

Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino

Cytokinin concentrations and activated charcoal on black pepper micropropagation

Elisa Ferreira Moura^I Ilmarina Campos de Menezes^{II}
Oriel Filgueira de Lemos^{II}

RESUMO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) tem grande importância para a economia do Norte do Brasil. A pimenta-do-reino é propagada principalmente por estaquia que, além de ser pouco eficiente, pode possibilitar a propagação da doença fusariose. Dessa forma, testes para verificar a eficiência da micropropagação são pertinentes. O objetivo do trabalho foi testar concentrações de BAP - 6-benzilaminopurina (0,5, 1,5, 3,0 e 4,5mg L⁻¹) e a adição de carvão ativado a 0,2% ao meio de cultura na micropropagação de pimenta-do-reino. O meio de cultura foi composto de sais e vitaminas de Murashige & Skoog, 3% de sacarose e 8g L⁻¹ de ágar. Foram utilizados como explantes ápices caulinares de plântulas da cultivar "Bragantina" germinadas in vitro. Os tratamentos foram avaliados em esquema fatorial 4x2, em delineamento inteiramente casualizado. Após 45 dias no estabelecimento, foi avaliado o número de brotos, mas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, considerando-se os dois fatores e a interação entre eles. Após 45 dias no primeiro subcultivo, foram avaliados o número de brotos e de explantes (segmentos nodais). A interação entre BAP e carvão ativado teve efeito significativo para número de brotos e de explantes, sendo que o carvão influenciou o efeito das concentrações de BAP. A concentração de 0,5mg L⁻¹ de BAP na ausência de carvão ativado gerou maior número de brotos e de explantes. O carvão ativado não é necessário na fase de proliferação de gemas de pimenta-do-reino da cultivar "Bragantina".

Palavras-chave: cultura de tecidos vegetais, *Piper nigrum*, planta aromática.

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum*) has great importance for the Northern Brazil's economy. Black pepper is mainly propagated by mass propagation, which is not very efficient and may spread fusariosis. Thus, micropropagation efficiency tests are pertinent. The objective of this research paper was to

test BAP - 6-benzilaminopurine concentrations (0.5, 1.5, 3.0 and 4.5mg L⁻¹) and activated charcoal at 0.2% addition to the culture medium for black pepper's micropropagation. Culture medium was composed of Murashige & Skoog's salts and vitamins, 3% sucrose and 8g L⁻¹ agar. Shoot tips from Bragantina black pepper seedlings germinated in vitro were used as explants. Treatments were evaluated in a 4x2 factorial scheme in a fully randomized design. Forty-five days after establishment, the number of shoots were evaluated, but there was no significative difference between treatments, considering the two factors and the interaction between them. Forty-five days after the first subculture, the number of shoot and explants (nodal segments) were evaluated. Interaction between BAP and activated charcoal had a significative effect on the number of shoots and explants, however, activated charcoal had an influence on BAP concentrations. The concentration of 0.5mg L⁻¹ generated the highest number of shoots and explants. Activated charcoal is not necessary during the Bragantina black pepper shoot bud proliferation phase.

Key words: plant cell culture, *Piper nigrum*, aromatic plant.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) é uma planta largamente utilizada como condimento na culinária. Em 2005, o Brasil produziu aproximadamente 65 mil toneladas de pimenta-do-reino (FAO, 2007), e boa parte dessa produção provém da região Norte do país. O método de propagação de pimenta-do-reino mais utilizado é o de estaquia, que, se não praticado corretamente, favorece a disseminação do fungo *Fusarium solani f. sp. piperis*, causador da fusariose (ALBUQUERQUE & DUARTE, 1977). Além disso, a

^IDepartamento de Fitotecnia, Setor Fruticultura, Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. Ph Rholfs, s/n, 36571-000, Viçosa, MG, Brasil. Fone: (31)3899-2643. E-mail: ferrmoura@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, Brasil.

estaquia permite a propagação de apenas 50 plantas em um ano e apenas a partir de plantas com dois anos de idade (MILANEZ et al., 1987).

As técnicas de cultura de tecidos surgem como uma alternativa altamente viável para tentar solucionar os problemas relacionados ao cultivo e produtividade da pimenta-do-reino, possibilitando a rápida propagação de plantas com características agrônomicas superiores, assim como a produção de mudas em larga escala.

Entre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação é aquela com maior impacto comercial, pois possibilita a produção de um grande número de plantas assépticas em um curto espaço de tempo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). O processo de um protocolo de micropropagação depende do controle de inúmeras variáveis, que vão desde a assepsia do material coletado do campo até a aclimação do material produzido *in vitro*, passando pelos reguladores de crescimento e tipos de explantes utilizados. Para isso, devem ser testadas várias dessas variáveis, a fim de se encontrar um protocolo que una eficiência, praticidade e custo compatível.

Uma das principais etapas em um processo de micropropagação é a multiplicação dos brotos ou geração de propágulos. Para este fim, geralmente são testados tipos e concentrações de citocininas, reguladores de crescimento que comumente estão associados à quebra de dominância apical em gemas axilares e ápices caulinares, com conseqüente indução de brotações (BHOJWANI & RAZDAN, 1996). Entre as citocininas utilizadas, o BAP (6-benzilaminopurina) é o regulador mais comumente empregado. Além dos reguladores de crescimento, outros fatores são adicionados ao meio de cultura para obtenção de maior número de brotações ou melhor regeneração das plântulas. Entre esses fatores, o carvão ativado tem diversas funções, como absorção de compostos fenólicos. O carvão ativado já foi utilizado em protocolos de regeneração de espécies de *Piper*, com a função de diminuir as taxas de oxidação dos explantes (MADHUSUDHANAN & RAHIMAN, 2000).

Protocolos de regeneração *in vitro* para a pimenta-do-reino já foram descritos, (PHILIP et al., 1992; BHAT et al., 1995), porém utilizando cultivares indianas. Não são conhecidos trabalhos de multiplicação *in vitro* envolvendo cultivares brasileiras ou adaptadas ao Brasil.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é testar o efeito de concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e da adição de carvão ativado em alguns caracteres avaliados nas fases de estabelecimento e proliferação de brotos da pimenta-

do-reino via ápices caulinares e assim contribuir para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas sementes de plantas da cultivar "Bragantina" do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. Essas sementes foram despolpadas, lavadas em água corrente e submetidas à pré-assepsia em hipoclorito de sódio a 0,5%, a 38°C em estufa, por 8 horas.

A seguir, as sementes foram tratadas, em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 15 minutos em agitação, e lavadas em água destilada autoclavada por cinco vezes. Por fim, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com 10ml de meio contendo metade dos sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de vitaminas, sacarose como fonte de carbono a 3% e ágar a 0,65% para solidificação.

Após três meses da germinação *in vitro* das plântulas de pimenta-do-reino, foram retirados os ápices caulinares em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e bisturis. Esses ápices foram inoculados em tubos de ensaio com 10ml de meio contendo sais e vitaminas de MS, acrescido de sacarose a 3%, solidificado com ágar a 0,65% e suplementado com BAP nas concentrações de 0,5; 1,5; 3,0 e 4,5mg L⁻¹, combinados ou não com carvão ativado a 0,2%, para constituir a primeira fase de estabelecimento. Os oito tratamentos apresentaram três repetições cada. Os tubos foram mantidos nas condições de 26±1°C, fotoperíodo de 16h luz e 52µmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de luz. Após 45 dias, foi avaliado o número de brotos. Os brotos foram individualizados e inoculados em meio com a mesma constituição, em tubos contendo 10ml de meio, para constituir o primeiro subcultivo. Os tubos foram mantidos nas mesmas condições do estabelecimento. Após novo período de 45 dias, foram avaliados o número de brotos e o número de explantes (segmentos nodais) gerados. O pH dos meios de cultura foi aferido para 5,8±0,02 e os meios foram autoclavados a 121°C e 1,5atm, por 15 minutos.

Os dados foram avaliados segundo análise de variância com delineamento inteiramente casualizado, formando um esquema fatorial de 4x2 para concentrações de BAP e presença ou não de carvão ativado, utilizando-se o programa GENES (CRUZ, 2001), considerando-se os fatores com efeito fixo. Foi utilizado o teste de Tukey para comparação múltipla de médias. A análise de regressão das variáveis considerando as concentrações de BAP em função de presença ou

ausência de carvão ativado foi realizada no programa SAEG

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a regeneração *in vitro* de plântulas de pimenta-do-reino, os ápices caulinares utilizados como explantes foram eficientes. PHILIP et al. (1992) também obtiveram a multiplicação *in vitro* de pimenta-do-reino a partir de ápices caulinares de plantas adultas. Um dos problemas em obterem-se protocolos de regeneração *in vitro* a partir de plantas adultas é o controle das taxas de contaminação vindas do campo.

No estabelecimento, os efeitos de concentrações de BAP, do carvão ativado e da interação entre os fatores não mostraram diferenças significativas entre as médias, ou seja, os tratamentos influenciaram semelhantemente na indução de brotações (Tabela 1). O estabelecimento é conhecido como uma fase em que os explantes ainda estão se adaptando ao meio *in vitro*, e este pode ter sido o motivo pela não observação de diferenças significativas entre os tratamentos.

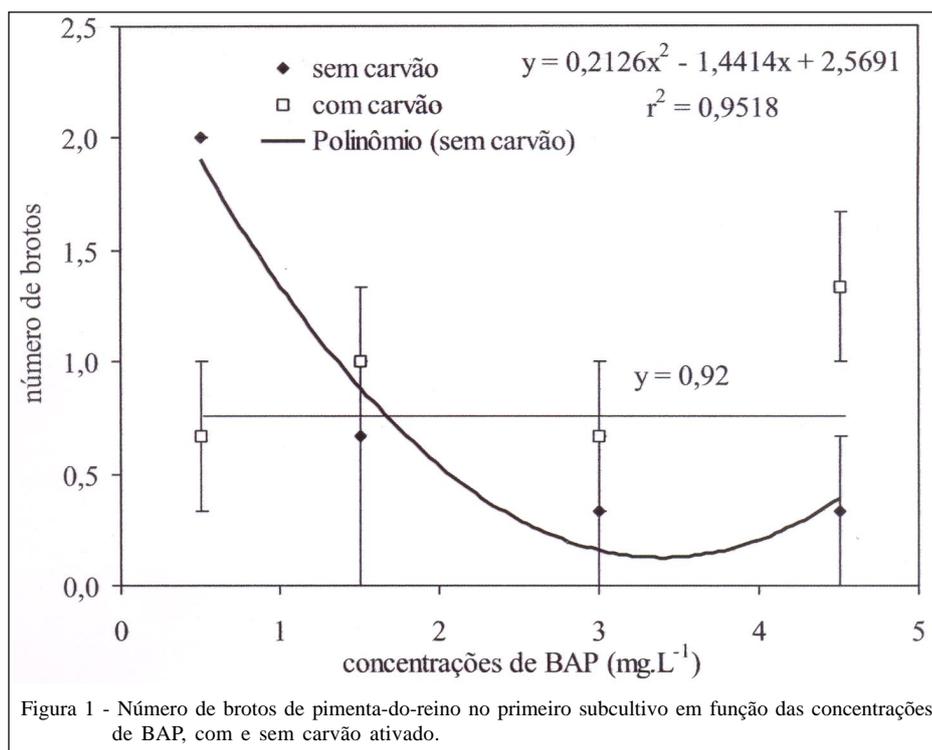
Já para o primeiro subcultivo, houve efeito significativo da interação entre concentrações de BAP e presença de carvão ativado na indução de brotos e no número de explantes (segmentos nodais). Para o número de brotos, a regressão demonstrou ajuste de modelo linear quadrático para as concentrações de BAP na ausência de carvão ativado (Figura 1). Isso significa que, entre as concentrações utilizadas, aquelas mais altas geraram menos brotações nos explantes de pimenta-do-reino, indicando efeito inibitório do regulador. Já na presença de 0,2% de carvão ativado, praticamente não houve diferença na indução de brotos com as concentrações de BAP utilizadas, indicando que o carvão ativado a 0,2% reduz o efeito de BAP. De acordo com EBERT & TAYLOR (1990), o carvão ativado tem um alto efeito de adsorção de reguladores de crescimento presentes no meio de cultura.

Segmentos nodais funcionaram como os melhores explantes para a regeneração de pimenta-do-reino, segundo BHAT et al. (1995), que verificaram que cada segmento poderia gerar uma nova planta e, também, brotações. Dessa forma, foi contabilizado o número de segmentos nodais gerados por tratamento. Para o número de explantes, também houve ajuste de modelo linear quadrático para as concentrações de BAP na ausência de carvão ativado (Figura 2), e a concentração de 0,5mg L⁻¹ gerou o maior número de explantes (3,67). Apesar de ter sido observado um modelo quadrático positivo, entende-se que praticamente não há diferença entre as médias geradas pelas concentrações de 3,0 e 4,5mg L⁻¹. Na presença de 0,2% de carvão ativado, a concentração de 1,5mg L⁻¹ gerou um significativo número de explantes (3,0), mas o carvão ativado não foi suficiente para minimizar os efeitos do BAP nas concentrações maiores, já que suas médias também são menores que as médias das concentrações mais baixas (Tabela 1). Sabe-se que o carvão ativado tem alta capacidade de absorção de reguladores de crescimento, dentre eles o BAP (PAN & Van STADEN, 1998). Assim, explica-se o porquê das diferenças entre as médias de número de brotos e explantes nas mesmas concentrações de BAP com e sem carvão (Tabela 1). O carvão ativado pode ser utilizado como forma de redução das taxas de oxidação dos tecidos. MADHUSUDHANAN & RAHIMAN (2000) utilizaram diferentes concentrações de carvão ativado para controlar as taxas de oxidação nos explantes de diferentes espécies de *Piper*, mas para *Piper nigrum* não houve muita eficiência da adição de carvão ativado. No presente trabalho, apesar de ter sido observada oxidação leve dos tecidos nos tratamentos sem carvão ativado, isso não foi suficiente para inibir a formação de brotos de pimenta-do-reino. Ao contrário de MADHUSUDHANAN & RAHIMAN (2000), que utilizaram explantes de plantas adultas, no presente trabalho, foram utilizados explantes de plantas

Tabela 1 - Comparações entre as médias de número de brotos e explantes gerados nas diferentes concentrações de BAP na presença ou ausência de carvão ativado.

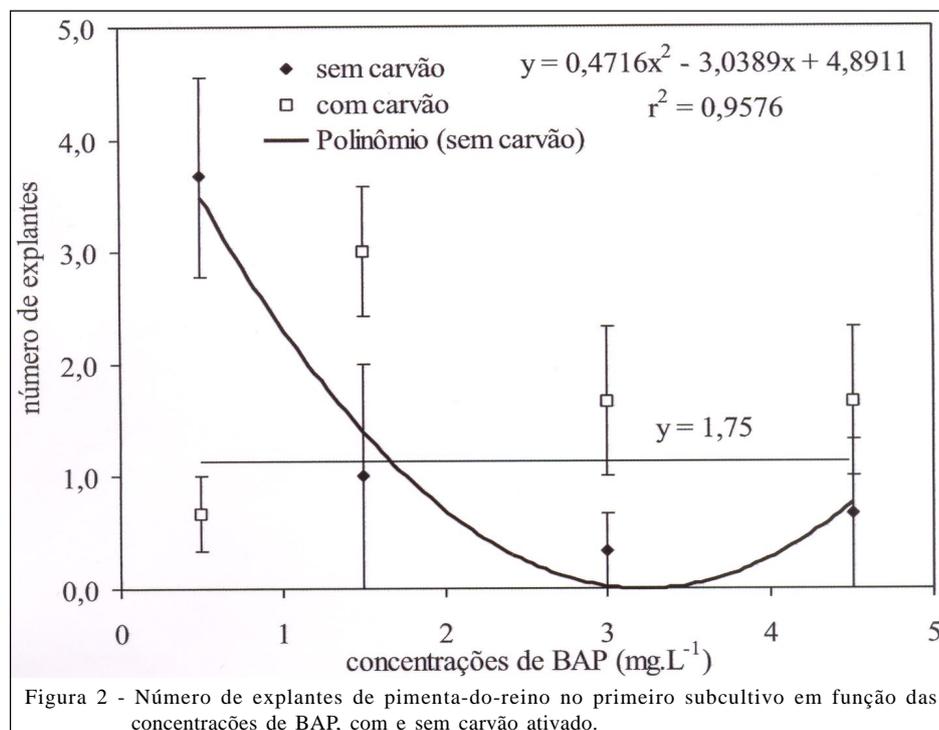
Concentração de BAP	Número de brotos		Número de explantes	
	Sem carvão	Com carvão	Sem carvão	Com carvão
0,5	2,0 a	0,67 b	3,67 A	0,67 B
1,5	0,67 a	1,0 a	1,0 A	3,0 A
3,0	0,33 a	0,67 a	0,33 A	1,67 A
0,5	0,33 a	1,33 a	0,67 A	1,67 A

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas ou maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.



jovens, o que pode ter contribuído para a incidência menor de oxidação dos tecidos. Como a presença de carvão ativado na concentração de 0,2% gerou brotos mais bem formados e com menor incidência de oxidação,

sua adição poderia ser utilizada na fase final do processo de micropropagação, para obtenção de plântulas com maior vigor para o processo de enraizamento e aclimação.



Pôde-se verificar que a concentração menor de BAP ($0,5\text{mg L}^{-1}$) foi mais eficiente na indução de brotações e formação de explantes para a pimenta-do-reino cv. "Bragantina". Com o carvão ativado, a concentração de $1,5\text{mg L}^{-1}$ foi mais eficiente, e, já que o carvão absorve boa parte do regulador de crescimento, entende-se que a concentração de BAP real no meio de cultivo foi abaixo de $1,5\text{mg L}^{-1}$. Isso confirma que concentrações menores de BAP são mais eficientes na indução de brotações e formação de explantes para "Bragantina". Entretanto, isso parece ser variável entre os genótipos de pimenta-do-reino, já que PHILIP et al. (1992) verificaram que a concentração de $1,5\text{mg L}^{-1}$ foi mais eficiente que concentrações mais baixas de BAP na indução de brotos de pimenta-do-reino de uma variedade indiana.

O trabalho contribuiu para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação envolvendo partes vegetativas de pimenta-do-reino da cultivar "Bragantina", uma cultivar adaptada ao clima do Norte do Brasil. Trabalhos envolvendo partes vegetativas jovens podem ter importância para a conservação *in vitro*, ou como contribuição para trabalhos futuros. Entretanto, faz-se necessário investir em trabalhos envolvendo a multiplicação a partir de plantas adultas, que, além de possibilitarem a propagação do genótipo superior, têm maior idade fisiológica, gerando plantas com produção mais precoce.

CONCLUSÕES

Os ápices caulinares da pimenta-do-reino cv. "Bragantina" respondem melhor à concentração mais baixa de BAP utilizada ($0,5\text{mg L}^{-1}$), tanto na formação de brotos, quanto na obtenção de explantes. O uso de carvão ativado não é necessário na fase de proliferação *in vitro* de brotos e explantes de pimenta-do-reino, ao se usarem tecidos jovens como fonte inicial do cultivo, podendo ser utilizado nas fases finais do processo de propagação vegetativa *in vitro*.

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.
- BHAT, S.R. et al. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. **Plant Cell Reports**, v.14, p.398-402, 1995.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition**. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767p.
- CRUZ, C.D. **Programa genes versão Windows**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.
- EBERT, A.; TAYLOR, H.F. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.165-172, 1990.
- FAO (Food and Agriculture Organization). **Major food and agricultural commodities and producers - Black pepper**. Capturado em 1º jan. 2007. Online. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?sessionid=8EAC3FDB1E3199929C64136CA9CD2F7F?item=687&lang=en&year=2005>.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1990. Cap.9, p.99-170.
- MADHUSUDHANAN, K.; RAHIMAN, B.A. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of *in vitro* cultures of *Piper* species. **Biologia Plantarum**, v.43, p.297-299, 2000.
- MILANEZ, D. et al. **Cultura de pimenta-do-reino**. Vitória, ES: EMCAPA, 1987. 94p. (EMCAPA, Documentos, 33).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PAN, M.J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.
- PHILIP, V.J. et al. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v.12, p.41-44, 1992.