IV CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAgro 2019

EFEITO DE MEIOS DE CULTURA NA GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE GENÓTIPOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO

EFFECT OF CULTURE MEDIA ON *IN VITRO* GERMINATION OF SEED PEPPER GENOTYPE SEEDS

Apresentação: Comunicação Oral

Ana Carolina Melo Ribeiro¹; Gabriela Tavares Pires²; Oriel Filgueira de Lemos³;
Tinayra Teyller Alves Costa⁴; Cinara Rafaela de Oliveira Neves⁵.

DOI:<https://doi.org/10.31692/2526-7701.IVCOINTERPDVAgro.2019.0168>

Resumo

Uma das dificuldades na produção da pimenteira-do-reino é a presença de doenças as quais prejudicam diretamente a produtividade. Novas cultivares têm sido lançadas e métodos eficientes de propagação de plantas estão sendo desenvolvidos para assegurar a qualidade da produção de mudas sadias. A obtenção de plântulas sadias *in vitro* a partir de sementes apresenta-se como alternativa de produzir plantas livres de patógenos na cultura da pimenteira-do-reino. Visando dar suporte ao programa de melhoramento, sementes de 6 genótipos obtidas do programa de melhoramento genético de pimenteira-do-reino foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio básico de cultura MS o primeiro meio foi composto de MS e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2%, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6- benzilaminopurina) e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA (ácido a-naftalenoacético). O segundo meio foi composto de ½ MS (metade da concentração dos macro e micronutrientes do meio básico de cultura MS) e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2 %, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. O terceiro foi composto ½ MS e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg. L⁻¹. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial de 6 x 3. As sementes foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas. As avaliações foram quanto ao tempo de cada estágio da germinação até formação de plântulas. O híbrido Iaçará x Bragantina teve efeito positivo na formação de plântula em menor espaço de tempo comparado com os demais genótipos; não houve

¹ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, carolm.ribeiro95@gmail.com.

² Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, gabrielatavaresp18@gmail.com.

³ Pesquisador, Embrapa Amazônia Oriental, oriel.lemos@embrapa.br.

⁴ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, tinayra.teyller@yahoo.com.br.

⁵ Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, cinara.d.ferreira@gmail.com.

interferência dos meios de cultivo no processo germinativo. A germinação de genótipo de pimenteira-do-reino é possível em meio básico de cultura MS com adição ou não de outros compostos como NaH_2PO_4 0,17 mg. L^{-1} , Carvão ativado a 0,2% e 0,5 mg. L^{-1} de BAP e 0,5 mg. L^{-1} de ANA.

Palavras-Chave: Cultivo *in vitro*, propagação de plantas, *Piper nigrum* L.

Abstract

One of the difficulties in the production of black pepper is the presence of diseases that directly affect productivity. New cultivars have been launched and efficient plant propagation methods are being developed to ensure the quality of healthy seedling production. Obtaining healthy seedlings *in vitro* from seeds presents itself as an alternative to producing pathogen-free plants in the chili plant culture. In order to support the improvement program, seeds of 6 genotypes obtained from the genetic improvement program of black pepper were inoculated in test tubes containing 10 mL of basic MS culture medium. The first medium was composed of MS and Write vitamins, 3% sucrose, NaH_2PO_4 0.17 mg. L^{-1} , activated carbon at 0.2% and phytigel at 0.2%, supplemented with 0.5 mg. L^{-1} of BAP (6- benzylaminopurine) and 0.5 mg. L^{-1} of ANA (a-naphthalene acetic acid). The second medium was composed of ½ MS (half of the concentration of macro and micronutrients of the basic culture medium MS) and Write vitamins, 3% sucrose, 0.17 mg. L^{-1} NaH_2PO_4 , 0.2% activated carbon and 0.2% phytigel, supplemented with 0.5 mg. L^{-1} of BAP and 0.5 mg. L^{-1} of ANA. The third was composed of ½ MS and Write vitamins, 3% sucrose, 0.17 mg NaH_2PO_4 . L^{-1} . The experimental design was entirely randomized with factorial of 6 x 3. The seeds were kept in the growth room under controlled conditions. The evaluations were based on the time from each germination stage to seedling formation. The hybrid Iaçará x Bragantina had a positive effect on the formation of seedlings in a shorter period of time compared to the other genotypes; there was no interference of the culture media in the germination process. Germination of the king pepper genotype is possible in basic MS culture medium with or without addition of other compounds such as NaH_2PO_4 0.17 mg. L^{-1} , activated carbon at 0.2% and 0.5 mg. L^{-1} of BAP and 0.5 mg. L^{-1} of ANA.

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

Introdução

Proveniente da Índia e conduzida para o Brasil para ser cultivada na década de 30 por imigrantes japoneses, a pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) obteve destaque mundial como uma das principais culturas agrícolas cultivadas para exportação, assegurando ao Brasil a sua colocação entre os principais produtores e exportadores mundiais da cultura (DESER, 2008). Além disso, possui elevada importância econômica por ser uma das especiarias mais consumidas no mundo, assim também, por absorver grande quantidade de mão-de-obra e contribuir com a fixação do homem no campo

(DUARTE, 2005; ANDRADE et al., 2017).

A região Norte do Brasil destaca-se por ser a maior produtora e exportadora de pimenta-do-reino (SILVA; BENTES; PENA, 2016). O estado do Pará representou 50% da produção total brasileira (IBGE, 2017). Dessa forma, é evidente a relevância da produção na região para o cenário socioeconômico, no entanto, a produção Brasileira vem decrescendo devido a ocorrência de doenças que reduz seu ciclo produtivo (LEMOS, 2003), especificamente a fusariose e viroses, as quais contribuem com a redução do ciclo de vida da cultura, ocasionando na oscilação de preços do produto devido ao aumento dos custos do processo produtivo (LOURINHO, 2014; MENDONÇA; SILVA, 2019).

A vulnerabilidade genética das cultivares à doença e a acelerada dispersão do patógeno tem cooperado para a redução do ciclo da cultura. Além disso, outro fator que pode influenciar é a técnica de propagação a qual é empregada (LEMOS et al., 2011).

Com isso, a cultura de tecidos surge como uma ferramenta bastante viável para tentar sanar as adversidades relacionadas ao cultivo e produtividade da pimenteira-do-reino, a partir da rápida multiplicação de plantas com atributos agrônômicos superiores e livres de doenças, em larga escala e com tempo reduzido por meio da micropropagação de plantas (MOURA, MENEZES; LEMOS, 2008).

A obtenção de explantes livres de contaminações é um fator que limita a técnica de micropropagação, o qual é importante para a cultura da pimenteira-do-reino por apresentar microrganismos endógenos. Para que o cultivo *in vitro* seja viável, diversos processos para originar plantas doadoras de acessos foram realizados, por meio da germinação *in vitro* para produzir estacas em casa de vegetação ou pela obtenção de embriões zigóticos (LEMOS, 2003).

Visando dar suporte ao programa de melhoramento e propagar plantas sadias, objetivou-se avaliar o comportamento da germinação e formação de plântulas de genótipos de pimenteira-do-reino.

Fundamentação Teórica

A propagação da pimenteira-do-reino pode ser realizada por via vegetativa ou sexuada, por meio de métodos convencionais ou biotecnológicos os quais possibilitam acelerar o processo de propagação, denominado de cultivo *in vitro* ou micropropagação. Segundo Santos, Lemos e Rodrigues (2009), a falta de mudas certificadas tem levado os

agricultores a utilizarem mudas de má qualidade, com consequências preocupantes na formação de pimentais, fadados a ter cada vez mais o ciclo econômico produtivo reduzido.

Novas cultivares têm sido lançadas e métodos eficientes de propagação de plantas estão sendo otimizados para produção de mudas vigorosas em grande proporção, tecnologia esta, pronta para ser adotada por produtores. Há necessidade de métodos eficientes de propagação de plantas vigorosas e sadias das cultivares recomendadas para cultivo visando à revitalização das plantas matrizes (FREIRE, 2013).

A cultura de tecidos é uma técnica com elevado potencial para dar suporte ao programa de melhoramento vegetal. Essa ferramenta proporciona a multiplicação em larga escala, em tempo reduzido e menor área de plantas livres de patógenos e de material elite (RAMOS, 2018). Segundo Lameira et al. (1996) a multiplicação *in vitro* de um explante possibilita a produção de até 1.5000 plantas por ano.

A micropropagação é uma das aplicações das técnicas de cultura de tecidos muito usada na agricultura, tem como objetivo a obtenção de uma planta idêntica à matriz, consiste na utilização de pequenos fragmentos do tecido vivo, denominados de explantes, desinfestados e cultivados assepticamente em um meio de cultivo adequado durante subcultivos definidos (MOURA, MENEZES; LEMOS, 2008).

A metodologia do protocolo depende do controle de diversas variáveis como a assepsia do material proveniente do campo até a aclimatização das plântulas concebidas *in vitro*, além do tipo de explante, dos reguladores de crescimento nas distintas fases (MOURA, MENEZES; LEMOS, 2008).

A composição dos meios de cultura oferece condições essenciais para a transformação dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas, as quais o caráter clonal está embutido em sua natureza. Além do meio nutritivo, outros fatores estão associados para a eficiência de um protocolo de regeneração, como: tipo de meio básico, supressão de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, luz, o tipo de explante e afins. Contudo, se a composição do meio nutritivo não estiver adequada em virtude de algum componente nutritivo, poderá existir falha na obtenção de plântulas clones (ZHANG et al., 2003). Entretanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é fundamental, pois esta é a maior limitação na aplicação da moderna biotecnologia para melhoramento vegetal (BARBOSA, 2002).

Lemos (2018) afirma que a produção de mudas sadias e vigorosas é importante na

conservação e uso de recursos genéticos, sendo a germinação *in vitro* uma alternativa. Em pimenteira-do-reino tem se buscado estabelecer uma metodologia de propagação de plantas *in vitro* para dar suporte à conservação e à produção de mudas a partir de cruzamentos controlados no programa de melhoramento genético.

Com base nisso, os programas de melhoramento genético têm adotado os cruzamentos como alternativa mais apropriada para criação de novos genótipos e maior variabilidade genética (WENZEL, 1985; MENDONÇA; SILVA, 2019).

A partir dos genótipos obtidos via cruzamentos controlados, acompanhar o processo de germinação, que é uma forma de propagação onde busca-se variabilidade genética, e para o estado do Pará, especificamente para pimenteira-do-reino, é uma necessidade devido ao baixo índice de variação nos materiais disponíveis (MENDONÇA; SILVA, 2019), visando o aproveitamento dessas plantas para a multiplicação *in vitro* e avaliação das progêies geradas dentro do programa de melhoramento genético, podendo selecionar combinações desejáveis (SANTOS; LEMOS; RODRIGUES, 2009). De modo a produzir mudas de alta qualidade via cultura de tecidos, fornecendo propágulos sadios e mudas livres de organismos fitopatogênicos (ALVES et al., 2005).

Metodologia

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, apresentando como coordenadas geográficas 01° 27' 21" S e 48° 30' 16" W. Para a germinação, inicialmente foram coletados frutos maduros de plantas de 4 cruzamentos intraespecíficos (Bragantina x Clonada 1, Bragantina x Clonada 2, Iaçarará x Bragantina, Uthirankotta x Bragantina) e duas cultivares (Bragantina e Iaçarará) cultivadas na área experimental da Embrapa Amazônia Oriental. Os frutos inicialmente foram imersos em solução de NaClO 0,5% e colocadas em estufa a 37 °C por 12 horas, após esse período, foram despolpadas e lavadas com detergente neutro. Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, as sementes, obtidas após a maceração dos frutos, foram colocadas em solução fungicidas (nativo a 0,4 % e derosal a 0,2 %) por 20 minutos, em álcool a 70% por 1 minuto e por em solução de NaClO 1 % por 15 minutos, para em seguida serem lavadas em água destilada autoclavada por cinco vezes.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de 3 diferentes

combinações de meio básico de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) (Tabela 1), o primeiro meio (T1), foi composto de MS e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2 %, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6- benzilaminopurina) e 0,5 mg.L⁻¹ ANA (ácido a-naftalenoacético). O segundo meio (T2), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade da concentração dos macro e micronutrientes) MS e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹, Carvão ativado a 0,2% e phytigel a 0,2 %, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6- benzilaminopurina) e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA (ácido a-naftalenoacético). O terceiro (T3), foi composto de meio básico de cultura ½ (metade das concentrações dos macros e micronutrientes) MS e vitaminas de Write, sacarose a 3%, NaH₂PO₄ 0,17 mg.L⁻¹. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, e a autoclavagem foi a 120 °C e 1 atm por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 X 6, três meios de cultura e 6 genótipos de pimenteira-do-reino, num total de 18 tratamentos, e o número de repetições variou de acordo com as sementes disponíveis de cada genótipo provenientes de cruzamentos controlados ou polinização aberta. As sementes foram transferidas para tubo de ensaio, uma por tubo, contendo o meio de cultura, mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura (25 ± 3° C), fotoperíodo de 16h, e luminosidade de 3.000 lux.

As avaliações foram quanto aos dias em que cada genótipo levou em cada etapa do processo germinativo desde a inoculação até a formação de plântulas. Os dados foram submetidos às análises estatísticas por meio do programa SAS University Edition, para teste de comparação não paramétrica de Kruskal-Wallis método de Dunn a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Tratamentos e doses utilizadas.

TRATAMENTO	DOSE*
T1: MS + NaH ₂ PO ₄ + BAP + ANA + C.A	0,17 + 0,5 + 0,5 + 0,2
T2: ½ MS + NaH ₂ PO ₄ + BAP + ANA + C.A	0,17 + 0,5 + 0,5 + 0,2
T3: ½ MS + NaH ₂ PO ₄	0,17

*NaH₂PO₄: dose em g; BAP dose em mg L⁻¹; AIA dose em mg L⁻¹; C.A: dose em ppm.

Resultados e Discussão

No processo germinativo dos genótipos de pimenteira-do-reino estudados neste trabalho, os meios de cultura não apresentaram diferença para a germinação e formação de plântulas, isto é, não teve interferência das distintas combinações meio no processo germinativo, como pode ser observado na figura 1.

Figura 1- De A – C sementes em diferentes fases do processo germinativo com desenvolvimento satisfatório nas distintas combinações de meio de cultivo.

Fonte: autores (2019).

Quanto a formação de plântulas e sobrevivência dos diferentes genótipos (tabela 2), destacou-se Iaçarará (61,9 %) com maior taxa. Em seguida a cultivar Bragantina (35,6%), o híbrido Bragantina x Clonada 2 (31,3%), e com as menores taxas os genótipos Bragantina x Clonada 1 (16,8), Iaçarará x Bragantina (16,7) e Uthirankotta x Bragantina (15%).

Um dos principais fatores que podem influenciar no percentual de sobrevivência está no desaparecimento da viabilidade das sementes, o tempo em que é colocada para germinar, as condições de cultivo e da cultivar utilizada (SANTOS; LEMOS;

RODRIGUES, 2009). De acordo com Pires (2018), é possível que algumas sementes tenham perdido a viabilidade e consequentemente, diferença de germinação entre os genótipos. Além disso, o maior percentual de germinação das cultivares *in vitro* pode ser pelo efeito dos reguladores de crescimento ANA e BAP.

Tabela 2 – Percentagem de sobrevivência DAS (Dias após o semeio), de genótipos de pimenteira-do-reino.

Genótipos	N*	S*	Total Geral	% Sobrevivência
Bragantina	29	16	45	35,6
Bragantina x Clonada 1	16	3	19	16,8
Bragantina x Clonada 2	11	5	16	31,3
Iaçará	8	13	21	61,9
Iaçará x Bragantina	10	2	12	16,7
Uthirankotta x Bragantina	17	3	20	15
Total Geral	91	42	133	31,58

*N: não sobreviveu; S: sobreviveu.

Em relação aos genótipos os quais apresentaram menores percentuais de sobrevivência, observou-se em alguns indivíduos o desenvolvimento interrompido devido a presença de estruturas anormais como observado na figura 2, isso ocorre quando o embrião não é formado ou deteriorado durante a manipulação até a inoculação.

Figura 2 – De A – D desenvolvimento interrompido dos genótipos e formação de estruturas anormais.

Fonte: autores (2019).

Durante o processo germinativo alguns materiais foram contaminados por fungos, contudo, foram em baixos níveis, não influenciando totalmente o nível de sobrevivência ao final do período de germinação.

A primeira etapa da germinação de sementes de pimenteira-do-reino é o intumescimento do embrião, para posteriormente ocorrer todo o processo de diferenciação até formar a plântula. De acordo com as variáveis analisadas (Tabela 3), só foi possível observar dos seis, cinco genótipos o intumescimento. O híbrido Iaçará x Bragantina destacou-se para a variável intumescimento com 12 dias, seguida da cultivar Iaçará com 22 dias após o semeio. Em contrapartida, o genótipo Bragantina levou maior tempo para atingir o intumescimento. Já para a emissão da radícula o híbrido Iaçará x Bragantina respondeu significativamente em relação aos demais genótipos por ter levado menor tempo para emitir.

Há distinção na variável hipocótilo, onde Iaçará x Bragantina levou menor tempo para o lançamento. Para a emissão de raiz, não teve valores estatísticos diferentes entre os genótipos. Em relação as folhas cotiledonares os genótipos Iaçará x Bragantina, Uthirankotta x Bragantina, Bragantina x Clonada 2 e Iaçará são iguais estatisticamente, eles emitiram em menor tempo comparado aos genótipos Bragantina e Bragantina x Clonada 1.

Tabela 3 – Comparação de médias das variáveis estudadas (entumecida, radícula, hipocótilo, raiz, folhas cotiledonares, epicótilo e plântula) para os genótipos.

Genótipos	Entumecida	Radícula	Hipocótilo	Raiz	Folhas		
					Cotiledonares	Epicótilo	Plântula
Bragantina	46 a	48 a	56 a	58 NS	94 a	99 a	120 a
Bragantina x Clonada 1	23 ab	30 a	56 a	73 NS	88 a	117 a	128 a
Bragantina x Clonada 2	24 ab	29 b	32 a	42 NS	67 b	99 a	104 a b
Iaçar	22 b	36 a	45 a	50 NS	67 b	84 a b	103 b
Iaçar x Bragantina	12 b	14 b	26 b	32 NS	50 b	82 a b	87 b
Uthirankotta x Bragantina		30 b	48 a	50 NS	62 b	86 a b	92 b

Obs.: Médias dos genótipos seguidas pela mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn, ao nível de 5% de probabilidade. NS – não significativo.

Na variável epicótilo os genótipos Iaçar x Bragantina, Iaçar e Uthirankotta x Bragantina foram os que emitiram em menor tempo, diferenciando significativamente dos demais, o genótipo Bragantina x Clonada 1 foi o que prolongou-se mais. Para a formação de plântula o genótipo Iaçar x Bragantina foi o que atingiu em menor espaço de tempo, seguido da Uthirankotta x Bragantina e Iaçar e Bragantina x Clonada 2, em contrapartida, Bragantina x Clonada 1 e Bragantina foram os que levaram maior tempo.

De acordo com Moura, Menezes e Lemos (2008), estudando concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino, somente após três meses da germinação *in vitro* das sementes que obteve plântulas doadores de ápices caulinares, os quais foram retirados e inoculados em meio contendo sais e vitaminas de MS para regeneração. Santos, Lemos e Rodrigues (2009) observaram que a germinação continua ocorrendo e plântulas podem ser desenvolvidas com mais de 90 dias após a semeadura.

Isso demonstra a diferença genética dos genótipos estudados, pois o menor tempo para a formação de plântulas foi aos 87 dias de apenas uma cultivar (Iaçar x Bragantina), com 92 dias (Uthirankotta e Bragantina), os demais genótipos demonstraram processo completo de germinação um pouco mais tardio, chegando em até 128 dias para a formação completa da plântula.

A figura 3 representa os dias após a emissão da radícula (DAER) em relação aos estádios de germinação até chegar na formação de plântula dos genótipos de pimenteira-

do-reino em questão. Os dados apontam que o genótipo Bragantina x Clonada 1 teve um desenvolvimento mais lento para atingir a fase de plântula e uma das menores taxas de percentagem de sobrevivência como foi visto na tabela 2.

Verificou-se que os genótipos Bragantina x Clonada e Iaçará x Bragantina e Bragantina apresentaram DAER semelhantes, por volta de 65 dias. Já a cultivar Iaçará e o cruzamento Uthirankotta x Bragantina formaram plântulas em menor espaço de tempo. A cultivar Iaçará teve DAER baixo, o que é muito relevante associando a percentagem de sobrevivência que foi de 61,9% (tabela 2), o valor mais significativo entre todos os genótipos.

Figura 3 – Dias após a emissão da radícula (DAER) até a formação da plântula completando o processo de germinação de cada genótipo.

Obs.: Adotou-se o dia em que se observou a estrutura radícula como dia zero.

Contudo, por mais que o processo de formação de plântula do genótipo Uthirankotta x Bragantina tenha ocorrido em menor tempo, a taxa de percentagem foi mais baixa 15% (tabela 2) comparada aos demais genótipos. Tal fato pode estar relacionado à viabilidade do embrião ou a outros fatores que impediram a germinação dos mesmos.

Conclusões

Os genótipos mostram viabilidades variáveis no processo de germinação *in vitro*, mesmo entre cultivares e dentro de plantas da mesma cultivar. O híbrido Iaçará x Bragantina é mais precoce na formação de plântulas (87 dias após o semeio). Não há diferença na adição de outros compostos ao meio de cultura básico MS para o processo de germinação e formação de plântulas em genótipos de pimenteira-do-reino.

Referências

ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. **Pimenta-do-reino e suas doenças na região Amazônica**. Ciência Agrícola, v.2, p.114-119, 1977.

ALVES, S. A. O.; CARDOSO, J. N. O.; OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; NETO, C. F. O.; LOBATO, A. K. S.; MAIA, P. S. P.; AMARAL, L. M. S. **Enraizamento *in vitro* e Aclimatização em Vermiculita de Pimenteira-do Reino (*Piper nigrum* L.)**. In: Seminário de Iniciação Científica da UFRA, 2. Seminário de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. Ciência e Tecnologia com Inclusão Social: anais. Belém –PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

ANDRADE, C.G.C.; SILVA, M.L.; SALLES, T.T. **Fatores Impactantes no Valor Bruto de Pimenta-do-reino (*Piper Nigrum* L.) no Pará**. Floresta e Ambiente, 2017; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.145615>.

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.

Departamento de Estudos Socioeconômicos - DESER. Secretaria de Agricultura Familiar. Curitiba, novembro, 2008. Disponível em: <http://www.deser.org.br/publicacoes/13_Estudo%20explorat%F3rio%20da%20Pimenta.pdf>. Acesso em: 30 de ago. de 019.

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.

FREIRE, R. R. **Diagnóstico da Produção de Mudas em Viveiros Registrados e Propagação Vegetativa da Pimenteira-do-Reino (*Piper Nigrum* L.) no Norte do Espírito Santo**. Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, UFES, São Mateus, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Produção agrícola municipal: Pará. Rio de Janeiro: IBGE; 2019 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default.shtm>>. Acesso em: 25 de ago. 2019.

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

LEMOS, O. F.; MENDONÇA, D. P.; SILVA, F. B. B.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. M.; MENEZES, I. C. **Germinação *In Vitro* de Sementes da Cultivar Cingapura de Pimenteira-do-Reino**. V Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos.

Fortaleza – CE, 2018.

LEMOS, O. F. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. ESALQ/USP. Piracicaba/SP, 2003.

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

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

MENDONÇA, D. P.; SILVA, F. B. B. ***Trichoderma* e bactérias endolíticas para promoção de crescimento na aclimatização e formação de mudas de pimenteira-do-reino provenientes do cultivo *in vitro***. Belém, PA: UFRA, 2019.

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C. de; 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.

PIRES, G. T.; RIBEIRO, A. C. M.; MONTEIRO, M. G. T.; POLTRONIERI, M. C.; LEMOS, O. F. **Germinação *in vitro* e *ex vitro* de três cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. III Congresso Internacional das Ciências Agrárias, João Pessoa/PB, 2018.

RAMOS, G. K. S.; MENDONÇA, D. P.; SILVA, F. B. B.; FERREIRA, C. S.; LEMOS, O. F. **Ácidonaftalenoacético na Rizogênese e Benzelaminopurina na Indução de Brotos de Genótipos de Pimenteira-Do-Reino (*Piper Nigrum* L) em Cultivo *In Vitro***. III Congresso Internacional das Ciências Agrárias, João Pessoa/PB, 2018.

SANTOS, L. R. R.; LEMOS, O. F.; RODRIGUES, S. M. **Germinação *In Vitro* de Diferentes Cultivares de Pimentado-Reino (*Piper nigrum* L.)**. Anais do 7º Seminário de Iniciação Científica da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA. 2009.

SILVA, F. S.; BENTES, M. H. V.; PENA, H. W. A. **Modelagem de Exportação da Pimenta-do-Reino no Estado do Pará entre 2000 e 2014, Amazônia, Brasil**. Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana. ISSN: 1696-8352 - BRASIL – ENERO 2016.

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