendo 20 mL do meio básico de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), constituído de 3% de sacarose, vitaminas MS e suplementados com três diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP a 0,5; 0,6; e 0,8 mg.L⁻¹) combinado com o ácido indolacético (AIA) a 0,2 mg.L⁻¹ (Tabela 6). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e para solidificar foi utilizado 0,2% de phytigel antes da autoclavagem por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C.

No primeiro subcultivo em cada tubo foi introduzido um explante, gema apical ou gema lateral, vedados com tampa de plástico e filme de PVC resinite e foram mantidos durante seis semanas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹, intensidade luminosa de 3.000 lux proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w e temperatura de 25 ± 3°C. Após o período de seis semanas foram realizados os subcultivos subsequentes em

frasco cilíndrico com capacidade de 300 mL contendo 40 mL do mesmo meio de cultura sob as mesmas condições de cultivo e período.

As análises foram realizadas por subcultivo considerando: número de gemas, número de brotos e comprimento do caule. O comprimento do caule foi medido na região compreendida entre o coleto e a gema apical. Essas mensurações foram realizadas com o auxílio de uma régua milimetrada.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2 x 3 (três cultivares x dois tipos de explantes x três meios de cultura) sendo cada tratamento composto de cinco repetições e cada repetição constituída de um frasco cilíndrico contendo 5 explantes.

Os dados foram submetidos à análise da variância com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA E AZEVEDO, 2009) e quando necessário às médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$) e pelo teste , considerando a média por frasco em cada tratamento.

Tabela 5. Meios com diferentes combinações de reguladores de crescimento empregados na etapa de multiplicação de brotos *in vitro* de genótipos de pimenteira-do-reino.

Meios	BAP (mg.L ⁻¹)	AIA (mg.L ⁻¹)
Meio 1	0,5	0,2
Meio 2	0,6	
Meio 3	0,8	

2.3.4 Enraizamento *in vitro*

O enraizamento de brotos *in vitro* ocorreu após o quinto subcultivo de multiplicação *in vitro*. As gemas dos brotos foram transferidas para frascos de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura de enraizamento constituído de 1/2 da concentração dos sais do meio básico de MS suplementado com sacarose 3%, vitaminas MS, phytigel a 0,2% e o ácido naftaleno acético (ANA) a 0,05 mg L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,8 e posteriormente o meio foi submetido a autoclavagem por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C.

As condições de cultivo foram de fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹, com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25± 3 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo 3 tratamentos cada tratamento composto de cinco repetições e cada repetição constituída de um frasco cilíndrico contendo 5 explantes.

Após quatro semanas, as avaliações realizadas foram quanto à porcentagem de brotos enraizados, número de raízes/broto, o comprimento médio das raízes/broto, e o comprimento dos brotos.

Os dados foram submetidos à análise da variância com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA E AZEVEDO, 2009) e quando necessário as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p<0,05$) e pelo teste não paramétrico qui-quadrado, considerando a média por frasco em cada tratamento.

3.2.5 Aclimatização

Após o período de enraizamento, os brotos enraizados *in vitro* foram retirados dos frascos e lavados em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultura aderido às raízes. As plantas foram transferidas para bandejas plásticas de polipropileno com 24 células, com duas plantas por célula, utilizando substratos e combinações de diferentes substratos (Tabela 7).

Inicialmente, as bandejas contendo as plantas permaneceram por uma semana em local protegida da chuva e com baixa luminosidade antes da transferência para casa de vegetação, na qual foram cultivadas por quatro semanas. Durante este período foram feitas irrigações com o auxílio de um regador para manter a umidade do substrato diariamente, e quinzenalmente as plantas foram nutridas com 10 mL/célula com solução nutritiva composta de metade da concentração dos sais do meio básico MS. A avaliação foi quanto ao percentual de sobrevivência das plantas em relação aos substratos testados para os diferentes genótipos de pimenteira-do-reino, semanalmente durante quatro semanas.

Tabela 6. Combinações de diferentes substratos para a aclimatização de brotos de pimenta-do-reino.

COMBINAÇÕES DE SUBSTRATO	
SUBSTRATO	PROPORÇÃO
Vermiculita	1
Areia	1
Vermiculita + Areia	1:1
Vermiculita + Areia	1:2
Vermiculita + Areia	1:3
Vermiculita + Areia	2:3

3.2.6 Formação de mudas

A etapa de formação de mudas iniciou após os 28 dias da aclimatização, em que as plantas aclimatizadas em bandejas em casa de vegetação foram transferidas para sacos plásticos de polietileno preto (16x12cm) contendo terra preta + matéria orgânica na proporção de (3:1) respectivamente e mantidas em casa de vegetação.

A avaliação foi realizada mensalmente por um período de três meses quanto à porcentagem de sobrevivência de mudas dos diferentes genótipos de pimenteira-do-reino.

4 Resultados

4.1 Indexação do material vegetal

Por meio da indexação das plantas cultivadas *in vitro*, os três genótipos de pimenteira-do-reino Alencar, Guajarina e Kuthiravally apresentaram-se negativas por PCR para os vírus *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) e *Piper Yellow Mottle Virus* (PYMoV).

No teste de PCR e RT-PCR de plantas provenientes do Banco Ativo de Germoplasma – BAG já estabelecidos *in vitro* observou-se que das 72 amostras avaliadas todas foram negativas para os vírus (PYMoV e CMV).

O par de primer para o PYMoV permitiu a amplificação de somente uma banda de 450pb que foi a do controle positivo (Figura 19). Das 10 amostras apresentadas para PYMoV não foi detectado a presença do vírus, ou seja, as plantas não encontravam-se infectadas para este vírus.



Figura 19. Teste de PCR para Piper yellow mottle virus para amostras de pimenteira-do-reino. 1 M. marcador Kb ladder, 2 controle positivo PYMoV; 3 controle negativo de *Piper nigrum* L. e de 4 a 13 amostras provenientes do BAG.

O par de primer para CMV amplificou a banda do controle cerca de 500pb, representada pela amostra 2. Entretanto, para as amostras de pimenteira-do-reino observou-se a ausência de bandas específicas para o vírus. Das 9 amostras, todas foram negativas para o CMV (Figura 20).

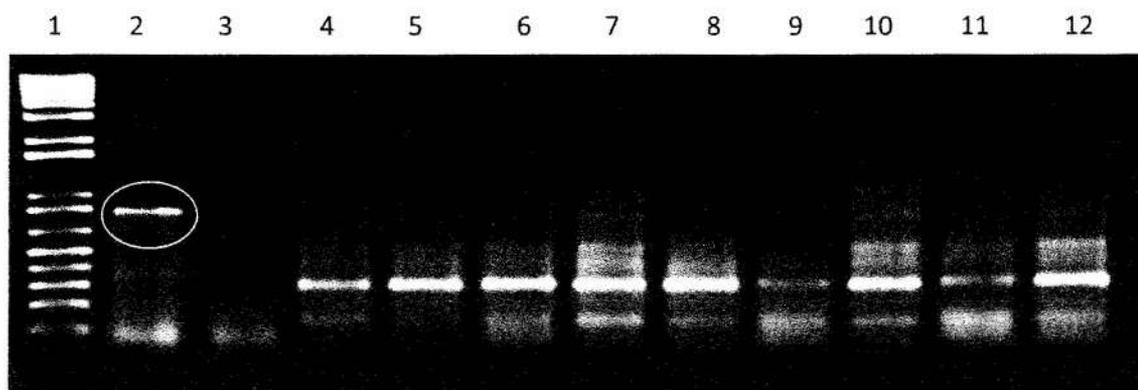


Figura 20. Teste de RT-PCR para Cucurbit Mosaic Virus para amostras de Pimenteira-do-reino. 1 M. Marcador Kb ladder, 2 Controle positivo e 3 Controle negativo de fumo e de 4 a 12 amostras provenientes do BAG

4.2 Multiplicação dos explantes de *Piper nigrum* L.

No primeiro subcultivo houve diferença significativa entre os genótipos (F1) quanto ao número de gemas, número brotos e comprimento de broto. O tipo de explante (F2) teve efeito significativo para diferenciação de novas gemas, havendo interação do tipo de explante com o genótipo na proliferação de gemas (Tabela 8).

Tabela 7. Análise da variância do primeiro subcultivo quanto a proliferação de gemas e brotos e comprimento de broto em dois tipos de explantes em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Genótipos (F1)	2	12.87778	15.74444	8.64933	34.5970 **	76.5946 **	152.6353 **
Explantes (F2)	1	24.54444	0.04444	0.00044	65.9403 **	0.2162 ns	0.0078 ns
Meios(F3)	2	0.01111	0.14444	0.08033	0.0299 ns	0.7027 ns	1.4176 ns
Int. F1xF2	2	3.01111	0.01111	0.02178	8.0896 **	0.0541 ns	0.3843 ns
Int. F1xF3	4	0.57778	0.07778	0.07467	1.5522 ns	0.3784 ns	1.3176 ns
Int. √F2xF3	2	0.47778	0.21111	0.00211	1.2836 ns	1.0270 ns	0.0373 ns
Int.F1x2Fx3F	4	0.64444	0.37778	0.08244	1.7313 ns	1.8378 ns	1.4549 ns
Tratamento	17	3.65817		1.06682			
Resíduo	72	0.37222		0.05667			

I - Gema; MG =2.98889; CV% = 20.41

II Broto; MG = 1.81250; CV% = 29.58

III - Comprimento do broto; MG =1.97333; CV% = 12.06

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

O genótipo Kuthiravally apresentou maior média de gemas por explante 3,400 e não diferiu da cultivar Guajarina com 3,333. Entre os diferentes tipos de explante o ápice mostrou-se superior com média de 3,5111. No entanto, a concentração de BAP não influenciou a multiplicação de brotos (Tabela 9).

Tabela 8. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação de gemas em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.

Genótipo	Tipo de Explante		Meio de Cultutra			Média ¹
	Apice	Gema	Meio 1 ²	Meio 2 ³	Meio 3 ⁴	
Guajarina	3,8666aA	2,8000aB	3,3000aA	3,5000aA	3,2000aA	3,3333 ^a
Alencar	3,0666bA	1,4000bB	2,2000bA	2,0000bA	2,5000bA	2,2333b
Kuthiravally	3,6000aA	3,2000aA	3,5000aA	3,5000aA	3,2000aA	3,4000 ^a
Média	3,5111 ^a	2,4666B	3,0000A	3,0000A	2,9667 ^a	

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

² Meio 1: Combinação de 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

³ Meio 2 : Combinação de 0,6mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

⁴ Meio 3 : Combinação de 0,8mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

Quanto a indução de brotações/explante no primeiro subcultivo, os genótipos de Guajarina (2,4333) e kuthiravally (2,166) foram significativamente superiores, contudo o tipo de explante e meios de cultura não influenciaram para esta variável (Tabela 10).

Tabela 9. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação in vitro de broto em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.

Genótipo	Tipo de Explante		Meios de Cultutra			Média ¹
	Apice	Gema	Meio 1 ²	Meio 2 ³	Meio 3 ⁴	
Guajarina	2,4666aA	2,4000aA	2,6000aA	2,4000aA	2,3000aA	2,4333 ^a
Alencar	1,0666bA	1,0666bA	1,1000bA	1,0000bA	1,1000bA	1,0666b
Kuthiravally	2,2000aA	2,1333aA	2,2000aA	2,1000aA	2,2000aA	2,1666 ^a
Média	1,9111 ^a	1,8666A	1,9666 ^a	1,8333A	1,8666 ^a	

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

² Meio 1: Combinação de 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

³ Meio 2 : Combinação de 0,6mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

⁴ Meio 3 : Combinação de 0,8mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

No primeiro subcultivo foi observado diferença no comprimento dos brotos entre as cultivares, sendo o maior comprimento do broto pertencente ao genótipo de Guajarina (2,2866 cm) que foi semelhante ao da Kuthiravally (2,2800 cm). Os diferentes tipos de explantes e diferentes meios de cultura testados não influenciaram no crescimento dos brotos (Tabela 11).

Tabela 10. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto ao comprimento de broto em dois tipos de explantes em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP+ AIA.

Genótipo	Tipo de Explante		Meio de Cultura			Média ¹
	Apice	Gema	Meio 1 ²	Meio 2 ³	Meio 3 ⁴	
Guajarina	2,2800aA	2,2933aA	2,3500aA	2,2600aA	2,2500aA	2,2866 ^a
Alencar	1,3800bA	1,3266bA	1,3200aA	1,2900bA	1,1400bA	1,3533 ^b
Kuthiravally	2,2533aA	2,3666aA	2,4100aA	2,2200aA	2,2100aA	2,2800 ^a
Média	1,9711 ^a	1,9755 ^A	2,0266 ^a	1,9233 ^A	1,9700 ^a	

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

² Meio 1: Combinação de 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

³ Meio 2 : Combinação de 0,6mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

⁴ Meio 3 : Combinação de 0,8mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

Para a análise de variância do segundo ao quinto subcultivo a variável gema por explante apresentou diferença significativa entre o fator genótipo (F1) em todos os subcultivos. Havendo ocorrência do efeito para o fator meio de cultura (F2) no segundo subcultivo e para a interação F1 x F2 não (Tabela 12).

Tabela 11. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto a proliferação de gemas em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L⁻¹ de AIA.

FV	G.L	F			
		II	III	IV	V
Genótipo(F1)	2	18.8247 **	21.5507 **	14.2990 **	12.4715 **
Meio (F2)	2	3.4368 *	0.2104 ns	0.4239 ns	0.1673 ns
Int. F1xF2	4	0.8534 ns	1.5419 ns	0.3476 ns	0.2819 ns
Tratamento	8				
Resíduo	36				

II - subcultivo; MG = 3.56044; CV% = 24.42

III - subcultivo; MG = 3.44889 ; CV% = 25.81

IV- subcultivo; ; MG = 3.52800; CV% = CV% = 23.88

V -subcultivo; MG =3.53933; CV% = 24.81

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 = < p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

A diferenciação de número de brotos por explante apresentaram efeitos do fator genótipo (F1) em todos os subcultivo. Para a interação (F1 x F2) houve diferenças apenas no segundo e terceiro subcultivo (Tabela 13).

Tabela 12. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto a proliferação de brotos e em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.

FV	G.L	F			
		II	III	IV	V
Genótipo(F1)	2	4.4976 *	6.7321 **	16.0785 **	13.6382 **
Meio (F2)	2	2.0135 ns	0.9127 ns	2.8907 ns	0.6043 ns
Int. F1xF2	4	2.7332 *	4.7103 **	0.9949 ns	0.3313 ns
Tratamento	8				
Resíduo	36				

II - subcultivo; MG =1.93511; CV% = 27.67

III - subcultivo; MG = 1,81933; CV% = 23,87

IV- subcultivo; ; MG = 2,17089; CV% = 29.58

V -subcultivo; MG =2.27422; CV% = 30.32

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

Para o comprimento do broto o fator genótipo apresentou diferença significativa nos subcultivos II, III, IV e V, e no fator meio de cultura houve essa influencia ocorreu no III e IV subcultivo, quanto à interação entre genótipos x meio de cultura (F1x F2), apenas o quarto subcultivo teve influencia para a variável comprimento de broto (Tabela14).

Tabela 13. Análise da variância do segundo ao quinto subcultivo quanto ao comprimento de broto em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de BAP adicionados com 0,2mg.L-1 de AIA.

FV	G.L	F			
		II	III	IV	V
Genótipo(F1)	2	25.4055 **	63.4154 **	4.1646 *	61.5189 **
Meio (F2)	2	0.4401 ns	5.0396 *	4.0176 *	0.9134 ns
Int. F1xF2	4	2.5448 ns	2.5017 ns	4.5740 **	0.3655 ns
Tratamento	8				
Resíduo	36				

II - subcultivo; MG = 1.91267; CV% = 16.41

III - subcultivo; MG = 1.99667; CV% = 13.18

IV- subcultivo; ; MG = 1.77956; CV% = 14.03

V -subcultivo; MG 2.41578; CV% = 18.07

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

O meio M1 (0,5 mg. L⁻¹ + 0,2 mg. L⁻¹ AIA) apresentou as melhores médias para a proliferação de novas gemas do segundo ao quinto subcultivo com as seguintes médias (4,0; 4,41; 4,47 e 4,44), no entanto não diferiu do meio M2 (0,6 mg. L⁻¹ e 0,2 mg. L⁻¹ AIA) no segundo e terceiro subcultivo (4,24 e 3,63).

Dentre os genótipos houve diferença no segundo e terceiro subcultivo, sendo que no segundo subcultivo o genótipo Guajarina apresentou a maior média de número de gemas por

explantes não diferindo do genótipo kuthiravaly, já no terceiro subcultivo os genótipos Alencar e Kuthiravally não diferiram significativamente com as respectivas médias (3,34 e 3,63) promovendo maiores números de gemas por explante (Tabela 15).

A variável número de brotos apresentou melhores resposta no meio M1 (0,5 mg. L⁻¹ BAP e 0,2 mg. L⁻¹ AIA) onde o qual se destacou do segundo ao quinto subcultivos (1,83; 2,27; 2,75; 3,0) , sendo que não diferiu do meio M2 (0,6 mg. L⁻¹ e 0,2 mg. L⁻¹ AIA) no segundo e terceiro subcultivo (2,27 e 2,02), para esta variável não houve efeito entre os diferentes genótipos (Tabela 15).

O comprimento médio do broto mostra que o meio M2 (0,6 mg. L⁻¹ BAP e 0,2 mg. L⁻¹ AIA) destacou-se com os maiores comprimentos (mm) mantendo- se assim do segundo ao quinto subcultivo com as respectivas médias (2,38; 2,57; 1,92 e 3,43) sendo semelhante ao M3(0,8 mg. L⁻¹ BAP e 0,2 mg. L⁻¹ AIA) no quarto subcultivo (1,75) (Tabela 15).

Os genótipos apresentaram diferença apenas no terceiro e quarto subcultivo para a variável comprimento do broto (mm), onde no terceiro subcultivo o genótipo Kuthiravally apresentou melhor reposta e não diferiu do genótipo Alencar (2,16 e 1,96), no quarto subcultivo os maiores comprimentos de brotos com médias (1,88 e 1,82) por explante foram obtidos pelos genótipos Alencar e Guajarina que não diferiram entre si (Tabela 15) .

Tabela 14. Teste de comparação de média do segundo ao quinto subcultivo quanto ao número de gemas, número de broto e comprimento de broto.

Trat.	2º subcultivo				3º subcultivo				4º subcultivo				5º subcultivo				
	C1	C2	C3	M	C1	C2	C3	M	C1	C2	C3	M	C1	C2	C3	M	
nº Gemas	M1	3.40	3.80	4.80	4.00a	4.80	4.47	3.97	4.41a	4.32	4.45	4.65	4.47a	4.60	4.44	4.28	4.44a
	M2	3.68	4.51	4.52	4.24a	3.00	3.77	4.13	3.63a	2.84	3.36	2.76	2.99b	2.88	2.64	3.20	2.90b
	M3	2.27	2.57	2.50	2.44b	2.24	2.45	2.22	2.30b	2.96	3.14	3.27	3.12b	3.20	3.23	3.38	3.27b
	M	3.12b	3.63ab	3.94a		3.34a	3.63a	2.30b		3.37a	3.65a	3.56a		3.56a	3.43a	3.67a	
nº Brotos	M1	1.72aA	1.97abA	1,77aA	1.83ab	1.84abB	2.72aA	2.24aAB	2.27a	2.96	3.00	2.30	2.75a	3.07	2.77	3.17	3.00a
	M2	1.60aB	2.80aA	2.40aAB	2.27a	2.50aA	1.62bB	1.93aAB	2.02ab	2.41	1.87	1.91	2.06b	2.32	2.12	1.88	2.10b
	M3	1.83aA	1.50bA	1.80aA	1.71b	1.36bA	1.98aA	1.49aA	1.61b	1.85	1.60	1.65	1.69b	1.86	1.53	1.76	1.71b
	M	1.71a	2.09a	1,99a		1.90a	2.10a	1.89a		2.40a	2.15a	1.95a		2.42a	2.14a	2.27a	
Comp. Brotos	M1	1.80	1.54	1.48	1.61b	1.67	1.59	1.21	1.49c	1.78bA	1.68aA	1.53bA	1.66b	1.90	1.76	1.85	1.84b
	M2	2.30	2.50	2.33	2.38a	2.52	2.76	2.42	2.57a	2.23aA	1.59aB	1.94aAB	1.92a	3.58	3.28	3.44	3.43a
	M3	1.72	1.51	2.03	1.75b	1.69	2.14	1.95	1.93b	1.63bA	1.63aA	2.00aA	1.75ab	1.91	1.84	2.19	1.98b
	M	1.94a	1.85a	1.95a		1.96ab	2.16a	1.86b		1.88a	1.63b	1.82ab		2.46a	2.29a	2.49a	

C1: Genótipo Alencar

C2: Genótipo Kuthiravally

C3: Genótipo Guajarina

M1: Combinação de 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIAM2: Combinação de 0,6mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIAM3: Combinação de 0,8mg.L⁻¹ BAP+ 0,2 mg.L⁻¹ AIA

M : Média

A regressão da variável gema/explante em relação aos cinco subcultivos considerando o tipo de explante gema (Figura 21) mostra que para todos os genótipos ocorreu um aumento da proliferação de gemas até o terceiro subcultivo e a partir de então um leve decréscimo até o quinto subcultivo.

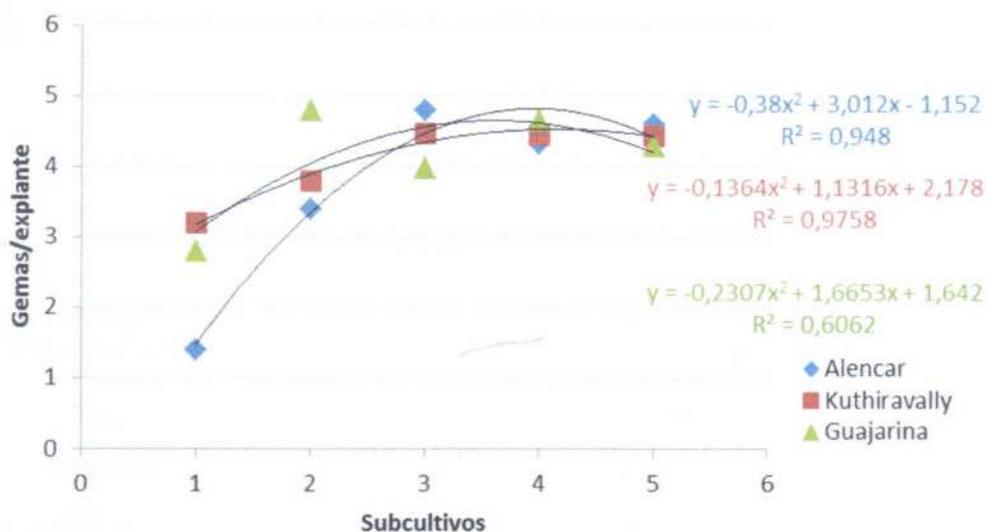


Figura 21. Gemas por explante de diferentes cultivares de pimenta-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L⁻¹) com AIA (0,2mg.L⁻¹).

O genótipo Guajarina apresentou um declínio na média do número de brotos por explante até o segundo subcultivo e em seguida uma tendência crescente a partir do terceiro até o quinto subcultivo. Já o genótipo Alencar há uma tendência crescente do número de brotos por explante à medida que se aumenta os subcultivos, porém para a Kuthiravally isso ocorre até o quarto subcultivo e em seguida uma queda acentuada até o quinto subcultivo (figura 22).

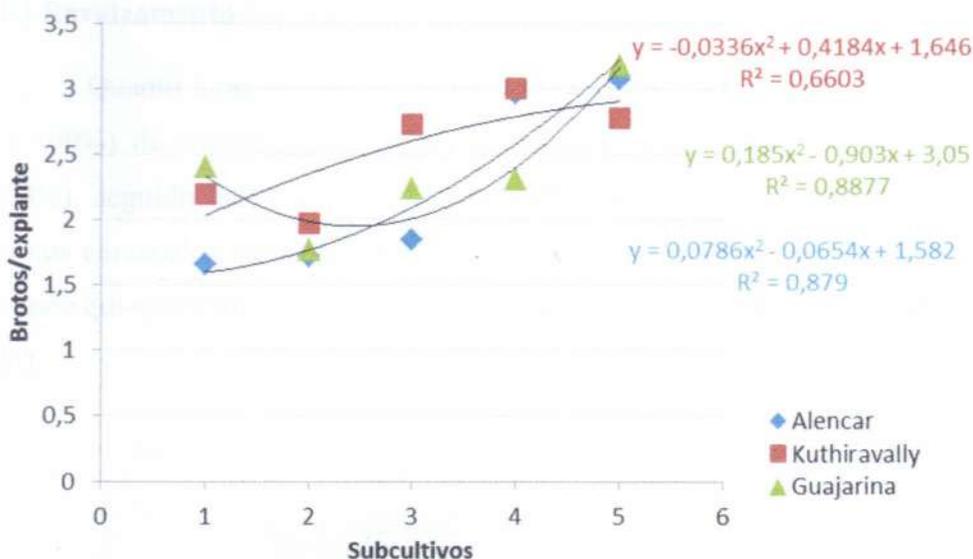


Figura 22. Número de brotos por explante de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L-1) combinados com AIA (0,2mg.L-1).

Para variável comprimento do broto (cm) pode se observar que os genótipos Guajarina e Kuthiravally apresentaram um decréscimo do primeiro ao terceiro subcultivo após ocorre um aumento do comprimento de brotos. O genótipo Alencar apresenta uma tendência crescente do comprimento do broto por explante à medida que se aumenta o número de subcultivos. (Figura 23).

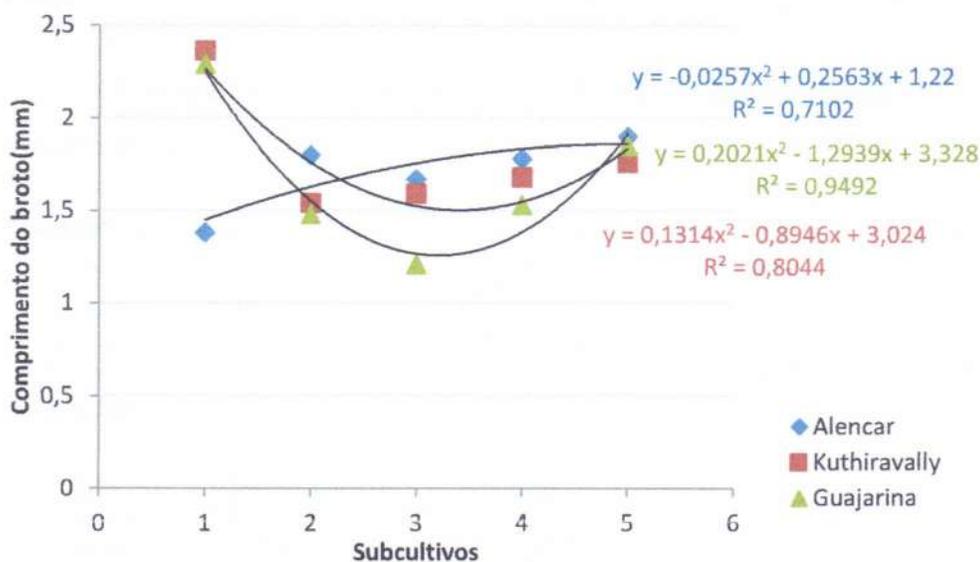


Figura 23. Comprimento do brotos por explante de diferentes cultivares de pimenteira-do-reino em cinco subcultivos com em meio de cultura com combinações de BAP (0,5; 0,6 e 0,8mg.L-1) combinados com AIA (0,2mg.L-1).

4.3 Enraizamento *in vitro*.

Quanto à porcentagem de brotos enraizados todos os genótipos proporcionaram mais de (90%) de enraizamento, observado em Alencar a maior porcentagem de enraizamento (98%), seguido das cultivares Kuthiravally e Guajarina que apresentaram ambas 94% de brotos enraizados, no entanto não houve diferença estatística entre os três genótipos segundo o teste qui-quadrado (X^2), onde o valor X^2 calculado = 1,1988 < X^2 tabelado = 5,9910 (Figura 24).

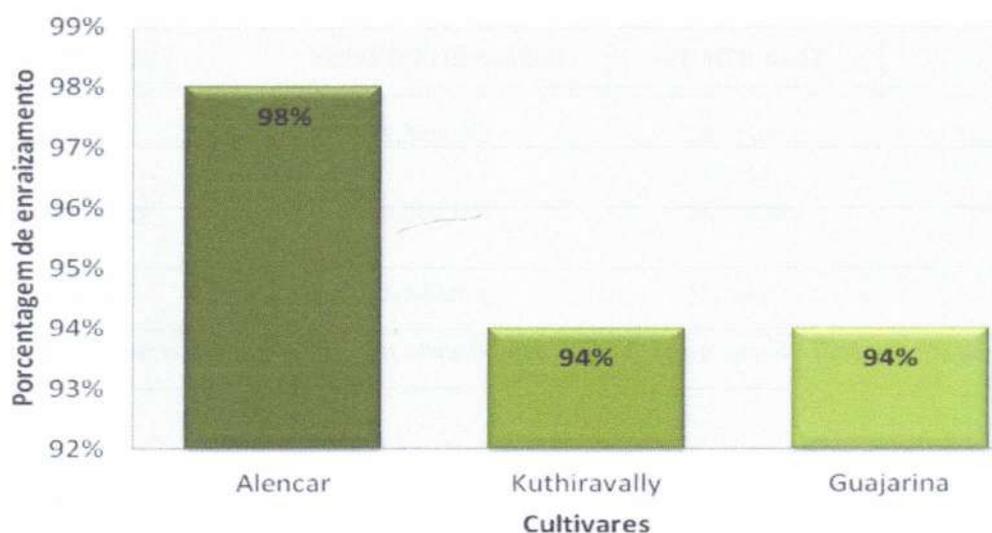


Figura 24. Taxa de brotos enraizados de três genótipos de pimenteira-do-reino após 28 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de ANA.

O enraizamento *in vitro* evidenciam diferenças entre os genótipos e indução de gemas e brotos por explante e comprimento médio do broto (cm) (Tabela 16).

Tabela 15. Análise de variância do enraizamento *in vitro* dos Três genótipos de pimenteira-do-reino.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Genótipos	2	12.896	663.017	111.546	9.445 **	26.132 **	23.180 **
Residuo	27	1.365	25.371	4.812			
Total	29						

I – número de raiz; MG = 4.30267; CV% = 27.16

II comprimento de raiz; MG = 19.82167; CV% = 25.41

III - comprimento da planta; MG = 14.40267; CV% = 15.23

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 > p > 0.05$) ns não significativo ($p > 0.05$)

Na comparação de médias para número de raízes, o genótipo Alencar se mostrou superior aos demais com média de (5,54000).

Quanto ao comprimento médio da raiz o genótipo Kuthiravally apresentou maior comprimento da raiz com média de (26,55800 mm) e não diferiu estatisticamente de Alencar.

Os maiores comprimento da planta pertencem os genótipos Kuthiravally (16,69000) e Alencar (15,94800) que foram superiores a cultivar Guajarina (Tabela 17).

Tabela 16. Teste de medias do enraizamento in vitro dos Três genótipos de pimenteira-do-reino.

GENÓTIPOS	NUMERO DE RAIZES	COMPR RAIZ	COMPR PLANTA
Guajarina	3,30800 b	10,77300 b	10,57000 b
Kuthiravally	4,06000 b	26,55800 a	16,69000 a
Alencar	5,54000 a	22,13400 a	15,94800 a

¹ Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Pôde ser observado também diferenças nas características morfológicas das raízes, em que o genótipo Alencar desenvolveu raízes curtas e grossas e os genótipos Kuthiravally e Guajarina diferenciaram raízes finas e curtas (Figura 25).

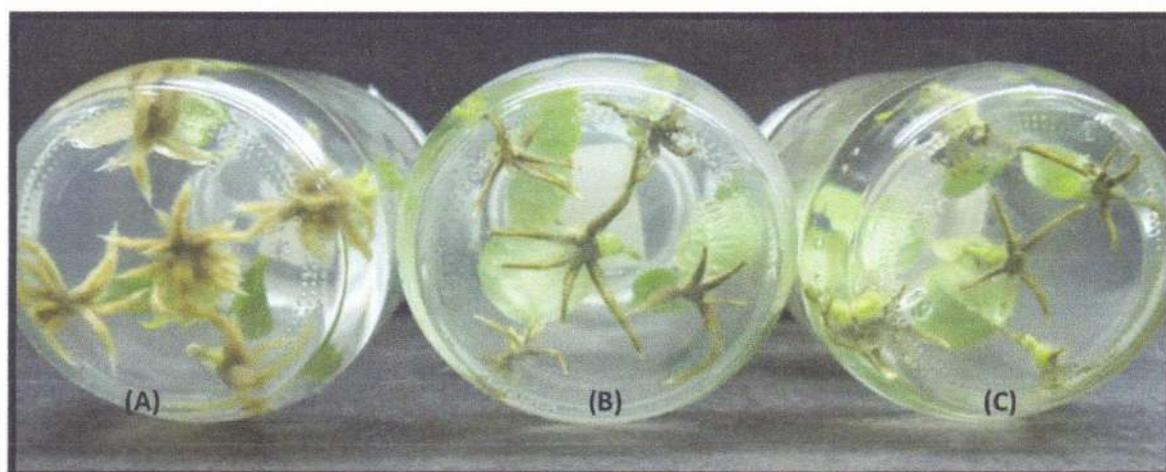


Figura 25. Brotos de genótipos de pimenteira-do-reino cultivados em meio $\frac{1}{2}$ MS com adição de (0,05mg.L-1) da ANA (A) Alencar; (B) Kuthiravally e (C) Guajarina.

As taxas de sobrevivência durante a aclimatização estão diretamente relacionadas à porcentagem de enraizamento, número e qualidade das raízes provenientes da fase de enraizamento *in vitro*.

Para a taxa de sobrevivência na aclimatização todos os genótipos apresentaram mais de 90% de plantas sobreviventes.

As maiores taxas de sobrevivência obtidas para a Alencar pertencem ao substrato vermiculita + areia (1:1) que alcançou 100% de sobrevivência.

O genótipo Kuthiravally apresentou 100% de plantas vivas para a maioria dos substratos testados, exceto para o substrato vermiculita + areia (1:2) que proporcionaram 97,91% plantas sobreviventes.

Os substratos vermiculita e areia mostraram-se mais eficiente na sobrevivência de plantas aclimatizadas do genótipo Guajarina, ambos com 100% de plantas vivas na aclimatização (Figura 26).

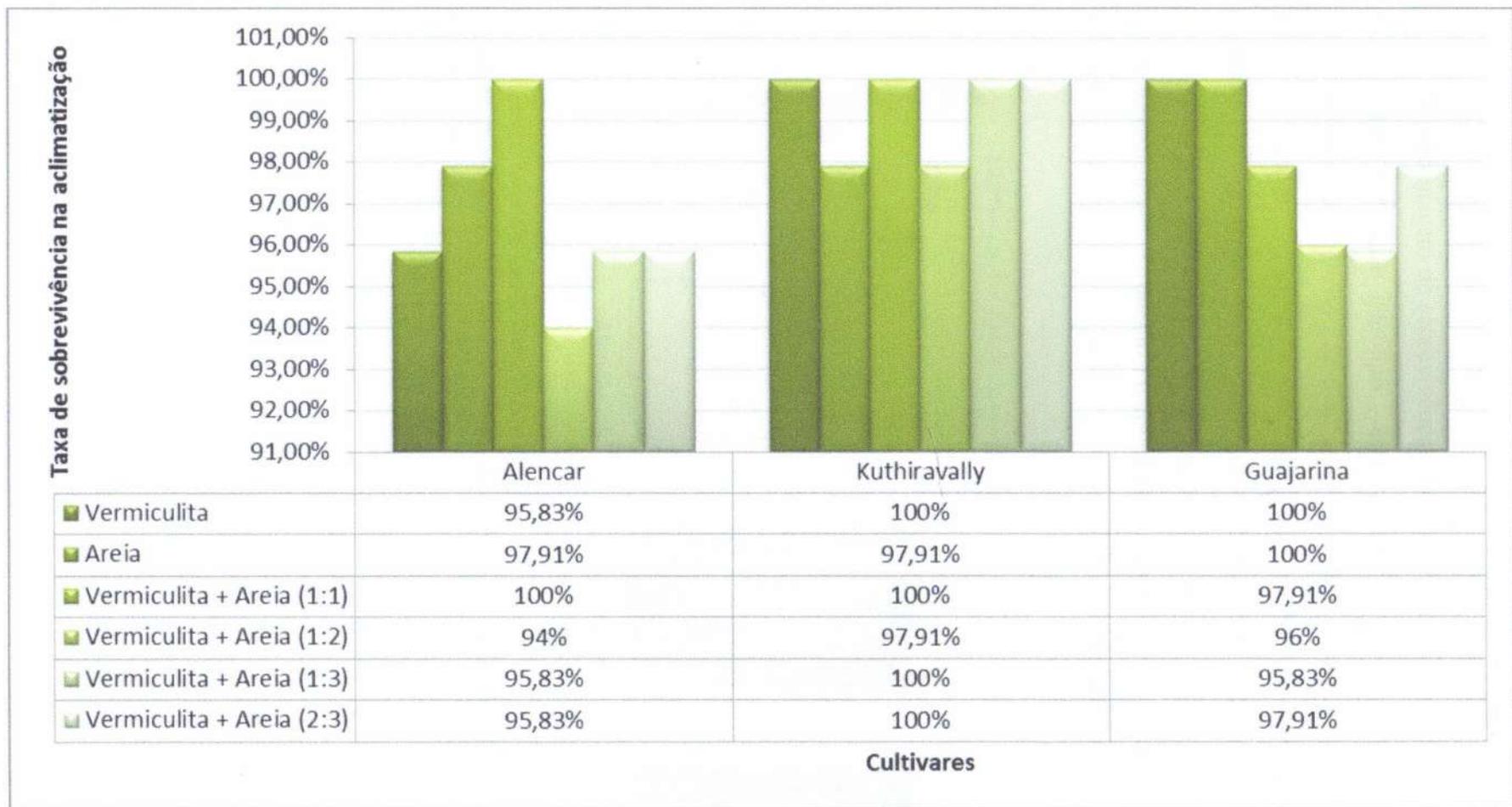


Figura 26. Percentual da taxa de sobrevivência na aclimatização de pimenta do reino após 28 dias de cultivo ex vitro.

A percentagem de sobrevivência após 8 semanas na etapa de formação de mudas foi diversificada para cada genótipo, sendo Kuthiravally o que apresentou maior taxa de sobrevivência com (96%) de plantas vivas seguida respectivamente da Guajarina com (94%) e Alencar (72%), essa diferença estatística foi confirmada através do teste qui-quadrado (X^2), onde o valor de X^2 tabelado = 32,0610 < X^2 calculado = 5,9910.

Este fato demonstra que as plantas que sobreviveram na etapa de aclimatização apresentavam desenvolvimento favorável para a formação de mudas, além das condições de cultivo e a utilização de terra preta + matéria orgânica como substrato (Figura 27).

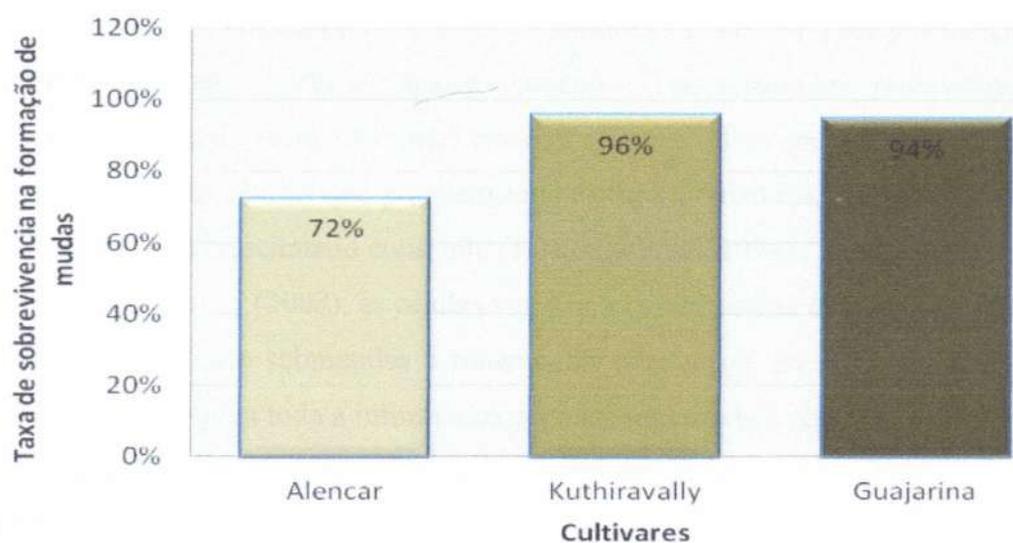


Figura 27. Percentual da taxa de sobrevivência de formação de mudas de três genótipos de pimenta-do-reino após 56 dias de cultivo em casa de vegetação.

5 Discussão

Multiplicação

A concentração e o tempo de exposição a cada subcultivo ao 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA) utilizados mostraram-se eficientes para a indução da organogênese nos explantes originados do ápice caulinar e do segmento nodal na etapa de multiplicação, no entanto os genótipos responderam de forma diferente a cada subcultivo para as variáveis proliferação de gema, broto e comprimento broto.

No primeiro subcultivo, o tipo de explante foi significativo na indução de novas gemas, destacando-se os ápices que promoveram maior número de gemas, semelhantes aos resultados encontrados por Philip et al. (1992) e Moura et al. (2008) para propagação *in vitro* de pimenteira-do-reino a partir de ápices caulinares. Tais resultados, possivelmente estão relacionados pelo fato do segmento apical caulinar ser constituído em grande parte pelo tecido meristemático que são células que possuem uma estrutura dinâmica, com divisões celulares, formação de órgãos e crescimento constante (TORRES et al., 1998).

Segundo Kerbauy (2008), as células vegetais são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas quando submetidas a tratamentos adequados, ou seja, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa caracterizando assim, a totipotencialidade (PASQUAL, 2001; GUERRA e NODARI, 2006).

Considerando as variáveis gema, broto e comprimento de broto por explante em cinco subcultivos para o fator meios de cultura utilizando como fonte de explantes apenas gemas axilares, pôde observar que a utilização das diferentes combinação de citocininas/auxinas (BAP/AIA) apresentou efeito significativo. De acordo com as pesquisa descritas na literatura, observa-se que as citocininas são usadas em diversas cultivares e em variadas concentrações, combinadas entre si ou até mesmo associadas às auxinas (ROGALSKI et al., 2003).

Para variáveis gemas e brotos/explante o meio M1(0,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,2 mg.L⁻¹ AIA) se destacou proporcionando em todos os subcultivos realizados as maiores médias, porém para a variável comprimento do broto o M2 (0,6 mg.L⁻¹ BAP + 0,2 mg.L⁻¹ AIA) mostrou-se superior.

Contudo sugere-se o uso do meio M1(0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,2 mg.L⁻¹ AIA) para as multiplicação *in vitro* de genótipos de pimenteira-do-reino uma vez que se obtém uma eficiente proliferações de gemas e brotos, além de utilizar o fitorregulador em menor

concentração. Estes resultados estão de acordo aos de Moura *et al.* (2008) na fase de multiplicação de brotos que usou BAP (0,5mg. L⁻¹) para a cultivar Bragantina de pimenteira-do-reino e o de ROGALSKI *et al.* (1999), ROGALSKI e LEONTIEV-ORLOV (1999) que obtiveram um maior comprimento dos brotos por explante na multiplicação *in vitro* de ameixeira com 0,5 a 1,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Os genótipos apresentaram diferenças nas respostas das três variáveis nos cinco subcultivos, o genótipo Kuthiravally obteve melhor resposta para variável gema em três subcultivos, enquanto para broto foi o genótipo Guajarina também na maioria dos subcultivos, para comprimento de broto os diferentes genótipos responderam de maneira diferenciada no decorrer dos subcultivos, isto mostra uma possível ocorrência de especificidade genotípica no comportamento *in vitro*.

Variações na taxa de regeneração atribuídas a diferentes genótipos também foram citadas para outras espécies micropropagadas, como é o caso da bananeira (MENDES *et al.*, 1996) e cana-de açúcar (*Saccharum officinarum*) (Lima *et al.*, 2010), este caso, os reguladores de crescimento têm sido fundamentais para o sucesso da micropropagação.

Entretanto, mais estudos são necessários, incluindo outros genótipos de pimenteira-do-reino, sobre a influência dos reguladores vegetais, pois pode haver variações dependendo do genótipo em estudo.

Enraizamento *in vitro*, Aclimatização *ex vitro* e Formação de mudas

Os resultados obtidos durante a fase de enraizamento *in vitro* evidenciaram a importância das auxinas no meio ½ MS para a indução de primórdios radiculares nos genótipos de pimenteira-do-reino.

Nesta fase de enraizamento, o genótipo Alencar se destacou devido promover a maior porcentagem (98%) enquanto os genótipos Kuthuravally e Guajarina, ambas apresentaram 94% de enraizamento, cujas diferenças genotípicas sejam comuns na maioria das vezes. Zanol *et al.* (1997) observou diferenças entre genótipos de plantas frutíferas que apresentaram sensibilidade à auxina no enraizamento.

Diferenças também foram analisadas por Souza e Pereira (2007) que notaram diferenças no potencial de enraizamento condicionado pelos genótipos de uma mesma espécie, em função tanto da auxina como da dose utilizada.

Na etapa de aclimatização pode ser observadas perdas de até 6% de plantas, essa etapa é fundamental dentro do programa da cultura de tecidos, pois em alguns casos pode ser um

fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), uma vez que consiste na retirada das plantas do cultivo *in vitro* e sua transferência para condições *ex vitro*.

A taxa de sobrevivência na aclimatização das cultivares pode estar relacionada com o desenvolvimento das raízes na etapa do enraizamento, pois os genótipos Guajarina e Kuthiravally apresentaram raízes finas e curtas. Já a cultivar Alencar, com raízes curtas e grossas, sendo esta a que apresentou o menor índice de sobrevivência 94%, possivelmente o maior número de plantas mortas do genótipo Alencar estiveram relacionadas com as características morfológicas das raízes. Estudos realizados por Santos (2012) apresentaram que plantas com raízes grossas e curtas são ineficientes para a sobrevivência no processo de aclimatização.

Ocorreu na aclimatização diferenças de sobrevivência também relacionadas aos substratos utilizados. Dos fatores externos que influenciam na aclimatização, os substratos utilizados são de grande importância na propagação vegetativa, pois devem ser permeáveis para as raízes se desenvolverem, poroso, bem drenado, livre de patógenos, pragas e propágulos de ervas daninhas e ter baixa densidade (KÄMPF, 2000; WENDLING et al., 2002), bem como disponibilidade e viabilidade econômica.

Quanto aos substratos, vermiculita + areia (1:1) foi o que proporcionou melhores condições para aclimatização dos brotos enraizados de pimenteira-do-reino. A vermiculita apresenta boa aeração e drenagem, elevada porosidade, com equilíbrio entre macro e microporos e alta capacidade de retenção de água (KÄMPF, 2000; HARTMANN et al., 2002) e o substrato areia reúne características necessárias de um bom substrato, tais como porosidade e esterilidade, uma boa porosidade permite o movimento de água e ar no substrato e segundo Mello et al (1983), Hartmann e Kester (2002) e Schmitz et al (2002), a areia cria espaços porosos e aumenta a granulação nos substratos, regulando a retenção de líquidos e a drenagem, condições que favorecem o crescimento das raízes.

A utilização em conjunto destes substratos, vermiculita e areia na proporção de 1:1, pode ter promovido melhores condições físicas deste substrato no estudo realizado. Desta forma, a seleção do substrato tem fundamental importância no crescimento e no desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso dessa etapa (WAGNER JÚNIOR et al., 2003).

Na etapa de formação de mudas ocorreu mais de 70% de sobrevivência para todos os genótipos, variando de 72% a 96%, sendo que a maior taxa de sobrevivências pode estar

relacionada à etapa de aclimatização com raízes normais e autônomas para o crescimento das plantas em terra preta + matéria orgânica.

6 Conclusões

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

- A indexação revela que as plantas multiplicadas *in vitro* estão ou não livres de vírus.
- O meio de cultura MS, suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, é eficiente na etapa de multiplicação *in vitro* dos genótipos Alencar, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino.
- Há na multiplicação *in vitro* a ocorrência de diferença genotípica dos genótipos Alencar, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino.
- Os brotos dos genótipos Alencar, Guajarina e Kuthiravally em ácido naftaleno acético (ANA) apresentam 100% de enraizamento em meio $\frac{1}{2}$ MS.
- O substrato vermiculita e areia (1:1) é eficiente na aclimatização promovendo elevadas taxas de sobrevivência dos genótipos Alencar, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino.
- Uma vez as plantas aclimatizadas, na fase de formação de mudas em substrato de terra preta e matéria orgânica, o crescimento é normal sem perda de plantas.

REFERÊNCIAS

- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. Tissue cultura media. In: **Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition**. Amsterdã: Elsevier, 1996. p. 39-62.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1990. Cap.9, p.99-170.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1. ed. Brasília: SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 183-230. v. 1.
- GEORGE, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background, *Plant Propagation by Tissue Culture: the background*. Vol. 1. 3.ed., Springer, Dordrecht, p. 2–28.
- 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.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de Biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 2006. 41p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002, 880p.
- HOMMA, A. K. O. Introdução e importância econômica. In: DUARTE, M. de L. R. (ed.). **Cultivo de pimenta-do-reino na região Norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 185 p, 2004. (Sistema de produção, 1).
- IBGE. 2014**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados. Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2014.
- KÄMPF, A.N. Substrato. IN: KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária,2000. p. 45-73.
- LIMA, G. V. M. Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*saccharum officinarum l.*). **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010.

MENDES, B.M.J.; MENDES, F.J.; TULMANN NETO, A.; DEMETRIO, C.G.B.; PUSKE. O.R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.12, p.863-867, dez. 1996.

MELLO, F.A.F.; SOBRINO, M.O.C.B.; ARZOLLA, S.; SILVEIRA, R.; NETTO, A.C.; KIEHL, J.C. **Fertilidade do solo**. São Paulo: Nobel, 1983. 400p.

MERCIER, H. Auxinas, In: KERBAUY, G. B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S. A., 2004. p. 217-249.

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.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R.L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira CV. GALA RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 174-177, set-dez., 1999.

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

OLIVEIRA, M. K. T.; BEZERRA NETO, F.; CÂMARA, F. A.; DOMBROSKI, J. L. D.; FREITAS, R. M. O. Multiplicação *in vitro* de batata-doce (*Ipomoea batatas* Lam). **Revista Caatinga**, v. 21, n. 4, p.129-134, outubro/dezembro de 2008.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Série: **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. Fundação Cargill, v. 2, p. 179-187, 2002.

PHILIP, V.J. et al. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v.12, p.41-44, 1992.

ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O. Estudo de Micropropagação e morfogênese em ameixeira e pessegueiro. **Relatório Técnico-Científico PIBIC/CNPq**. Erechim. Universidade Regional Integrado Alto Uruguai e das Missões (URI), 1999, 151p.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, J.A.; CANSIAN, R.L. Efeito de diferentes concentrações de benziladenina (BA) e macroíons na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaja). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS, **SUPPLEMENT Genetics and Molecular Biology – Programa e Resumos**, Gramado: SBG, 1999. p. 714a.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira “Santa Rosa”: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2. p.365-367, 2003.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C.; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2. p.293-296, 2006.

SARTOR, F.R.; MORAES, A.M.; ALMEIDA, F.A.C. TÉCNICAS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE GEMAS DE MANGA BEIRA. **Revista Agrotecnologia, Anápolis**, v.3, n.1, p.31-39, 2012.

SCHMITZ, J.A.K.; SOUZA, P.V.D.; KÄMPF, A.N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.937-944, 2002.

SILVA, E.C.; PINTO, C.A; SOUZA-DIAS, J.A.C; ARAÚJO, T.H. Uso de reguladores de crescimento em brotos destacados de batata-semente. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 504-509, 2011.

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

TAVEIRA, J. A. M. Novas tecnologias na aclimatização, formação e manejo de mudas. In: GERALD, L.T.S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011. 383p.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 2012. **FISIOLOGIA VEGETAL**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. 864 p.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; FRANZON, R.C.; QUEZADA, A.C. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de ameixeira Marianna 2624. **Revista Ceres**, Viçosa. v.51, n.295, p.317-323, 2003.

ZANOL, G.C. et al. Efeito de diferentes concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira cv, 1997.