II Congresso Internacional das **Ciências Agrárias** COINTER - PDVAgro 2017

MERCAPTOETANOL E BAIXAS TEMPERATURAS NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO DE MERISTEMA DE PIMENTEIRA-DO REINO (PIPER NIGRUM L.) EM CULTIVO IN VITRO

Apresentação: Pôster

Danielle Pereira Mendonça¹; Fernanda Beatriz Bernaldo da Silva²; Gleyce Kelly Sousa Ramos³; Caroline Silva Ferreira⁴; Oriel Filgueira de Lemos⁵

Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pertence à família Piperaceae, é uma planta trepadeira, perene, usada como condimento em todo o mundo e de grande valor econômico. O Brasil é o quinto maior produtor mundial e o Pará é o principal produtor, com cerca de 74% da produção nacional (IBGE, 2016).

Uma alternativa para se obter plantas livres de vírus é a limpeza clonal via cultivo de meristema, pois, as células meristemáticas estão frequentemente em divisão celular e há ausência de vascularização do meristema, o que sugere que o vírus não consegue alcançar essa região. No entanto, existe um fator limitante para estabelecimento, que é a oxidação fenólica que consiste na liberação de compostos fenólicos que promovem o escurecimento do meristema, o que dificulta a sua sobrevivência e consequentemente o estabelecimento deste em cultura (MENDONÇA, et al 2016). O 2-mercaptoetanol, mais conhecido como β -Mercaptoetanol, é um composto químico bastante utilizado para reduzir pontes de dissulfureto e que pode atuar como um antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a percentagem de oxidação de dois genótipos de pimenteira-do-reino por cultivo de meristema em diferentes concentrações do β -Mercaptoetanol sob baixas temperaturas realização de um inventário atual para subsidiar as diferentes etapas do processo de conservação e se, possível, adotar medidas que reduzam as perdas nessa coleção que contém acessos potenciais.

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

² Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, fernanda_bernaldo@hotmail.com

³ Doutoranda em produção vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, gleyceramos17@yahoo.com.br

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

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

Fundamentação Teórica

A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani*, assola as plantações de pimenta-do-reino principalmente pela predisposição genética dos vegetais propagados de forma vegetativa para os plantios comerciais. Ademais, as doenças viróticas (PYMoV e CMV) estão colocando em riscos todas as cultivares, uma vez que todas são susceptíveis. Visando estudos para fortalecimento da pimenteira do reino a tais doenças, a Embrapa Amazônia Oriental possui um banco de germoplasma desse vegetal, o qual visa à conservação e disponibilidade das plantas para melhoramento genético.

Considerando os avanços das viroses em pimenteira-do-reino e susceptibilidades ao PYMoV e CMV, estudos de limpeza clonal estão sendo desenvolvidos em laboratório para a clonagem e limpeza de plantas das cultivares via cultura de meristemas, já que, segundo (Kerbaudy, 2008), o cultivo de meristemas é uma das maneiras mais eficientes para livrar plantas de microorganismos patogênicos endógenos como vírus, micoplasmas, fungos e bactérias, causadores da degenerescência das cultivares.

Metodologia

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental. Em casa de vegetação, foram coletados ápices caulinares de dois genótipos de pimenteira-do-reino (Cingapura e Kuthravally). Após a coleta, os ramos contendo gemas apicais foram cortados em pequenas estacas e imersos em solução de ácido cítrico (50 mM) e encaminhados ao Laboratório para o processo de assepsia e obtenção de meristemas. O processo de assepsia foi dividido de acordo com a temperatura, onde todas as estacas permaneceram imersas nas soluções, em frascos de vidro com capacidade para 300 mL, em gelo seco (± 4 °C) e sem gelo (± 25 °C) até o término do processo e inoculação dos meristemas.

No laboratório, foram realizadas lavagens das estacas em água corrente e detergente neutro, sendo as mesmas imersas em solução de Derosal® (0,1%) durante 20 minutos. Posteriormente, sob câmara de fluxo laminar, as estacas foram imersas em álcool 70% por um minuto e em seguida, em solução de cloreto de mercúrio (0,1%) por 10 minutos, seguidas de cinco lavagens com água destilada autoclavada. Antes dos meristemas serem extraídos para inoculação, as estacas ficaram imersas em solução de sulfato de estreptomicina (antibiótico) durante 20 minutos e por fim, em

solução de mercaptoetanol (antioxidante). Nesta última etapa, a imersão ocorreu em diferentes concentrações de mercaptoetanol (5, 10 e 15 mM) por 60 minutos, sendo cada tratamento representado por 10 explantes com 5 repetições. O delineamento experimental foi fatorial 2 x 2 x 3 (2 temperaturas de incubação na assepsia, 2 cultivares, e 3 doses de β -mercaptoetanol).

Após esse processo de assepsia, os meristemas foram excisados com bisturi sob o auxílio de estereomicroscópio. Os meristemas retirados (≤ 1 mm) foram inoculados em meio de cultura em frascos contendo 5ml de meio básico de cultura MS o qual foi suplementado com BAP (benzilaminopurina) a 0,5 mg.L⁻¹, AIA a 0,2 mg.L⁻¹, sulfato de estreptomicina a 100 mg. L⁻¹, PVP (polivinilpirrolidona) a 100 mg.L⁻¹, solidificado com phytigel a 0,2%, e pH ajustado para 5,8 sendo submetidos a posterior autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os meristemas foram mantidos em ambiente controlado com controle de temperatura (25 $\pm$ 3 °C). Os explantes foram mantidos em fotoperíodo de 16h luz, e após isso foram condicionados no escuro por 15 dias. Passando-se esse período no escuro os explantes voltam a ser acondicionados no foto período inicial de 16h luz. Foram usados 20 meristemas por tratamento. O grau de oxidação foi verificado após uma semana de cultivo, em que O° foi considerado sem oxidação; O* pouca; O** moderadamente e O*** totalmente oxidado. Foi analisada a percentagem de oxidação.

Resultados e Discussão

O genótipo Kuthravally apresentou uma taxa de 4% explantes não oxidados na concentração de 10 mM em 4°C o restante apresentaram 100% de oxidação em todos os tratamentos em ambos genótipos. De acordo com Cid e Teixeira (2010) o estresse causado pela excisão de explantes com o bisturi e associados ao pequeno tamanho dos meristemas isolados, desencadeia a oxidação fenólica que é uma das limitações. O baixo percentual de explantes em desenvolvimento, a partir do meristema, também foi observado por Costa (2015) na multiplicação in vitro de pimenteira-do-reino via cultivo meristema nas cultivares Apra, Bragantina, Kottanadan e Kuthiravally, onde apenas 10% do material inoculado se desenvolveram in vitro.

Após 25 dias de cultivo, meristemas do genótipo Kuthravally apresentaram um aspecto esverdeado claro com aumento de tamanho, caracterizando-se como competentes para a regeneração in vitro. (Figura 1). Diferente de Umadevi et al. (2015) que obtiveram sucessos na regeneração de brotações proveniente de meristema apical de pimenteira-do-reino para produção de mudas na Índia, cujo protocolo proporcionou 40% de sucesso na regeneração do meristema in vitro. Esse processo é importante para a produção massal de plantas elites e conservação da espécie na

região. Resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram que o genótipo influenciou na resposta quanto à oxidação e que a incubação inicial dos explantes também favoreceu o processo de estabelecimento in vitro. O fato do genótipo clonada ter apresentado uma taxa de sobrevivência provavelmente está ligado a maior taxa regenerativa e níveis endógenos de compostos fenólicos em relação ao genótipo Cingapura.

Figura 1 Meristema do genótipo Clonada de pimenteira-do-reino, em diferentes dias após o cultivo in vitro. Fonte: Própria.

Conclusões

O genótipo influencia na regeneração de pimenteira-do-reino e o pré-tratamento térmico reduz a oxidação em meristemas do genótipo Kuthravally. O mercaptoetanol na concentração de 10mM controla a oxidação do meristema de pimenteira-do-reino no estabelecimento da cultura para a micropropagação.

Referências

APHORTESP - <http://aphortesp.com.br/index.php/ct-menu-item-11/12-produtos/73-pimenta-do-reino> acesso (20/07/2016)2000.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; JUDD, H. L.; HARRISONMURRAY, R. S. **Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult to root plant. Plant Growth Regulation**, v. 10, p. 1-11, 2001.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal** - 2ª Ed. 2008.

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

MARTINS, J. P. R.; SCHIMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; SANTOS, B. R.; MAGEVSKI, G. C. **Effect of synthetic auxins on in vitro and ex vitro bromeliad rooting**. Pesquisa Agropecuária Tropical.

McCOWN, B.H. **Adventitious rooting of tissue cultured plants**. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, Portland: Dioscorides Press, 1988. v.2, p.289-302.

PINHO, J. V. da S.; LEMOS, O. F. de; RODRIGUES, S. de M. Estabelecimento de cultura de meristemas de pimenteira-do-reino sob a ação de cisteína e pvp. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA, 14., 2010, Belém, PA. **anais**. Belém, PA.

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