



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARIA ELIZIANE PANTOJA DA SILVA

**GERMINAÇÃO E ENRAIZAMENTO IN VITRO DE GENÓTIPOS DE
PIMENTEIRA-DO-REINO**

BELÉM
2023

MARIA ELIZIANE PANTOJA DA SILVA

**GERMINAÇÃO E ENRAIZAMENTO IN VITRO DE GENÓTIPOS DE
PIMENTEIRA-DO-REINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural da Amazônia, *Campus* de Belém, como requisito parcial para a conclusão do Curso de Agronomia.
Orientadora: Profa. Dra. Herica Santos de Oliveira
Coorientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

**BELÉM
2023**

MARIA ELIZIANE PANTOJA DA SILVA

GERMINAÇÃO E ENRAIZAMENTO IN VITRO DE GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-
DO-REINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural da Amazônia,
Campus Belém- PA, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira Agrônoma

Aprovado em __ de abril de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Herica Santos de Oliveira
Orientadora
UFRA- *Campus* Belém

Membro 1
Profa. Dra. Joanne Moraes de Melo Souza
UFRA- *Campus* Belém

Membro 2
Dra. Lana Roberta Reis dos Santos
Doutorado em Agronomia

Ao meu pai, Francisco Alves da Silva (in memoriam).

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido trilhar este caminho e a minha fé por ter me sustentado todos os dias.

A minha mãe Maria de Jesus, a minha madrinha Flavia e meu padrinho Salvador por terem investido em mim todos esses anos e acreditado que eu poderia alcançar os meus objetivos, sem vocês eu não chegaria até aqui. Aos meus irmãos, Eliza, Ernandes, Eliseu, Elizabeth, Elizete, Mateus por todo apoio e incentivo que estive ao alcance de vocês para me ajudar e por terem me dado os sobrinhos mais amorosos que alegraram os meus dias. A minha família, em especial a tia Maria Eliza pelo acolhimento, por todo suporte mesmo antes da graduação e a todas as tias e tios que de alguma forma contribuíram para este momento.

A Universidade Federal Rural da Amazônia pela formação profissional e pessoal que me foi proporcionado e por ter aberto as portas para os meus novos objetivos. Aos professores desta instituição, especialmente a professora Herica Oliveira por ter aceitado me orientar e colaborado significativamente para a realização deste trabalho. Agradeço também ao professor Leonardo Ferreira pela contribuição tanta na minha formação acadêmica, quanto pelos conselhos de vida.

Ao meu orientador Dr. Oriel Lemos pela oportunidade de estágio e por sempre estar de portas abertas para seus estagiários, por ser um exemplo de humildade, sabedoria e por todo conhecimento que me foi transmitido durante esse período de estágio, muito obrigada!

A Embrapa Amazônia Oriental, aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Vegetal, Isaias Leite e Marcos Seabra e ao Dr. Moisés Mourão pelo suporte técnico.

Aos meus amigos da graduação que me acompanharam esses anos de curso, o G8, Inácia Batista, Maria Rebeca Castro, Ana Caroline Batista, Lays Gomes, Naima Trindade, Delson Souza e Rogerio Prestes, obrigada por cada momento que pude vivenciar e aprender com vocês, pelos choros e risos, por cada palavra de incentivo e apoio, vocês foram fundamentais nessa caminhada!

Ao meu namorado Valdeci Pinheiro pelo companheirismo, apoio e tempo dedicado a mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho!

RESUMO

Piper nigrum L. conhecida como pimenteira-do-reino tem como principal produto a pimenta preta, amplamente utilizada na culinária pela sua pungência, aroma e sabor característico. A pimenteira-do-reino é uma cultura de grande importância no agronegócio paraense, no entanto, as cultivares que foram introduzidas no Brasil possuem estreita variabilidade genética, tornando os genótipos vulneráveis a pragas e doenças. Com o intuito de produzir mudas vigorosas, saudáveis, livres de vírus e doenças e subsidiar o programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino, este trabalho teve como objetivo desenvolver duas etapas da micropropagação de genótipos de pimenteira-do-reino: a produção de plantas via germinação *in vitro* como fonte de explantes e o enraizamento de brotos. A pesquisa foi realizada no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Foram selecionados frutos maduros provenientes de três diferentes genótipos do programa de melhoramento genético, conservados em casa de vegetação da Embrapa e submetidos ao processo de assepsia. As sementes obtidas foram inoculadas em diferentes posições em frascos de vidro contendo 40 mL de meio básico MS de cultura. Dos brotos cultivados em meio básico MS com BAP (0,50 mg.L⁻¹) e AIA (0,2 mg.L⁻¹) foram obtidos explantes (segmentos nodais) para o enraizamento do híbrido intraespecífico Uthirankotta x Kuthiravally em meio básico MS de cultura suplementado com diferentes doses de AIB e ANA. Ao fim dos experimentos foi realizada a coleta de dados e submetidos a testes estatísticos. . No processo de germinação de sementes de pimenteira-do-reino *in vitro* verificou-se que as maiores porcentagens de formação de plântula ocorreram no genótipo Iaçará inoculados na posição horizontal aos 124 dias após a semeadura. No enraizamento de explantes de pimenteira-do-reino, os fitorreguladores apresentaram diferenças estatística, destacando-se o ANA, o qual propiciou maior número de raízes e folhas. Portanto, o tempo para germinação e formação de plantas é variável entre os genótipos com destaque para o genótipo Iaçará e para o enraizamento o meio de cultura com 1 µM de ANA é recomendado.

Palavras-chave: cultura de tecidos; fitorreguladores; ontogenia, *Piper nigrum* L.

ABSTRACT

Piper nigrum L. known as black pepper has as main product the black pepper, widely used in cooking for its pungency, aroma and characteristic flavor. The black pepper is a very important crop in the agribusiness of Pará. However, the cultivars that were introduced in Brazil have narrow genetic variability, making the genotypes vulnerable to pests and diseases. In order to produce vigorous, healthy, virus and diseasefree seedlings and to support the genetic improvement program of black pepper, this work aimed to develop two steps of the micropropagation of black pepper genotypes: the production of plants via in vitro germination as a source of explants and the rooting of shoots. The research was carried out in the laboratory of Plant Biotechnology of Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA. Ripe fruits from three different genotypes of the breeding program were selected and stored in Embrapa's greenhouse and submitted to the asepsis process. The seeds obtained were inoculated in different positions in glass flasks containing 40 mL of basic MS culture medium. From the shoots grown in basic MS medium with BAP (0.50 mg. L⁻¹) and IAA (0.2 mg. L⁻¹) explants (nodal segments) were obtained for rooting of the intraspecific hybrid Uthirankotta x Kuthiravally in MS culture medium supplemented with different doses of IBA and NAA. At the end of the experiments, data were collected and submitted to statistical tests. In the process of germination of black pepper seeds in vitro it was found that the highest percentages of seedling formation occurred in the genotype Iaçará inoculated in the horizontal position at 124 days after sowing. In the rooting of explants of black pepper, the phytohormones showed statistical differences, especially NAA, which provided a greater number of roots and leaves. Therefore, the time for germination and formation of plants is variable among the genotypes, especially the genotype Iaçará and for the rooting the culture medium with 1 µM of NAA is recommended.

Keywords: phytohormones; tissue culture; ontogeny; *Piper nigrum* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de assepsia em sementes de pimenteira-do-reino. A- Imersão em solução de fungicida B- Imersão em hipoclorito de sódio.....	16
Figura 2 – Assepsia de sementes de pimenteira-do-reino em câmara de fluxo laminar	17
Figura 3 – Diferentes posições de inoculação de sementes de pimenteira-do-reino: A- posição vertical normal; B- posição horizontal; C- posição vertical invertida.....	18
Figura 4 – Gráficos de frequência de emissão das estruturas de germinação dos genótipos de pimenteira-do-reino	21
Figura 5 – Tempo para a formação de plântula de 50-80% da amostra	23
Figura 6 – Fases finais de germinação de sementes de pimenteira-do-reino	24
Figura 7 – Gráfico de regressão dos efeitos das doses dos fitorreguladores nas variáveis número de raiz, número de folhas e tamanho da raiz maior.	26
Figura 8 – Diagrama de ordenação das doses dos fitorreguladores	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência de estruturas emitidas nas etapas de germinação de sementes de pimenteira-do-reino	20
Tabela 2 – Tempo mínimo para emissão das estruturas no processo de germinação de sementes de pimenteira-do-reino	22
Tabela 3 – Análise de variância para os efeitos dos fitorreguladores e doses para as variáveis número de raiz, número de folhas e tamanho da raiz maior.....	24
Tabela 4 – Teste de médias para a interação das doses dos fiterreguladores nas as variáveis número de raízes, número de folhas e tamanho da raiz maior	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIB – Ácido indolbutírico

ANA – Ácido naftalenoacético

DAS – Dias após o semeio

EE – Emissão de epicótilo

EHP – Emissão de hipocótilo

EFC – Emissão das folhas cotiledonares

PF – Plântula formada

ERD – Emissão de radícula

ERP – Emissão da raiz principal

NR – Número de raízes

NF – Número de folhas

TM – Tamanho da raiz maior

PH – Posição horizontal

PVI – Posição vertical invertida

PVN – Posição vertical normal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Aspectos gerais da cultura da pimenteira-do-reino	13
3.2 Melhoramento genético da pimenteira-do-reino	14
3.3 Cultura de tecidos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Germinação in vitro	16
4.2 Enraizamento in vitro	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Germinação in vitro	19
5.2 Enraizamento in vitro	24
6. CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Piper nigrum L. conhecida popularmente como pimenteira-do-reino, é nativa das florestas de Kerala, no sudoeste da Índia, e vastamente distribuída em regiões tropicais. O principal produto é o fruto seco, chamado de pimenta preta, pimenta-do-reino, uma especiaria, amplamente utilizada pela sua pungência, aroma e sabor característico, empregada principalmente na culinária para adicionar sabor próprio aos pratos e realçar o sabor de outros ingredientes, indústria de alimentos, além de possuir fitocompostos bioativos com significativas propriedades farmacológicas (JOSHI et al., 2018; TAKOOREE et al., 2019; ANDRIANA et al., 2019).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial de pimenta-do-reino, com uma produção de 118.057 toneladas, ficando atrás apenas do Vietnã com 288.167,21 toneladas produzidas. Quanto a exportação, este cenário se assemelha, pois o Brasil é o segundo exportador mundial de pimenta-do-reino com 92.065 toneladas. O país possui área colhida de 37.994 hectares e rendimento médio de 3.107 quilogramas por hectare (FAO, 2023; IBGE, 2023).

No que tange a produção brasileira, os estados do Espírito Santo, Pará e Bahia são os maiores produtores. Ressalta-se que a maior parte dessa prática é desempenhada por agricultores familiares, onde 83% dos 32.799 estabelecimentos agropecuários são destinados à cultura (ALIXANDRE et al., 2022; IBGE, 2023).

No ano de 2021, o estado do Pará produziu 35.469 toneladas de pimenta-do-reino, área plantada de 16.322 hectares, rendimento médio de 2.173 quilogramas por hectare e valor de produção de R\$ 458.452 mil reais (IBGE, 2023).

A pimenteira-do-reino é uma cultura de grande importância no agronegócio paraense, proporcionando melhorias socioeconômicas ao produtor. No entanto, as cultivares de pimenteira-do-reino introduzidas no Brasil possuem estreita variabilidade genética, tornando os genótipos suscetíveis a pragas e doenças, além de dificultar a seleção de plantas com boa produtividade, precocidade e tolerância ao estresse hídrico (LEMOS et al., 2022).

Nesse sentido, o programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino desenvolvido pela Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, visa a obtenção de híbridos por meio de polinização artificial, cujas sementes obtidas são submetidas à germinação e multiplicação rápida via cultivo *in vitro* para introdução no campo e caracterização e avaliação morfo-agronômicas visando a seleção de genótipos com caracteres agronômicos vantajosos para o lançamento de novas cultivares para o sistema de produção (POLTRONIERI et al., 2020).

Além de auxiliar o melhoramento genético das plantas, o método de cultivo in vitro por meio da micropropagação dispõe de vantagem, quando comparado com o sistema convencional, uma vez que proporciona maior taxa de multiplicação em tempo e espaço reduzido, controle fitossanitário, independente da época do ano (RAMOS et al., 2021). Ademais, permite a produção de mudas vigorosas e saudáveis e sistema radicular abundante por meio da indução da rizogênese, etapa primordial para a produção de mudas, utilizando fitorreguladores para acelerar o processo in vitro (SILVA et al., 2019).

Com o intuito de produzir mudas vigorosas, saudáveis, livres de vírus e doenças e subsidiar o programa de melhoramento genético da pimenteira-do-reino, este trabalho teve como objetivo desenvolver diferentes etapas do processo da micropropagação de genótipos de pimenteira-do-reino.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Desenvolver plantas do programa de melhoramento genético por meio das técnicas de geminação in vitro e clonagem via micropropagação de genótipos de pimenteira-do-reino.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Germinar in vitro diferentes genótipos de pimenteira-do-reino provenientes do programa de melhoramento genético de polinização aberta via semente;
- ✓ Determinar o efeito dos fitorreguladores no enraizamento in vitro de um genótipo de pimenteira-do-reino;
- ✓ Mensurar as variáveis número de raiz, tamanho da maior raiz e número de folhas sob o efeito dos fitorreguladores no enraizamento in vitro de genótipos de pimenteira-do-reino.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da cultura da pimenteira-do-reino

Esta espécie tem como centro de origem a Índia, sendo introduzida no Brasil em 1930, por meio da imigração japonesa. Estudos indicam sua existência no país desde o século XVII. Para Homma et al. (2016), no estado do Pará, imigrantes chegaram no município de Tomé-Açu para iniciar o processo de desenvolvimento da cultura. Sendo difundida e intensificada a partir de 1933, fato, este, fundamental como suporte econômico de pequenos e grandes produtores da

região amazônica (LEMOS et al., 2011; DUARTE et al., 2006).

Piper nigrum L., pertence à família Piperaceae. É uma planta perene, lenhosa, trepadeira, com a presença de raízes adventícias grampiformes na haste central do seu caule, que se fixam no tutor. A inflorescência é uma espiga hermafrodita que pode atingir doze centímetros de comprimento, composta de pequenas flores e ausência de cálice e corola. O fruto é uma drupa séssil, indeiscente, que se origina de um único óvulo, os frutos após a secagem são vendidos como pimenta preta no mercado. Quando maduro possui de 4 a 6 mm de diâmetro. A casca adquire coloração vermelha e a semente apresenta o tegumento esbranquiçado (ALBUQUERQUE; CONDURÚ, 1971).

3.2 Melhoramento genético da pimenteira-do-reino

A cultura da pimenteira-do-reino tem um histórico de ataque de pragas e doenças, principalmente a fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* que têm destruído as vastas áreas de cultivo e diminuído o ciclo produtivo, isto ocorre devido à estreita base genética da planta, pois isto não permite que se encontre fonte de resistência e por conseguinte não há cultivares resistentes e /ou tolerantes a fusariose, além deste fungo, há também a doença da murcha amarela (*Fusarium oxysporum*) e em menor severidade a queima-do-fio (*Koleroga noxia*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). Entre outros patógenos, encontra-se as viroses do tipo PYMoV (*Piper yellow mottle virus*) e CMV (*Cucumber mosaic virus*) (TREMACOLDI; DUARTE, 2006; TREMACOLDI, 2010; LEMOS et al., 2011).

Uma das estratégias do melhoramento seria a produção de híbridos e clonagem de combinações superiores no propósito de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento genético e assim obter material genético resistente a pragas e doenças (ASSIS, 1996).

Outras ferramentas utilizadas no melhoramento genético da pimenteira-do-reino é a citogenética, a qual se caracteriza pela contagem do número dos cromossomos em células somáticas e montagem de cariótipos e idiogramas. As técnicas de cultivo in vitro permite a regeneração de plantas, conservação de germoplasma e a micropropagação. Os marcadores moleculares viabilizam a quantificação da variabilidade dos genótipos de bancos de germoplasma e a identificação de genes (LEMOS et al., 2009; LEMOS et al., 2011).

3.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais consiste na regeneração vegetal in vitro, isto ocorre a partir de pequenas frações de tecido vivo, chamados explantes, podendo ser fragmento de folha, raiz,

caule, que são isolados de um vegetal desinfectados e cultivados em meio de cultura asséptico e apropriado, a fim de obter um indivíduo idêntico à original (ANDRADE, 2002).

As plantas possuem a capacidade de gerar novos tecidos e órgãos de maneira recorrente durante a vida, chamado de crescimento aberto ou indeterminado, neste arranjo o número de órgãos da planta não é pré-determinado, podendo crescer e se desenvolver de forma modular durante o período pós-embriônico. Esta potencialidade intrínseca de uma célula vegetal em produzir órgãos como brotos e/ou raízes, embriões somáticos, que regeneram uma planta completa em um meio de cultivo favorável é chamada de totipotência (CARVALHO; ROCHA, 2006; RODRIGUES; KERBAUY, 2009;)

No cultivo *in vitro*, a micropropagação refere-se exclusivamente à propagação *in vitro* a partir de alguma parte específica da planta, chamada explante, a qual se baseia na capacidade morfogenética e totipotencial das células. As plantas resultantes desse processo são uniformes quanto ao crescimento, floração, frutificação e produtividade, bem como estáveis, livres e resistentes a doenças, se já passadas por uma prévia seleção (CID; TEIXEIRA, 2015).

A germinação de sementes *in vitro* tem a finalidade de produzir plântulas assépticas, vigorosas e homogêneas para iniciar-se a cultura de explantes, como folhas e segmentos nodais (COELHO et al., 2001; REIS et al., 2008). Para Copeland e McDonald (1999) o processo de germinação da semente é a retomada do crescimento do embrião, que resulta na ruptura da cobertura da semente e na emergência da plântula. No cultivo *in vitro*, um dos fatores que interferem na germinação da semente e formação da plântula é a posição em que ela é semeada no meio de cultura (COUTO et al., 2004).

Na etapa de multiplicação *in vitro*, o objetivo principal é produzir o número máximo de unidades vegetais, clones, utilizando especialmente gemas apicais e axilares, além de brotações laterais para realizar os sucessivos subcultivos. Neste processo é aplicado o balaço hormonal de citocinina, a qual é empregada para aumentar a ramificação lateral das gemas axilares e de auxina, que por sua vez, não promove a proliferação de brotos axilares, mas melhora o desenvolvimento da cultura, por isso é usada em menor concentração (CHADDAD JUNIOR, 1995; MOURA et al., 2008; ULISSES et al., 2010).

A última fase da micropropagação é a rizogênese, com o propósito de formação de raízes adventícias nos brotos adquiridos no estágio de multiplicação, e permite assim, a regeneração de plantas completas, para posterior aclimatização às condições *ex vitro* (CANHOTO, 2010). Para a indução de raízes, as auxinas são os reguladores de crescimento que contribuem para a formação de primórdios radiculares, entre eles destaca-se o ácido indolbutírico (AIB) e ácido α -naftalenoacético (ANA) que são empregados em concentrações que variam conforme

a espécie ou cultivar (SOUZA; PEREIRA, 2007). Para a pimenteira-do-reino, estes reguladores têm se mostrado eficazes para a formação de raízes (RAMOS et al. 2014; RAMOS et al., 2014).

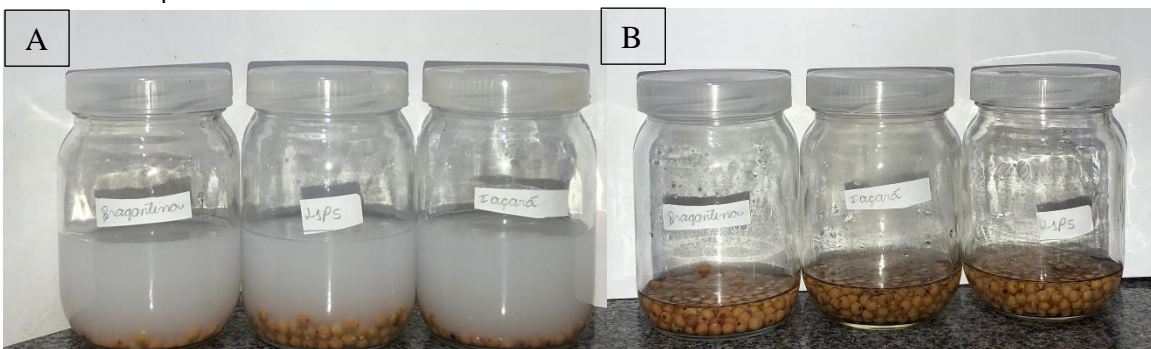
4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental, Belém - PA, considerando as seguintes etapas: germinação e enraizamento *in vitro*.

4.1 Germinação *in vitro*

Para o processo de germinação das sementes, efetuou-se a colheita de frutos maduros oriundos de três genótipos de pimenteira-do-reino: Bragantina, Iaçará e LIP5, provenientes do banco de germoplasma do programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino, mantidos na casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, que foram transferidos para o Laboratório de Biotecnologia Vegetal, onde retirou-se a mucilagem e posteriormente procedeu-se o processo de assepsia. As sementes foram lavadas com detergente neutro e água corrente e imersas por 20 minutos em solução de fungicida (Nativo[®] a 0,3 %), transferidas para solução de hipoclorito de sódio (NaClO a 1%) (Figura 1), e mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas.

Figura 1 – Processo de assepsia em sementes de pimenteira-do-reino. A- Imersão em solução de fungicida B- Imersão em hipoclorito de sódio



Fonte: Autora (2023)

Após esse período, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas e mantidas sob agitação por 1 minuto em álcool 70% e lavadas com água destilada autoclavada por cinco vezes (Figura 2).

Figura 2 – Assepsia de sementes de pimenteira-do-reino em câmara de fluxo laminar

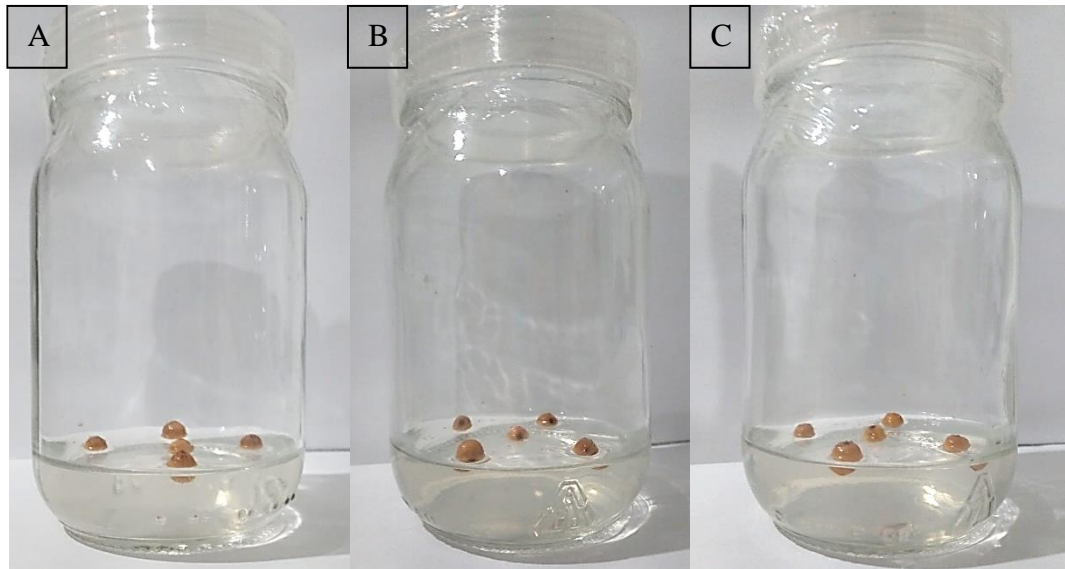


Fonte: Autora (2023)

As sementes foram transferidas para frascos de capacidade de 200 mL contendo 40 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) a $0,17 \text{ mg L}^{-1}$, sacarose a 3% e phytigel a 0,2%. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 3×3 , correspondendo a três genótipos de pimenteira-do-reino e três diferentes posições das sementes (Figura 3), onde T1: genótipo Bragantina + posição vertical normal (PVN), T2: genótipo Bragantina + posição horizontal (PH), T3: genótipo Bragantina + posição vertical invertida (PVI), T4: genótipo Iaçará + PVN, T5: genótipo Iaçará + PH, T6: genótipo Iaçará +PVI, T7: genótipo L1P5 + PVN + T8: genótipo L1P5 + PH e T9: genótipo L1P5 + PVI, totalizando nove tratamentos e cinco repetições, onde cada repetição foi representada por um frasco contendo cinco sementes.

Figura 3 – Diferentes posições de inoculação de sementes de pimenteira-do-reino: A- posição vertical normal; B- posição horizontal; C- posição vertical invertida



Fonte: Autora (2023)

O experimento foi conduzido em sala de crescimento sob condições controladas de fotoperíodo de 14h.dia^{-1} de luz, densidade de fluxo de fótons de $25\ \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ e temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram quanto ao número de dias nas fases do processo de ontogenia desde o processo de germinação à formação das plantas. Durante os estádios de desenvolvimento da plântula, avaliou-se as seguintes variáveis: emissão de radícula (ERD), emissão de hipocótilo (EHP), emissão de raiz principal (ERP), emissão de folhas cotiledonares (EFC), emissão de epicótilo (EE), plântula formada (PF) de dias após o semeio (DAS). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo programa Sisvar, e teste de comparação de médias de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Enraizamento in vitro

Para a etapa de enraizamento in vitro, foram utilizados explantes (segmentos nodais) de brotos cultivados em meio básico MS com BAP ($0,50\ \text{mg.L}^{-1}$) e AIA ($0,2\ \text{mg.L}^{-1}$) in vitro na fase de multiplicação mantidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia, os quais foram fontes de explantes. Esses explantes de brotos do híbrido intraespecífico (Uthirankotta x Kuthiravally) de pimenteira-do-reino livre do vírus PYMoV foram inoculados em frascos com capacidade para 200 mL contendo 40 mL, em meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de ANA (ácido naftalenoacético) e AIB (ácido indolbutírico), sacarose a 3%, vitamina MS e phytigel a 0,2% e mantidos com condições de incubação de fotoperíodo de 14h.dia^{-1} de luz, densidade de fluxo

de fótons de 25 ($\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) e temperatura de $25\pm 3^\circ\text{C}$.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos, os quais foram: T1 (ausência de fitorreguladores), T2 (0,25 μM ANA), T3 (0,50 μM ANA), T4 (1 μM ANA), T5 (2 μM ANA), T6 (0,25 μM AIB), T7 (0,50 μM AIB), T8 (1 μM AIB) e T9 (2 μM AIB) e 5 repetições, sendo cada repetição representada por um frasco contendo 5 explantes.

Realizou-se uma avaliação ao fim do ciclo de cultivo, seis semanas após a inoculação, quanto ao número de raízes e folhas e o comprimento da raiz maior (cm). Os dados foram submetidos à ANOVA e comparação de médias pelo teste Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação in vitro

Na etapa de germinação in vitro de pimenteira-do-reino, pode-se observar a frequência para cada estrutura emitida das sementes de cada genótipo e posição de inoculação no meio de cultura (Tabela 1). Em todos os genótipos houve emissão da radícula independente da posição da semente no meio de cultura.

Para a variável emissão de hipocótilo, ocorreu o desenvolvimento de todas as sementes no genótipo Iaçará na posição horizontal e vertical normal, no genótipo LIP5 na posição horizontal e vertical invertida. A emissão de raiz principal alcançou maiores frequências em 96% no genótipo Iaçará nas posições vertical invertida e horizontal. No que tange a emissão das folhas cotiledonares, a menor frequência (16%) encontrou-se no genótipo LIP5 na posição vertical normal e maior frequência (92%) no genótipo Iaçará na posição horizontal, seguido de 80% na posição vertical invertida e também de 80% no genótipo LIP5 na posição horizontal.

Nos estádios finais de formação de plântula, a variável emissão de epicótilo obteve maiores frequências (92%) no genótipo Iaçará na posição horizontal e menores frequências (8%) no genótipo LIP5 na posição vertical normal. Resultado semelhante aconteceu para o último estágio, a plântula formada, pois a menor frequência (8%) também foi do genótipo LIP5 na posição vertical normal, mas a maior frequência foi do genótipo Iaçará com 76% na posição horizontal, seguido de 56% do genótipo LIP5 na posição horizontal e 44% do genótipo Bragantina na mesma posição dos genótipos anteriores (PH).

A média global de plântulas formadas independente de posição das sementes inoculadas e da proveniência dos genótipos foi de 36%.

Tabela 1 – Frequência de estruturas emitidas nas etapas de germinação de sementes de pimenteira-do-reino

Genótipos	BRAG			IAÇA			LIP5			Global
	[PH]	[PVI]	[PVN]	[PH]	[PVI]	[PVN]	[PH]	[PVI]	[PVN]	
ERD	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
EHP	80%	92%	96%	100%	96%	100%	100%	100%	96%	96%
ERP	72%	92%	68%	96%	96%	36%	84%	84%	32%	73%
EFC	64%	76%	56%	92%	80%	20%	80%	72%	16%	62%
EE	52%	56%	48%	92%	48%	12%	72%	44%	8%	48%
PF	44%	32%	12%	76%	44%	12%	56%	36%	8%	36%

Onde: ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada. BRAG: Bragantina; IAÇA: Iaçará. PH: posição horizontal; PVI: posição vertical invertida e PVN: posição vertical normal. Fonte: Autora (2023).

Para Moraes et al. (2012), as pesquisas que propõem beneficiar a germinação in vitro de cultivares de pimenteira-do-reino são importantes para maximizar a taxa de germinação e obter plântulas com qualidade genética e fitossanitária adequada para fornecer explantes a serem micropropagados e as progênies geradas avaliadas quanto à variabilidade genética das cultivares utilizadas pelos pipericultores.

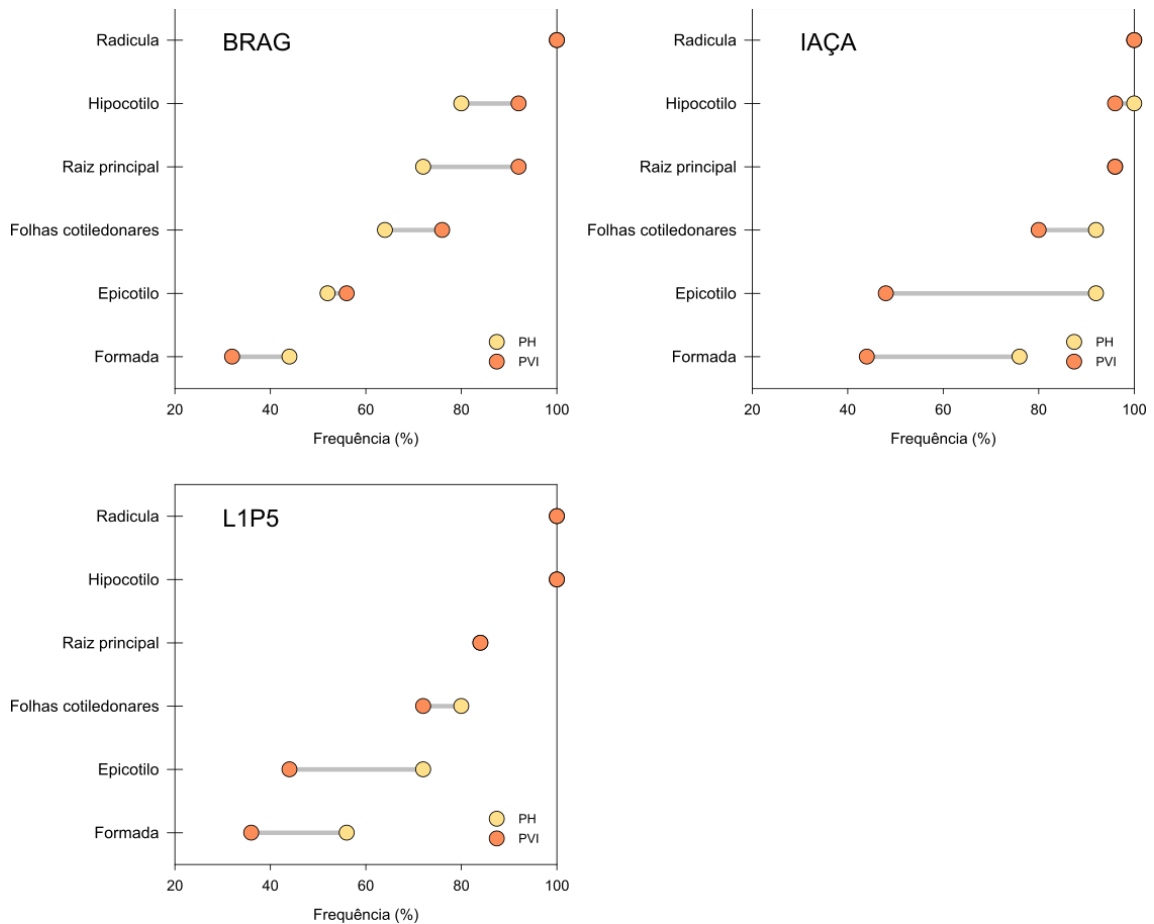
No trabalho de Neves et al. (2019), obteve-se 43,75% das plântulas formadas do híbrido intraespecífico (Bragantina x Clonada) de pimenteira-do-reino inoculadas em meio básico de cultura $\frac{1}{2}$ (metade das concentrações dos macros e micronutrientes) MS e vitaminas de Wite, sacarose a 3%, NaH_2PO_4 0,17 mg L⁻¹, resultados distintos verificados neste trabalho, onde alcançou um percentual maior de plântulas formadas (76%) no genótipo Iaçará inoculados em meio básico de cultura MS com as concentrações completas de macro e micronutrientes.

Neste trabalho, ocorreu uma variação de 44 a 76% na PH para os genótipos Bragantina, LIP5 e Iaçará submetidas ao meio de cultura MS contendo 0,17 mg L⁻¹ de NaH_2PO_4 , sem adição de fitorreguladores, enquanto que resultados próximos foi entrado para a cultivar Panakotta, onde houve a formação de plântulas com variação entre 40% a 50%, nos meios de cultura composto de $\frac{1}{2}$ MS + NaH_2PO_4 (0,17 mg L⁻¹), adicionado de BAP (0,5 mg L⁻¹), ANA (0,5 mg L⁻¹), e carvão ativado (2%) e do meio MS + NaH_2PO_4 (0,17 mg L⁻¹) + BAP (0,5 mg L⁻¹), + ANA (0,5 mg L⁻¹) + carvão ativado(2%) (COSTA et al., 2019). Ademais, para Lemos (2003) o NaH_2PO_4 auxilia na germinação e conversão em plântula normal.

Na figura 4 está representada graficamente a frequência da emissão das estruturas para a formação da plântula em cada genótipo. Com os resultados obtidos, pode-se constatar que houve um decréscimo na frequência de emissão das estruturas para a formação da plântula completa, ou seja, o processo de germinação de algumas sementes foi interrompido ao decorrer do experimento, haja vista que, houve o desenvolvimento da radícula em todos os tratamentos,

porém a frequência de plântulas formadas ao fim do trabalho não foi satisfatória. A posição vertical normal não se encontra exposta neste gráfico devido pelo menos 50% das sementes não emitir as estruturas de germinação avaliadas.

Figura 4 – Gráficos de frequência de emissão das estruturas de germinação dos genótipos de pimenteira-do-reino



ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada. BRAG: Bragantina; IAÇA: Iaçará. Fonte: Autora (2023)

De acordo com Bergo et al. (2010), vários fatores externos podem interferir na germinação de sementes, entre eles a luz, temperatura, água e oxigênio, nesse contexto, a temperatura influencia tanto na porcentagem quanto na velocidade de germinação, afetando na velocidade de absorção da água e nas reações bioquímicas.

Verificou-se o tempo mínimo que 50% e 80% das sementes levaram para a emissão das estruturas (Tabela 2), a emissão da radícula ocorreu mais precocemente aos 21 dias no genótipo Iaçará na posição horizontal e vertical invertida (50% das amostras) e no genótipo L1P5 na posição vertical invertida (50% das sementes).

Com relação ao tempo mínimo para formação completa das plântulas, 50% das plântulas do genótipo Bragantina foi aos 119 dias após o semeio (DAS) na posição PNI e 147 dias na

posição PH. Para o genótipo Iaçará 50% das plântulas foi aos 107 dias na posição PH e 112 dias na posição PVI, 80% das plântulas aos 124 dias na posição PH e 119 dias na posição PVI. O genótipo L1P5 alcançou 50% e 80 % das plântulas formadas aos 104 DAS na posição PVI.

A média global do tempo mínimo para formação completa de plântulas das sementes inoculadas foi de 113 dias (50%) e 116 dias (80%) no processo de germinação.

Tabela 2 – Tempo mínimo para emissão das estruturas no processo de germinação de sementes de pimenteira-do-reino

	BRAG			IAÇA			L1P5			Global
	[PH]	[PNI]	[PVN]	[PH]	[PVI]	[PVN]	[PH]	[PVI]	[PVN]	
ERD (50%)	36	31	42	21	21	29	22	21	27	28
	(80%)	63	50	48	24	21	32	25	21	31
EHP (50%)	49	39	55	28	31	62	39	31	45	42
	(80%)	65	46	60	31	35	62	42	38	45
ERP (50%)	47	39	89	34	35	112	40	34	49	46
	(80%)	91	49	123	38	50	119	42	37	49
EFC (50%)	82	77	112	52	58		67	75	133	75
	(80%)	98	77	133	65	91		79	89	133
EE (50%)	107	100	133	88	112		95	84		100
	(80%)		109	96	91		110	98		103
PF (50%)	147	119		107	112		114	104		113
	(80%)			124	119		104	104		116

Onde: ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada. BRAG: Bragantina; IAÇA: Iaçará. Fonte: Autora (2023)

De acordo com Lemos et al. (2012), aos 51 DAS, houve a formação completa de plântulas das cultivares Bento e Guajarina (80,0%) Cingapura (60,0%) e Kuthiravally (73,3%) nas condições de semeadura em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS + 0,10 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ + 3% de sacarose + vitamina de MS + 0,2 % de phytigel. Resultado este diferente do encontrado neste trabalho onde a formação completa de plântulas ocorreu no mínimo aos 104 dias. Nesse contexto, os genótipos se comportam diferentes devido seu material genético e interações com o ambiente.

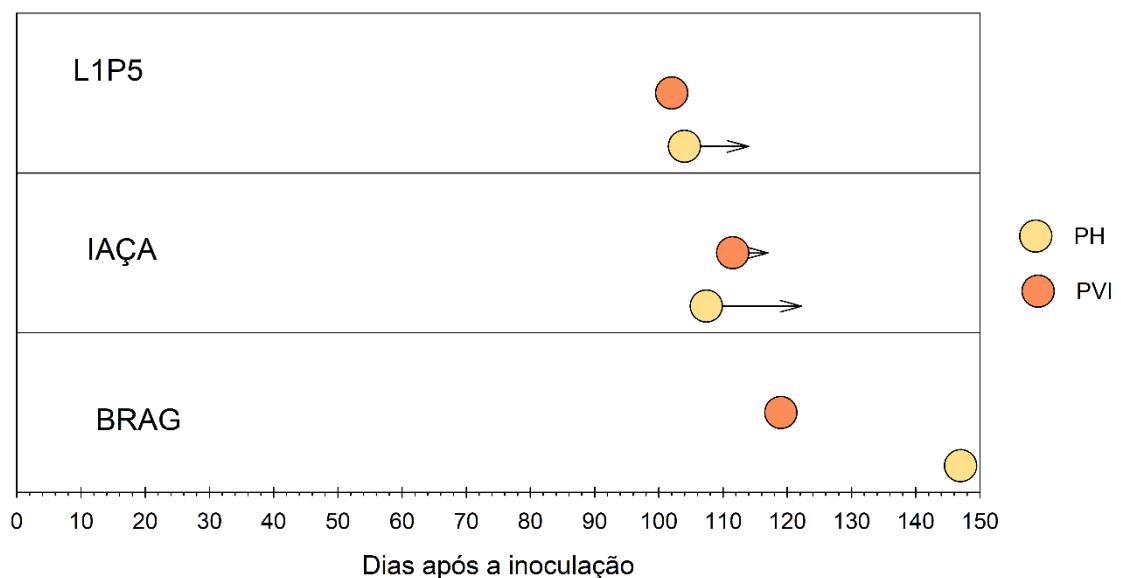
Para o híbrido intraespecífico de pimenteira-do-reino, a emissão de radícula de Bragantina x Iaçará aconteceu aos 27 DAS, de Panakotta x Iaçará1 aos 28 DAS, de Clonada x Iaçará aos 31 DAS e para Panakotta x Iaçará3 aos 43 DAS. No que se refere a plântula formada, para híbridos Clonada x Iaçará foi alcançada aos 108 DAS, 145 DAS para Bragantina x Iaçará e Panakotta x Iaçará1 e mais tardiamente para o híbrido Panakotta x Iaçará3 aos 151 DAS

(NEVES; PIRES, 2019).

Ribeiro e Pires (2019), avaliaram a germinação de genótipos de pimenteira-do-reino in vitro, de acordo com as médias de dias para formar plântula e concluíram que para alcançar esse estágio, decorreu 140 DAS para o genótipo Iaçará, 40 e 150 DAS para o híbrido Panakotta x Iaçará, entre 120 a 150 DAS para Uthirankotta x Kuthiravally nos diferentes meios de cultura empregados. Logo, o tempo para a formação das plântulas completas variam conforme o material genético. Em concordância, neste trabalho ocorreu um processo de germinação tardio para os genótipos. Portanto isto é uma limitação para a clonagem rápida dos genótipos pelo processo de micropropagação, uma vez que quanto maior o tempo para formação das plantas, maiores os custos para manutenção no laboratório e maior período para obtenção de explantes.

Na Figura 5 pode-se observar que 50% e 80% das sementes, que alcançaram a formação da plântula foi o genótipo L1P5, o mais precoce, aos 104 dias após a inoculação, na posição vertical invertida, seguido de Iaçará que ocorreu a formação de plântula entre 100 e 110 dias. O genótipo Bragantina foi o genótipo mais tardio, com 147 dias após a inoculação na posição horizontal e com 119 dias na posição normal invertida, considerando 50% das sementes que formaram plântulas completas.

Figura 5 – Tempo para a formação de plântula de 50-80% da amostra



Onde: ERD: emissão de radícula; EHP: emissão do hipocótilo; ERP: emissão da raiz principal; EFC: emissão de folhas cotiledonares; EE: emissão de epicótilo; PF: plântula formada. BRAG: Bragantina; IAÇA: Iaçará. Fonte: Autora (2023).

Na Figura 6 pode-se observar algumas amostras representativas das fases finais de desenvolvimento das plântulas a partir da germinação de sementes de pimenteira-do-reino.

Figura 6 – Fases finais de germinação de sementes de pimenteira-do-reino



Fonte: Autora (2023).

5.2 Enraizamento in vitro

No processo de enraizamento, no qual utilizou-se os fitorreguladores AIB e ANA em várias concentrações (Tabela 3), constatou-se que houve diferença de respostas devido aos fitorreguladores para as variáveis número de raiz e número de folhas. Por outro lado, as diferentes concentrações dos fitorreguladores influenciou significativamente quanto ao número de folhas, mas sem interação com o fitorregulador para as variáveis analisadas.

Tabela 3 – Análise de variância para os efeitos dos fitorreguladores e doses para as variáveis número de raiz, número de folhas e tamanho da raiz maior.

Efeitos	g.l.	NR			NF			TM		
		QM	F	p	QM	F	p	QM	F	p
Fitorreguladores	1	761,26	119,14	**	3,72	36,30	**	0,18	0,38	n.s.
Dose	3	11,30	1,77	n.s.	0,50	4,88	**	0,17	0,36	n.s.
Fitorreguladores *Dose	3	4,71	0,74	n.s.	0,14	1,34	n.s.	0,91	1,88	n.s.
Erro	32	6,39			0,10			0,48		

Onde: NR: número de raízes; NF: número de folhas; TM: Tamanho da raiz maior. Fonte: autora (2023)

Os reguladores de crescimento vegetal influenciam nos processos fisiológicos das plantas sob os aspectos de desenvolvimento e crescimento das plantas, a depender da classe em que está inserido. O ácido naftalenoacético e o ácido indolbutírico fazem parte das auxinas e atuam na divisão, crescimento e diferenciação das células estimulando a emissão de primórdios radiculares e formação de raízes adventícias, principalmente em dose ótima dos fitorregulares (MELO, 2002; JORDÁN; CASARETTO, 2006).

Na Tabela 4, a partir do teste de médias, verifica-se que houve diferença estatística entre os fitorreguladores, porém não houve diferença entre as doses do mesmo fitorregulador para as variáveis Número de Raízes (NR) e Número de Folhas (NF). No entanto, os efeitos de ANA na

concentração de 1 μM promoveu um maior número de raízes (12,80), porém quando se duplica essa dose (2 μM) há uma redução no número de raízes (11,42). Para a variável número de folhas houve diferença estatística entre os fitorreguladores, destacando-se o AIB que promoveu os maiores valores médios de número de folhas. No que tange o tamanho da raiz maior, não houve diferença estatística entre os reguladores para esta variável e tampouco entre as doses de cada fitorregulador. Todavia, ressalta-se que 0,25 μM ANA proporcionou maiores valores de tamanho de raiz (1,78 cm) e ao aumentar as doses houve uma diminuição no tamanho da raiz maior. Este efeito está relacionado ao fato de que a auxina induz os primórdios radiculares e se mantida em concentração elevada reduz o crescimento das raízes. Já o AIB estimulou os maiores tamanhos de raiz (1,98 cm) na concentração de 2 μM , sendo uma concentração acima do desejável para induzir o maior número de raízes comparado ao ANA.

Tabela 4 – Teste de médias para a interação das doses dos fitorreguladores nas as variáveis número de raízes, número de folhas e tamanho da raiz maior

Concentração ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	NR		NF		TRM	
	AIB	ANA	AIB	ANA	AIB	ANA
0,00 (§)	0,85 \pm 0,50	0,85 \pm 0,50	1,20 \pm 0,28	1,20 \pm 0,28	1,60 \pm 0,27a	1,60 \pm 0,27a
0,25	0,72 \pm 0,76b	7,40 \pm 0,75a	1,28 \pm 0,48a	0,76 \pm 0,22b	1,08 \pm 1,00a	1,78 \pm 0,31a
0,50	0,52 \pm 0,33b	9,96 \pm 2,38a	1,20 \pm 0,20a	0,40 \pm 0,35b	1,72 \pm 0,98a	1,58 \pm 0,18a
1,00	1,04 \pm 0,62b	12,80 \pm 1,75a	1,00 \pm 0,00a	0,25 \pm 0,19b	1,72 \pm 0,44a	1,28 \pm 0,21a
2,00	2,30 \pm 0,66b	11,42 \pm 2,71a	0,85 \pm 0,25a	0,36 \pm 0,38b	1,98 \pm 0,68a	1,18 \pm 0,29a
β_0	0,5642*		1,294**			
β_1	0,573*		-0,296**			
β_2	n.s.		n.s.			
R ²						

Onde: (§) valores oriundos da testemunha. NR: número de raízes; NF: número de folhas; TM: Tamanho da raiz maior. AIB: ácido indolbutírico; ANA ácido naftalenoacético. Fonte: Autora (2023)

Para uma produção de mudas homogênea, visando a produção em escala comercial, a emissão de raízes em maior número e comprimento é fator importante, pois um sistema radicular bem formado favorece a absorção de nutrientes e água (SILVA et al., 2019). O contato entre a superfície da raiz e o solo é fundamental para a absorção efetiva de água, dado que esse contato proporciona a área de superfície necessária para a absorção de água, o qual é maximizado pelo crescimento das raízes no solo (TAIZ et al., 2017). Por outro lado, o maior número de folhas resulta em maior produção fotossintética (TELES, 2020).

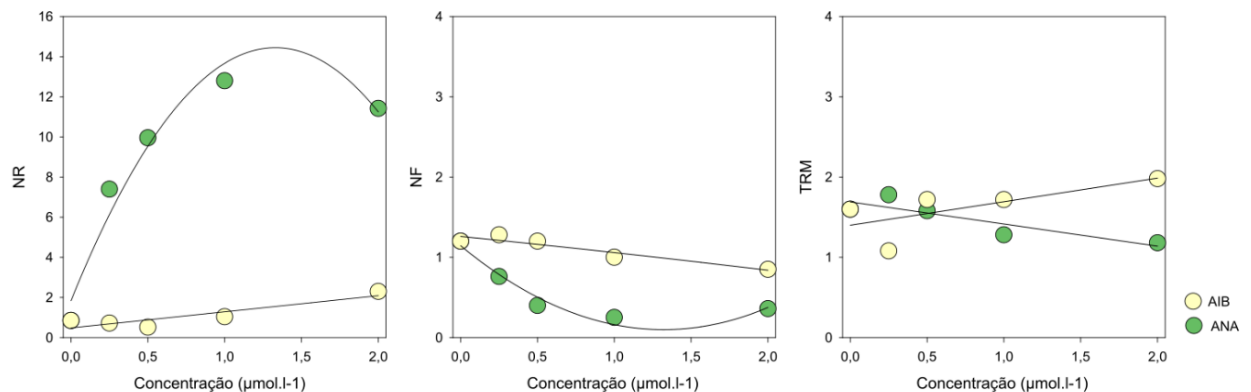
Em pesquisas realizadas por Ramos et al (2014), explantes (gemas axilares e apicais) da

cultivar Kutiravally de *P. nigrum* inoculados em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS e concentração de 0,5 μM de ANA e 40 g L^{-1} de sacarose proporcionou maior número de raízes (9,09).

Para mesma cultivar, fez-se necessário o uso de 5,0 μM de AIB e 40 g L^{-1} de sacarose para se obter o maior valor médio de número de raízes de 4,90 (RAMOS et al., 2014). Estes resultados corroboram o presente estudo, considerando que o regulador ANA propicia maiores valores médios de número de raízes em explantes de pimenteira-do-reino quando comparado ao AIB.

No gráfico de regressão (Figura 7), é possível observar que para o fitorregulador ANA é causado a diminuição do número de raízes quando duplicado a dose de 1 μM para 2 μM , o mesmo ocorre para a variável tamanho da raiz maior. Já o comportamento das doses do AIB em relação a variável número de raízes ocorre de maneira diretamente proporcional, haja vista que ao se elevar as doses também é elevado os valores da variável.

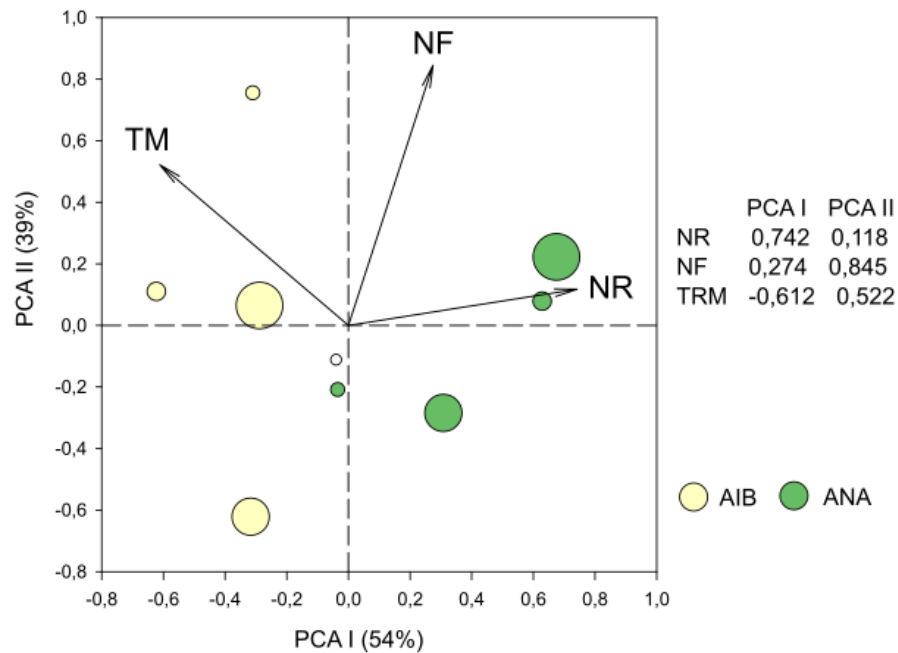
Figura 7 – Gráfico de regressão dos efeitos das doses dos fitorreguladores nas variáveis número de raiz, número de folhas e tamanho da raiz maior.



NR: número de raízes; NF: número de folhas; TM: Tamanho da raiz maior. AIB: ácido indolbutírico; ANA ácido naftalenoacético. Fonte: Autora (2023).

No diagrama, a seguir (figura 8) está reunido as múltiplas variáveis correlacionadas neste ensaio, o primeiro componente positivo refere-se ao número de raízes que está fortemente relacionado as doses de ANA, o segundo componente tem os maiores comprimentos de raízes, porém em menor quantidade relacionado ao AIB e o terceiro, componente é o número de folhas relacionado ao ANA, porém bem próximo ao AIB demonstrando que as diferenças entre essas variáveis são baixas.

Figura 8 – Diagrama de ordenação das doses dos fitorreguladores



Onde: NR: número de raízes; NF: número de folhas; TM: Tamanho da raiz maior. AIB: ácido indolbutírico; ANA ácido naftalenoacético. Fonte: Autora (2023)

6. CONCLUSÕES

No processo de germinação de sementes de pimenteira-do-reino in vitro há diferença do tempo da germinação à formação de planta de acordo com a posição de inoculação entre os genótipos, com destaque para o genótipo Iaçará inoculados na posição horizontal para obtenção de plantas.

No enraizamento de explantes de pimenteira-do-reino há diferença de efeito entre os fitorreguladores, destacando-se o ANA na concentração de 1 μ M pelo maior número de raízes.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F. C.; CONDURÚ, J. M. P. **Cultura da pimenta do reino amazônica**. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Norte- IPEAN, v. 2, n. 3, 1971.149 p. Disponível em embrapa.br. Acesso em 19 fev. 2023

ALIXANDRE, R. D.; BERNABE, J.; CATEM, D.; F. G. H.; MACETTE, H.; JACOMINO, G. D. L. **Contextualização da cultura da pimenta-do-reino no Brasil**. Editora Científica Digital, Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil, v. 5, cap. 10, 2022. Disponível em: [Contextualização da cultura da pimenta-do-reino no Brasil](#). Acesso em 19 fev. 2023

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Embrapa Amazônia Oriental, 1ed. 2002,16p. Disponível em: [Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. \(embrapa.br\)](#). Acesso em 21 mar. 23

ANDRIANA, Y.; XUAN, T. D.; QUY, T. N.; TRAN, H. D.; LE, Q. T. Biological activities and chemical constituents of essential oils from Piper cubeba Bojer and Piper nigrum L. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1876, 2019. Disponível em: mdpi.com. Acesso em 20 fev. 2023

BERGO, C. L.; SILVA, R. C. D.; OHLSON, O. D. C.; BIASI, L. A.; PANOBIANCO, M. Luz e temperatura na germinação de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 170-176, 2010.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2010. 383 p. Disponível em: [Biotechnology vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética - Jorge M. Canhoto - Google Livros](#). Acesso em 28 mar. 2023

CARVALHO, J. M. F. C.; ROCHA, R. W. C. **Curso de cultivo de tecidos vegetais**. Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 24 p. Disponível em: [Doc 157.p65 \(embrapa.br\)](#). Acesso em: 23 mar. 2023

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Explante, meio nutritivo, luz e temperatura**. In: CID, L. P. B. Cultivo de plantas in vitro. 4ª ed. Brasília, DF: Embrapa 2015

CHADDAD JUNIOR, J. **Influência de fitoreguladores na micropropagação da pimenteira-do-reino (Piper nigrum L.)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 1995. doi:10.11606/D.11.2018.tde-20181127-155814. Disponível em: [Influência de fitoreguladores na micropropagação da pimenteira-do-reino \(Piper nigrum... \(usp.br\)](#). Acesso em: 27 mar. 2023

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, É. D. P. Desinfestação e germinação in vitro de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, p. 633-642, 2004. Disponível em: [SciELO - Brasil](#). Acesso em 01 março 2023

COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) in vitro e ex vitro. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.1, p. 38-48, jan./fev., 2001. Disponível em: [embrapa.br](#). Acesso em 26 fev. 2023.

COPELAND, L. O.; MCDONALD, M. B. Seed germination. **Principles of Seed Science and Technology**, p. 59-110, 1999. Disponível em: [Germinação de Sementes | Springer](#). Acesso em 01 março 2023

COSTA, T. T. A.; LEMOS, O. F.; NEVES, C. D. O.; RIBEIRO, A.; PIRES, G. Obtenção de plântulas in vitro a partir de sementes do genótipo Panakota de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 23., 2019, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019

DUARTE, M. L. R.; POLTRONIERI, M. C.; CHU, E. Y.; OLIVEIRA, R. F.; LEMOS, O. F.; **A cultura da pimenta-do-reino**. 2. ed. rev. amp. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 73 p. Disponível em: [embrapa.br](#). Acesso em: 25 fev. 2023

IBGE, Produção de pimenta do reino, 2023. Disponível em: [Produção de Pimenta-do-reino no Brasil | IBGE](#). Acesso em 19 fev. 2023

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Commodities by country, 2023. Disponível em [FAOSTAT](#). Acesso em 25 fev. 2023.

HOMMA, A. K. O. **A imigração japonesa na Amazônia: sua contribuição ao desenvolvimento agrícola**. 2. ed. – Brasília, DF : Embrapa, 2016. 255 p. Disponível em: [embrapa.br](#). Acesso em 25 fev. 2023

JORDÁN, M.; CASARETTO, J. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. **Fisiología Vegetal**, p. 1-28, 2006.

JOSHI, D. R.; SHRESTHA, A. C.; ADHIKARI, N. A review on diversified use of the king of spices: *Piper nigrum* (black pepper). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 10, 2018. Disponível em: [researchgate.net](#). Acesso em 19 fev. 2023

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

LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. D. M.; MENEZES, I. C.; MONDIN, M. Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino. In:

WORKSHOP DA PIMENTA DO REINO DO ESTADO DO PARÁ, 1., 2009, Belém, PA. Situação atual e alternativa para a produção sustentável. Belém, PA: **Workshop**. Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. D. M.; MENEZES, I. C.; MONDIN, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em associação com as técnicas de biotecnologia**. Embrapa Amazônia Oriental, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa>. Acesso em 25 fev. 2023

LEMOS, O. F.; RODRIGUES, S. M.; BOTH, J. P. C. L.; ARAÚJO, S. M. B.; POLTRONIERI, M. C. Aspectos morfológicos de crescimento e produção de cultivares de pimenteira-do-reino em tutor sustentável de glirícidia na mesorregião do Baixo Tocantins–Pará. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 13, p. e399111335596-e399111335596, 2022. Disponível em: [Research, Society and Development \(rsdjournal.org\)](https://www.rsdjournal.org). Acesso em 25 fev. 2023

LEMOS, O. F.; SANTOS, L. R. R.; MORAES, F.; CAMPELO, M., RODRIGUES, S. D. M.; MENEZES, I. C. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

MELO, N. F. **Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal**. Embrapa Semiárido, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Petrolina, PE. 2002. 18p.

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

MORAES, F.; LEMOS, O. F.; PINHEIRO, H. A.; SANTOS, L. R. R., POLTRONIERI, M. Efeito de GA₃ na germinação *in vitro* de sete cultivares de pimenteira-do-reino. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. **Anais**. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012

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

NEVES, C. D. O.; LEMOS, O. F.; RIBEIRO A.; COSTA, T.; PIRES, G. Obtenção de plântulas *in vitro* de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) a partir de sementes de cruzamento intraespecífico. *In*: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 23., 2019, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2019. (2019).

NEVES, C. R. O.; PIRES, G. T. Germinação *in vitro* de sementes híbridas de pimenteira-do-reino. *In*: IV CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS - COINTER, 2019, Recife. **Anais do IV Congresso Internacional das Ciências Agrárias - COINTER**, 2019.

POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. D. M.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; BOTH, J. P. C. L. **Estado da arte do melhoramento genético de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) na Embrapa Amazônia Oriental**. Embrapa Amazônia Oriental, 1^a ed. 2020.

RAMOS, G. K.S.; LEMOS, O. F. OLIVEIRA, H. S. RODRIGUES JÚNIOR, O. M.; MENDONÇA, D. P.; SOUZA, N. C. *Ex vitro* rooting of three black pepper cultivars. **Revista Ciência Agrícola**, v. 19, n. 2, p. 165-173, 2021. Disponível em [Revista Ciência Agrícola \(ufal.br\)](http://ufal.br). Acesso em 19 fev. 2023

RAMOS, G. D. S.; LEMOS, O. F.; CASTRO, G. L. S.; SANTOS, L. R. R. Auxina e sacarose na rizogênese *in vitro* de pimenteira-do-reino. (2014). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18.; SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2., 2014, Belém, PA. **Anais**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

RAMOS, G. D. S.; LEMOS, O. F.; SANTOS, L. R. R.; CASTRO, G. L. S.; PORTAL, R. K. V. P. (2014). Enraizamento *in vitro* de *Piper nigrum* L. em diferentes concentrações de AIB e sacarose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 3., 2014, Santos. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2014.

REIS, É. S.; PINTO, J. E. B.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160-167, 2008. Disponível em: [Redalyc](http://redalyc.org). Acesso em: 26 fev. 2023

RIBEIRO, A. AC. M.; PIRES, G. T. **Meio de cultura para germinação *in vitro*, clonagem de plantas e indexação de quatro genótipos de pimenteira-do-reino**, 2019. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Federal Rural da Amazônia, 43p.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, p. 525-550, 2009. Disponível em; [SciELO - Brasil - Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal](http://SciELO-Brasil-Meristemas-fontes-de-juventude-e-plasticidade-no-desenvolvimento-vegetal) [Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal](http://SciELO-Brasil-Meristemas-fontes-de-juventude-e-plasticidade-no-desenvolvimento-vegetal). Acesso em 23 mar. 2023

SANTOS, M. S.; CABRAL, L. D. P.; OKA, J., ATROCH, E.; CHAVES, F. Germinação de sementes de *Piper marginatum* Jacq. em função do tipo de luz e desenvolvimento das plantas em diferentes substratos. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EMBRAPA AMAZONIA Oriental, **Anais**, Brasília, DF. 2018

SILVA, K. B. D.; REINIGER, L. R. S.; RABAIOLLI, S. M. D. S.; STEFANEL, C. M.; SILVA, L. D. D. Rizogênese *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, v. 29, p. 1282-1295, 2019. Disponível em: Acesso em: 26 fev. 2023

SILVA, V. T., TAKEARA, R., & ÁVILA, M. D. S. N. Aspectos da produção de mudas de óleo elétrico (*Piper callosum*) por estaquia. **Rev Bras Plantas Med/Braz J Med Plants**, v. 21, p. 68-72, 2019.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 103-116, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAKOOREE, H.; AUMEERUDDY, M. Z.; RENGASAMY, K. R.; VENUGOPALA, K. N.; JEEWON, R.; ZENGIN, G.; MAHOMOODALLY, M. F. A systematic review on black

pepper (*Piper nigrum* L.): from folk uses to pharmacological applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. supl, p. S210-S243, 2019. Disponível em [tandfonline.com](https://www.tandfonline.com). Acesso em 19 fev. 2023

TELES, G. C. **Avaliação fisiológica e crescimento de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) com diferentes lâminas de irrigação**. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2020.

TREMACOLDI, C. R.; DUARTE, M. **Viroses da pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental- CPATU, 1ª ed. 2006.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Embrapa Amazônia Oriental, 1ª ed. 2010. Disponível em: [Doc.367-1CAPA \(embrapa.br\)](https://www.embrapa.br/doc/367-1CAPA). Acesso em 21 mar. 23

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ABULQUERQUE, C. C.; CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 7, p. 86-91, 2010.