II Congresso Internacional das Ciências Agrárias COINTER - PDVAgro 2017

ÁCIDONAFTALENOÁCETICO NA RIZOGÊNESE E BENZELAMINOPURINA NA INDUÇÃO DE BROTO DE GENOTIPOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*PIPER NIGRUM L.*) EM CULTIVO *IN VITRO*

Apresentação: Comunicação Oral

Gleyce Kelly Sousa Ramos¹; Danielle Pereira Mendonça²; Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva³
Caroline da Silva Ferreira⁴; Oriel Filgueira de Lemos⁵

Resumo

A cultura da pimenteira-do-reino é originada da Índia que tem seu cultivo difundindo principalmente nas regiões tropicais e que se adaptou a essas regiões principalmente pelo clima, no Brasil a região norte é detentora da maior produção da cultura. A cultura de tecidos é uma ferramenta para auxiliar na propagação de espécies vegetais, e para o sucesso dessa técnica protocolos devem ser definidos, como uso de substâncias no meio de cultura, entre elas os reguladores de crescimento, dessa forma O objetivou-se verificar o comportamento da pimenteira-do-reino sobre influência do ANA e BAP. Substâncias reguladoras de crescimento são essenciais para o desenvolvimento in vitro de pimenteira-do-reino. As doses 0,5 mg L⁻¹ proporcionou maior taxa de crescimento da parte aérea. Para o desenvolvimento de raízes nas condições estudadas a doses de 0,05 mg L⁻¹ de ANA proporcionou melhores resultados..

Palavras-Chave: Cultivo in vitro, Fitoreguladores, propagação de espécies.

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper Nigrum L.*) é uma cultura perene cultivada em regiões tropicais e neotropical, tendo seu centro de origem na Índia (ALBUQUERQUE e CONDURÚ, 1971; JARAMILLO; MANOS, 2001).

Sua importância economia, principalmente na região norte que detém a maior produção da especiaria, está ligada por ser um produto por meio do qual o produtor conseguiu aumentar a renda familiar, devido altos preços alcançando no mercado local, nacional e internacional; a espécie é cultivada principalmente por pequeno produtor sendo a cultura de grande importância para aos mesmo. É cultura que absorver grande quantidade de mão-de-obra no campo e fixadora do homem

¹ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, daniellepereiraam@gmail.com

² Doutoranda em produção vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, gleyceramos17@yahoo.com.br

³ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, fernanda_bernaldo@hotmail.com

⁴ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, carolinesferreiras@gmail.com

⁵ Pesquisador, Embrapa Amazônia Oriental, oriel.lemos@embrapa.br

no campo, tendo um caráter social ligado a cultura também (Duarte, 2004).

A pimenteira-do-reino pode ser propagada por via vegetativa ou sexuada, através de métodos convencionais de propagação ou por meio de métodos biotecnológicos que permitem acelerar o processo de propagação da espécie, no caso a micropropagação ou cultivo *in vitro*. O cultivo *in vitro* de plantas, apresenta importância prática na área agrícola e científica, despertando interesse, entre outros fatores por acelerar métodos de propagação convencionais e por permitir obter material livre de patógenos (BARRUETO CID e TEIXEIRA, 2010).

Os meios de cultivo controlam em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro*, fornecendo condições ideais para a conversão dos explantes em plântulas, as quais tem caráter clonal embutido em sua natureza (BARRUETO CID e TEIXEIRA, 2010), baseado também na totipotencialidade celular. Vários fatores estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração *in vitro*, além do meio de cultura, entre estes podemos citar os reguladores de crescimento, a fonte de carbono, a iluminação, o tipo e idade do explante e etc. (ZHANG et al., 2003). A adição de reguladores de crescimento é essencial na cultura de tecidos, a classe mais usada são as auxinas e citocininas.

A classe do fitoregulador de crescimento usada é escolhida de acordo com a morfogênese desejada. As auxinas são em geral usadas para o desenvolvimento de raízes adventícias, nós e indução de calos, concentrações baixas de auxina são necessários para o alongamento da raiz, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão (Carvalho et al., 2006 e Taiz e zeiger, 2009), o ANA (ácido naftalenoácético) é geralmente usado para indução de raízes *in vitro*.

As citocininas estão ligadas a divisão celular é comumente usada para a promover o crescimento dos brotos, em concentrações elevadas promovem à formação de brotos e inibindo a rizogênese, promovendo o desenvolvimento das gemas axilares (Carvalho et al., 2006 e Taiz e zeiger, 2009), entre as citocininas comumente usada na cultura de tecidos está o BAP (6-benzilaminopurina). O objetivo desse estudo foi verificar o comportamento da pimenteira-do-reino sobre influência do ANA e BAP.

Fundamentação Teórica

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

forneem as condições necessárias para a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas, as quais têm o caráter clonal embutido em sua natureza. Além do meio nutritivo, vários fatores estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração, como: tipo de meio básico de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, tipo de explante etc. Porém, se o meio nutritivo não for adequado em virtude de alguns de seus nutrientes, a obtenção de plântulas clones pode falhar (ZHANG et al., 2003). Em trabalhos realizados por Matheus e Rao (1984) com pimenteira-do-reino, os explantes provenientes de segmentos de hipocótilo, gemas axilares e ápice caulinar, permitiram a formação de calos em meio de cultura contendo uma larga combinação de auxina-citocinina. Além disso, os ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* diferenciaram múltiplas brotações em meio MS contendo os reguladores de crescimento ácido 3-indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP) (1 mg L⁻¹ de cada) e enraizaram em meio com a metade da concentração de sais MS com 0,2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). Assim, a cultura de tecidos mostra-se uma técnica de fundamental importância, tanto no melhoramento genético de plantas, como na obtenção de plantas saudáveis, sendo de grande interesse na obtenção em larga escala de mudas geneticamente idênticas que darão origem à plantas com características superiores. No entanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é crucial, pois esta é a maior limitação na aplicação da moderna biotecnologia para melhoramento vegetal (BARBOSA, 2002).

Metodologia

O experimento foi conduzido no laboratório de recursos genéticos e biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, gemas do genótipo Guajarina proveniente do cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino serviram como explante para a instalação do experimento. Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS (Murashigue e Skoog, 1962) suplementado com diferentes combinações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹) ou ANA (0; 0,05; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de ANA), antes da autoclavagem (121 °C por 20 min.) o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e solidificado com phytigel a 0,2 g. Mantidos em sala de crescimento por um período de seis semanas, com condições controladas de temperatura (25 ± 3 °C), fotoperíodo de 16 h. e intensidade luminosa de 3.000 lux.

Foram realizadas avaliações quanto ao número de folhas, número de gemas, massa seca do caule e da gema (g), e tamanho do broto (cm) para explantes cultivados em meio de com BAP; e número e comprimento de raiz (cm); massa seca da raiz e parte aérea (caule e folha). O número de folhas foi obtido a partir da contagem direta, considerando-se o total de folhas completamente expandidas. Para a contagem direta de gemas e raízes foram considerados os valores iniciais mais

aquelas emitidas aos 45 dias. O comprimento da maior raiz foi medido na região compreendida entre o coleto da planta e o ápice radicular mais distante. O comprimento do broto foi medido na região compreendida entre o coleto e a gema apical do caule. Essas mensurações foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital (precisão de 0,01 mm). As plantas foram seccionadas e separadas em raiz, caule e folhas para as respectivas pesagens de massa fresca (MF) e massa seca (MS). Após a pesagem, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel Kraft e levado para estufa de ventilação forçada a 65 °C, até atingirem massa seca constante.

Foi realizada análise estatística 7.7 beta (SILVA, 2009) para análise de variância e comparação doses de BAP ou ANA com as variáveis estudadas e aplicado o teste Tukey a nível de 5% de probabilidade. Análise de regressão também foi usada para verificar o comportamento dos dados em relação as doses de BAP ou ANA. Os dados para número de brotos, folhas e raízes; tamanho do broto e de raízes foram transformados em $\sqrt{x+1}$. Massa seca (raiz e parte aérea) foram transformadas em $\sqrt{x+0,5}$.

Resultados e Discussão

Na tabela 1, explantes de pimenteira-do-reino cultivados in vitro sobre diferentes doses de BAP (0; 0,5; 1;0 e 5;0 mg L⁻¹) para analisar o crescimento da parte aérea através das variáveis número de folhas e gemas, massa seca das folhas e gemas (g), e tamanho do broto (cm).

Para a variável número de folhas, as doses 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ responderam significativamente com os maiores valores médios (2,12 e 2,23 respectivamente). Já para o número de gemas, as distintas doses não apresentaram valores estatísticos diferentes. A biomassa das folhas não apresentou diferença estatística nas doses de BAP avaliadas. A dose 0,5 mg L⁻¹ apresentou o maior valor médio de massa seca do caule (0,743 g), assim como para o tamanho do broto, em que o maior valor médio obtido foi 2,6 (cm).

Os dados apontam que a doses de 0,5 mg L⁻¹ foi mais eficiente nas condições estudadas para o desenvolvimento da parte em pimenteira do reino, resultados este corroboram com Moura et al., (2008) onde ápices caulinares da pimenteira-do-reino responderam melhor a formação de novas brotações na dose de 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Tabela 1: Médias da massa seca da folha e caule; número de folhas e gemas; e tamanho do broto de pimenteira-do-reino cultivado in vitro em diferentes doses de BAP. Fonte: Própria

	Numero		Massa seca (g)		Tamanho do Broto (cm)
	Folhas	Gemas	Folha	Caule	
BAP 0 mg L ⁻¹	1,64 b	1,82 b	0,719 a	0,717 c	1,39 b
BAP 0,5 mg L ⁻¹	2,12 a	2,06 a	0,715 a	0,743 a	2,6 a
BAP 1,0 mg L ⁻¹	2,23 a	1,89 ab	0,737 a	0,735 ab	1,49 b
BAP 5,0 mg L ⁻¹	1,56 b	1,66 b	0,716 a	0,728 bc	0,91 c

CV (%)	12,5	13,08	3,03	1,59	26,21
--------	------	-------	------	------	-------

O comportamento *in vitro* do genótipos Guajarina de pimenteira-do-reino mantidas em meio de cultura com diferentes doses do regulador de crescimento BAP, foi explicado através do modelo matemático do segundo grau, expresso por meio de um gráfico do tipo parábola para as variáveis estudadas: número de folhas, número de gemas e tamanho do broto (Figura 1) e para biomassa da parte aérea, representada por folhas e caule (Figura 2).

Análise realizada para o número de folhas, permitiu a obtenção de curva do tipo parábola e através disse estimar valores máximos em função das diferentes doses de BAP, nas condições estudadas o valor máximo estimado para número de folhas foi de 5,37 em uma dose estimada de 2,43 mg L⁻¹ de BAP. O número de gemas máximo obtido foi estimado através da análise de regressão, ajustada aos dados, sendo o valor o 3,23 em uma dose estimada de 2,18 mg L⁻¹ de BAP, ao suplementar o meio de cultura com concentrações maiores do regulador de crescimento BAP, houve um declínio do número de gemas/broto obtida. Em relação ao tamanho do broto, de acordo com a equação do segundo grau que foi eficiente para explicar os dados, o maior valor estimado do tamanho foi de 1,54 (cm) para uma dose de mg L⁻¹ 1,88 de BAP, doses mais elevadas que esta causou uma redução no crescimento (Figura 1).

A regeneração de *Piper longum* L *in vitro* requereu uma dose de 1,5 mg L⁻¹ de BAP para uma maior taxa de multiplicação proporcionando maior quantidade de broto/planta e comprimento dos brotos (PADHAN, 2015), já na micropropagação de *Piper nigrum* a doses que ofereceu maior proliferação de brotos e comprimento foi 0,5 de BAP, como os dados mostram.

Figura 1: Desenvolvimento de pimenteira-do-reino *in vitro* submetido a diferentes doses de BAP. Fonte: Própria

O acúmulo de massa seca na parte aérea da pimenteira-do-reino cultivada *in vitro* foi explicada por meio de uma equação do segundo grau, resultados de maior biomassa acumulada para folha e caule foi 0,052 e 0,064 nas doses de 0,25 e 0,26 mg L⁻¹ de BAP, ao suplementar o meio de cultura com doses mais elevadas que a descrita de BAP, houve um menor acúmulo de massa seca possivelmente devido ao efeito de toxidez provocado por doses elevadas do regulador de crescimento.

Figura 2: Crescimento de pimenteira-do-reino *in vitro* submetido a diferentes doses de BAP. Fonte: Própria

O número de folhas, número de gemas, tamanho do broto e massa seca (g) apresentaram um comportamento semelhante em função das concentrações do regulador de crescimento, as variáveis alcançaram um valor máximo até a dose ótima, a partir de então, declinaram à medida que a concentração do regulador aumentou, essa queda pode ter sido em função do excesso de regulador de crescimento, isso pode ser devido à característica dos reguladores de crescimento que atuam em baixa concentração (TAIZ e ZEIGER, 2009; BARRUETO CID e TEIXEIRA, 2010).

Para uma maior produção de mudas de distintas culturas, doses de BAP são requeridas, assim como para a propagação de pimenteira-do-reino. Na micropropagação de *Ipomoea batatas*, doses de BAP foram necessárias para o cultivo *in vitro* (FOLRES, 2015).

Tabela 2: Médias do número de raiz e tamanho de raiz; massa seca da raiz e parte aérea de pimenteira-do-reino cultivado *in vitro* em diferentes doses de ANA. Fonte: Própria

	Número de raiz	Tamanho da raiz (cm)	Massa seca da raiz (g)	Massa seca da parte aérea (g)
ANA 0 mg L ⁻¹	1,71 c	1,59 a	0,719 a	0,708 b
ANA 0,05 mg L ⁻¹	3,22 a	1,46 b	0,716 ab	0,718 a
ANA 0,10 mg L ⁻¹	2,47 b	1,37 b	0,718 ab	0,717 a
ANA 0,50 mg L	3,05 a	1,39 b	0,713 b	0,709 ab
CV (%)	22,69	8,82	1,04	1,24

A rizogênese foi estimulada por meio do cultivo *in vitro* de pimenteira-do-reino sobre

diferentes doses ANA, para o número de raiz as doses 0,05 e 0,50 mg L⁻¹ de ANA apresentaram maiores médias, diferindo-se dos demais tratamentos, mas a dose de 0,05 mg L⁻¹ de ANA apresentou maior valor médio. O tamanho da raiz (cm) na dose de 0 mg L⁻¹ de ANA (testemunha) apresentou com maior valor médio de 1,59 cm, e este tratamento diferiu-se estatisticamente das demais (Tabela 2).

Para análise de massa seca da raiz a dose de 0,05 mg L⁻¹ de BAP apenas a testemunha (0 mg L⁻¹ de ANA) apresentou menor média diferindo-se estatisticamente das doses: 0,05 e 0,10 mg L⁻¹ de BAP. Em contrapartida, a massa seca da parte aérea na dose 0 mg L⁻¹ de ANA proporcionou maior valor médio estimado (0,719), diferindo-se das demais doses, e a medida que o meio de cultura foi suplementado com doses mais elevadas de ANA o acúmulo da biomassa reduziu (Tabela 2). Concentrações de auxinas mínimas são requeridas para a rizogênese, mas é inibido em concentrações que favoreçam o crescimento da parte aérea (concentrações um pouco mais elevadas) (TAIZ e ZEIGER, 2009), isso explica o desenvolvimento da parte aérea em concentrações mais elevadas, onde a rizogênese é inibida. O uso do ANA no cultivo in vitro de batata também favoreceu o crescimento de raiz e parte aérea, segundo Rezende et al., (2013).

Com a suplementação do meio de cultura com ANA, um regulador da classe das auxinas, permitiu o desenvolvimento de folhas e do sistema radicular (Figura 3). Maior valor máximo (1,36) para o desenvolvimento das folhas foi na dose de 0,05 mg L⁻¹ de ANA, que teve seu comportamento representado por uma função quadrática decrescente, onde maiores concentrações do regulador de crescimento proporcionaram uma redução do número de folhas/broto.

A rizogênese teve seu comportamento explicado por uma função polinomial do segundo grau representado em forma de parábola (Figura 3), proporcionando maior valor 15 raízes/brotos na dose estimada de 0,26 mg L⁻¹ de ANA. O comprimento máximo das raízes foi de 2,61 (cm) em uma dose estimada de 0,25, esta por sua vez representada no gráfico por meio de uma função decrescente. Vieira et al., (2014), verificaram que o ANA também foi essencial para o desenvolvimento de raiz em alho, como nossos demonstram que é necessário na micropropagação de *Piper nigrum*.

Figura 3: Desenvolvimento de pimenteira-do-reino in vitro submetido a diferentes doses de ANA. Fonte: Própria

A figura 4, representa o acúmulo da massa seca na raiz e na parte aérea (caule + folhas), a função quadrática do segundo grau foi eficiente para explicar o comportamento da pimenteira-do-reino cultivada *in vitro* sob diferentes dosagem de ANA, e está representado através de uma parábola. Concentrações menores de ANA proporcionou maior desenvolvimento do sistema radicular, confirmado isso através do maior acúmulo de biomassa na raiz do que na parte aérea., como pode ser visualizado no gráfico abaixo. O maior valor máximo estimado para biomassa da raiz foi 0,72 g na dose também estimada de 0,27 de ANA. Já a dose de 0,57 proporcionou maior acúmulo de massa seca na parte aérea de 0,74.

Figura 4: Crescimento de pimenteira-do-reino *in vitro* submetido a diferentes doses de ANA. Fonte: Própria

O uso de substâncias reguladoras de crescimento são essenciais no desenvolvimento *in vitro* de pimenteira-do-reino, e tendo os dados em conjunto observamos que a cultura a pimenta-do-reino necessita de regulador de crescimento para uma melhor morfogênese. Mas o uso de elevadas concentrações dessas substâncias provocam um efeito reverso na morfogênese *in vitro* de

pimenteira-do-reino, resultados estes similares a encontrados por Vieira et al., (2014) na cultura do *Allium sativum* L.

Conclusões

O BAP foi essencial para o desenvolvimento da parte aérea de plantas micropropagadas de pimenteira-do-reino, a dose de 0,5 mg L⁻¹ ofereceu as melhores respostas organogênicas. ANA promoveu a rizogênese em pimenteira-do-reino *in vitro*, a dose de 0,05 mg L⁻¹ proporcionou o maior desenvolvimento de raízes.

Referências

ALBUQUERQUE. F.C.; CONDURÚ. J. M. P. **Cultura da pimenta-do-reino na região amazônica**. Belém: IPEAN. 149p. (IPEAN. Fitotecnia. v. 2. n. 3). 1971.

BARBOSA, F. B. C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.19, n. 3, p.429-449, set./dez. 2002.

BARRUETO CID. L. P.; TEIXEIRA. J. B. Explante, meio de cultivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID (Ed.). **Cultivo in vitro de Plantas**. Brasília. DF: Embrapa informação tecnológica. p. 15-45. 2010.

CARVALHO, J. M. F. C; PIMENTEL, N. W.; AIRES, P. S. R; PIMENTEL, L. W. **Considerações gerais sobre organogênese**. Campina Grande, 2006 26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 150).
DUARTE. M. L. R (Ed). **Cultivo da pimenteira-do-reino na região norte**. Belém. PA: Embrapa Amazônia Oriental. (Sistema de produção. 1). 185 p. 2005.

FLORES, Rejane et al. Otimização da produção de plantas in vitro de cultivares de Ipomoea batatas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.

JARAMILLO M. A; MANOS P.S. Phylogeny and Patterns of Diversity in the Genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, 2001. p. 706-716, n. 88.

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

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

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

PADHAN, Bandana. Regeneration of plantlets of *Piper longum* L. through in vitro culture from nodal segments. **Journal of Applied Biology and Biotechnology** Vol, v. 3, n. 05, p. 035-039, 2015.

REZENDE, R. K. S.; PASQUAL, M.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; MASETTO, T. E. Organogênese in vitro de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1055-1064, maio/jun. 2013.

SILVA, F. de A. S. E; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE. 7. Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER E. Fisiologia Vegetal. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 819 p. 2009.

VIEIRA, R. L.; SILVA, L. A.; ZAFFARI, G. R; FELTRIM; A. L. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 439-445, 2014.

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