



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA

MESTRADO EM AGRONOMIA



Amazônia Oriental

LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

**ONTOGÊNESE, MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E
ACLIMATIZAÇÃO DE QUATRO CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO
(*Piper nigrum* L.)**

Belém

2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA

MESTRADO EM AGRONOMIA



Amazônia Oriental

LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

ONTOGÊNESE, MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E
ACLIMATIZAÇÃO DE QUATRO CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO
(*Piper nigrum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e à Embrapa Amazônia Oriental, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Savonitti Miranda
Coorientador: Pesq. Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Belém

2012

Santos, Lana Roberta Reis dos

Ontogênese, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.)./ Lana Roberta Reis dos Santos. – Belém, 2012.

83f.;il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

1. Pimenteira-do-reino - piperales. 2. Germinação *in vitro*.
3. Micropropagação. 4. Enraizamento *in vitro*. 5. Aclimatização. I. Título.

CDD – 583.25

LANA ROBERTA REIS DOS SANTOS

**ONTOGÊNESE, MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E
ACLIAMATIZAÇÃO DE QUATRO CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO
(*Piper nigrum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Aprovado em 06 agosto de 2012

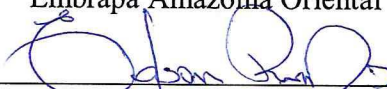
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vicente Savonitti Miranda - Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia



Pesq. Dra. Simone de Miranda Rodrigues - 1º Examinador
Embrapa Amazônia Oriental



Prof. Dr. Edson Marcos Leal Soares Ramos - 2º Examinador
Universidade Federal do Pará



Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa - 3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Ao meu Deus e Pai pelo seu amor incondicional e pelo Seu poder que me fazem permanecer.

----- Ofereço-----

A minha querida mãe pelo seu sacrifício, incentivo, exemplo de superação e apoio para me manter em meus estudos. Ao meu amado esposo pelo seu amor, companheirismo, amizade, força e por toda sua compreensão para meu crescimento profissional. Eu os amo.

-----Dedico-----

AGRADECIMENTOS

Ao meu grandioso Deus, pelo seu amor, força e certeza que Ele é comigo e que quer me fazer grande. Meu Pai receba minha adoração, minha gratidão e que através do trabalho de minhas mãos eu possa dar bom testemunho de Ti meu Senhor e que eu possa te anunciar onde pisarem a planta de meus pés.

À CAPES/REUNI, pela concessão da bolsa de Mestrado que tornou possível o desenvolvimento e a realização dessa pesquisa.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela formação profissional e pelo curso de mestrado em agronomia que me possibilitaram avançar profissionalmente e assim oferecer melhores oportunidades a todos quanto meu trabalho possa auxiliar.

À Embrapa Amazônia Oriental, ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos onde pude desenvolver as pesquisas que me permitiram concluir este mestrado. Sou grata por esta empresa e pelos seus pesquisadores que me transmitiram conhecimentos me possibilitando dizer que amo o que aprendi e adoro o que faço.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), ao Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética, por ter me recebido para realização de treinamentos.

À minha Mãe pela sua luta em me manter estudando a fim de que eu tivesse oportunidades as quais não foram possíveis a ela. Pela sua educação familiar, princípios, dignidade, honestidade e pela sua força para o trabalho sempre com intuito de dar o melhor para suas filhas. Meu muito obrigada..

Ao meu querido esposo Rildo pelo apoio, auxílio, amor, companheirismo e compreensão. Por estar sempre ao meu lado para que tudo sempre ocorra da melhor maneira possível, por me acalmar em momentos de aflição, por me esperar enquanto eu desenvolvia meus estudos. Marido eu te amo.

A minha irmã Mara Reis, pois eu nunca esqueço de seus cuidados comigo, de seus ensinamentos, de sua paciência em me ensinar disciplinas as quais eu tinha dificuldade.

Ao Dr. Pesq. da Embrapa Amazônia Oriental Oriel Filgueira de Lemos, meu orientador, por sua confiança em meu trabalho, por sua compreensão, ensinamentos e conselhos. Por sua disposição em me orientar sempre viabilizando da melhor maneira possível tudo quanto necessário para o bom desenvolvimento da pesquisa. A ele tenho imensa admiração pelo seu profissionalismo e por sua disposição em auxiliar sempre que se precisa. Muito abrigada.

Ao meu orientador professor Vicente Savonitti pelo auxílio sempre que necessário para o desenvolvimento deste estudo, sempre se disponibilizando em viabilizar o que estivesse em seu alcance para a conclusão deste curso.

Aos professores da pós-graduação os quais pude ter o privilégio de receber seus ensinamentos, Mário Lopes, Hugo Pinheiro, Edson Ramos, Herdjanía Veras, Gisele Barata,

Vicente Savonitti, Elisa Moura, Oriel Filgueira, Osmar Lameira, Simone Rodrigues e Ilmarina Menezes.

A Secretária da pós-graduação, Gracy Monteiro, pela sua paciência e profissionalismo.

A Professora e coordenadora do curso de pós-graduação, Herdjania Veras, pela sua disposição em fazer seu melhor para elevar o nível do curso.

Ao professor Sérgio Pinheiro pelo apoio em meus estágios de docência. Este tem minha admiração pelo seu carisma e sua paixão visível em lecionar.

Ao doutor e pesquisador Mateus Mondim pelo treinamento em citogenética e por me auxiliar em parte de meus estudos.

Ao professor da UFPA, Edson Ramos e seus estudantes, Danielle, Kelly e Eudmar pelo apoio e disposição em me auxiliar nas análises estatísticas.

Aos assistentes do laboratório da Embrapa Amazônia Oriental, Aline, Gilberto e José Carlos, pelo apoio e manutenção para manter a ordem e organização no laboratório.

A Dra Simone Rodrigues pelo "bom dia" de cada manhã e pelo seu sorriso.

A Dra Ilmarina Menezes pela amizade, orientações, momentos de descontração e força para superar minhas limitações.

As amigas Hérica Oliveira, Fabrícia Moraes e Helen Moura por me incentivarem, por me direcionarem, pelas gargalhadas dadas, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pela imensa amizade que conquistamos.

A amiga Meiceane Campelo (sempre celebridade) pelo seu jeito único o qual só quem a conhece pode saber que é dona de uma sensibilidade e capaz de oferecer sua amizade.

Aos estudantes de iniciação científica do laboratório de Biotecnologia da Embrapa, Leuzina; Ariane; Kerolém; Kelly, Bruna, Raphael, Thaise e Murilo.

As minhas novas conquistas de amizade, Kelly Ramos, Rhafael Leone e Bruna Sayuri.

As colegas da Pós-Graduação, Ana Cláudia Barata, pelo seu companheirismo, pelas noites de sono para fazermos o melhor em nossos trabalhos e Renata Lima pelos estudos de fisiologia e sua alegria e bom humor, ao casal Rômulo e Suenny pelo seu carisma.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais esta etapa da minha vida profissional, todo o meu carinho e gratidão.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

*"Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em
seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos
os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas."
(Provérbios 3.5-6)*

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Aspectos gerais da cultura pimenteira-do-reino.....	13
2.2 Importância socioeconômica da cultura.....	15
2.3 Cultivares de pimenteira-do-reino.....	17
2.4 Principais doenças da pimenteira-do-reino.....	19
2.5 Ontogênese.....	21
2.6 Métodos de propagação.....	22
2.7 Biotecnologia: cultura de tecido e micropropagação.....	23
3 ONTOGÊNESE, MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO (<i>Piper nigrum</i> L.)	
3.1 INTRODUÇÃO.....	27
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1 Coleta dos frutos e assepsia das sementes.....	30
3.2.2 Ontogênese: germinação <i>in vitro</i> e formação de plântulas.....	31
3.2.3 Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de brotos e gemas.....	33
3.2.4 Enraizamento <i>in vitro</i>	34
3.2.5 Aclimatização.....	36
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.3.1 Ontogênese: germinação <i>in vitro</i> e formação de plântulas.....	37
3.3.2 Estabelecimento e multiplicação <i>in vitro</i> de brotos e gemas.....	45
3.3.3 Enraizamento <i>in vitro</i>	60
3.3.4 Aclimatização.....	66
3.4 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS	

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi avaliar a ontogênese, a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos. Avaliou-se a germinação *in vitro* das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino submetidas às concentrações de 0,0; 0,10; 0,17 e 0,25 g L⁻¹ de NaH₂PO₄ em meio com metade das concentrações de sais de Murashige e Skoog (MS) e 0,0 g L⁻¹ de NaH₂PO₄ em meio MS. Obteve-se os percentuais dos estádios de desenvolvimento de sementes sem respostas (SSR), intumescidas ao nível do embrião (INE), emissão de radícula (ERD), emissão de caulículo (ECL), emissão do hipocótilo (EHP), emissão de cotilédones (ECT) e plântula formada a partir da emissão do epicótilo (EEP). Na multiplicação *in vitro*, o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5, quatro cultivares e cinco combinações de thidiazuron (TDZ) x 6-benzilaminopurina (BAP) [T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP) e T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP)]. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação das médias quanto ao número de brotos e número de gemas da interação cultivar *versus* tratamento. No enraizamento *in vitro*, testaram-se quatro doses de sacarose (15; 30; 45 e 60 g L⁻¹ + controle sem sacarose) em meio ½ MS. O número de raízes/broto, comprimento médio das raízes/broto, comprimento de brotos e número de folhas/broto foram submetidos à ANOVA e ao teste Tukey para comparação das médias. Na aclimatização, avaliou-se a influência das doses de sacarose no enraizamento *in vitro* sobre a taxa de sobrevivência. Para todas as cultivares utilizadas, a germinação da pimenteira-do-reino é epígea e fanerocotiledonares, com início da germinação no 20º dia e término no 90º dia após o semeio. Diferentes concentrações de NaH₂PO₄ influenciam na ontogênese com diferentes períodos para os estádio da germinação, sendo a concentração de 0,10 g L⁻¹ em meio ½ MS indicada para germinação *in vitro*. Tratamentos com TDZ x BAP induzem o superbrotamento, porém com qualidade comprometida. A presença apenas de BAP no meio de cultura é mais eficiente para obtenção de maior número de gemas. A concentração de sacarose recomendada para o enraizamento *in vitro* é 30 g L⁻¹. Nesta, há a formação de raízes com aspectos desejáveis para aclimatização. Maiores taxas de sobrevivência durante a aclimatização são obtidas com brotos provenientes do enraizamento *in vitro* em meio de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose.

Palavras chave: germinação, micropropagação, sacarose, taxa de sobrevivência

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the ontogeny, multiplication, rooting and acclimatization of *in vitro* cultivars of black pepper (*Piper nigrum* L.) by application of tissue culture techniques. Evaluated the *in vitro* germination of cultivars Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally of black pepper when exposed to concentrations of 0.0, 0.10, 0.17 and 0.25 g L⁻¹ of NaH₂PO₄ in ½ MS medium and 0.0 g L⁻¹ NaH₂PO₄ in MS medium. Obtained the percentage of each phase of development of seedling during germination. *In vitro* multiplication, the design was completely randomized in factorial scheme 4 x 5, four cultivars and five combinations of TDZ x BAP [T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP) e T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP)]. We carried out the analysis of variance (ANOVA) and Tukey test for comparison of means for the number of buds and bud number of cultivar interaction treatment. Rooting *in vitro*, was tested four concentrations of sucrose (15, 30, 45 and 60 g L⁻¹ + control without sucrose) in ½ MS medium. The number of roots/shoot, length root/shoot, length of shoot and number of leaves/shoot were submitted to ANOVA and Tukey for comparison of means. In acclimatization, evaluated the influence of doses of sucrose used in rooting on the survival rate during acclimatization. For all cultivars, germination of black pepper is epigeal and fanerocotylar beginning of germination on 20th day and ending on the 90th day after sowing. Different concentrations of NaH₂PO₄ influence the ontogenesis with different periods for the stage of germination, the concentration of 0.10 g L⁻¹ in ½ MS suitable for germination *in vitro*. Treatment with TDZ x BAP induce witches, but with compromised quality. The presence of BAP only in the culture medium is most efficient for achieving greater number of buds. The sucrose concentration recommended for rooting *in vitro* is 30 g L⁻¹. In this, there is the formation of roots to desirable aspects for acclimatization. Highest survival rates during acclimatization are obtained from the shoots rooting *in vitro* in culture medium with 30 g L⁻¹ sucrose.

Keywords: germination, micropropagation, sucrose, survival

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma cultura de exportação com grande importância para a economia da Amazônia brasileira. Entre os principais aspectos que justificam a valorização da espécie para a região está no fato de gerar divisas de mais de 50 milhões de dólares ao ano e empregar em torno de 80 mil pessoas, no período da safra (BASTOS et al., 2008), possuindo assim importância social e econômica no cenário brasileiro, especialmente, em virtude de se tratar de um cultivo gerador de renda caracterizado por ser fixador de mão de obra no campo e se adequar como cultura alternativa para pequenos produtores (HOMMA, 2004).

No Estado do Pará, as condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento da pipericultura tornaram-na uma das principais atividades econômicas da agricultura paraense (BARBOSA, 2002), fazendo com que o Estado contribua, atualmente, de acordo com dados do IBGE (2012), com quase 80% da produção total do Brasil. Entretanto, as condições que favorecem esta atividade agrícola são as mesmas que beneficiam o aparecimento de doenças, como a fusariose causada pelo fungo *Fusarium solani* f. spp *piperis*, nos pólos produtores (Nordeste paraense, região da Transamazônica e região do baixo Amazonas) devido à alta temperatura, a alta umidade relativa do ar e, em algumas regiões, chuvas bem distribuídas durante o ano.

Devido à expansão da pipericultura no Pará, outros aspectos além dos climáticos vem contribuindo para os problemas fitossanitários, como plantios homogêneos em larga escala e em monocultivos, que além da fusariose, contribuem para o aparecimento de outras doenças, como as viroses, as quais afetam diretamente a produtividade da cultura comprometendo os volumes nas exportações brasileiras e de acordo com Silva et al. (2011), nos últimos anos a vida útil da lavoura tem sido reduzida entorno de 12 a 15 anos, para 4 a 6 anos.

Através do melhoramento genético de plantas torna-se possível a o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerante a pragas e doenças, permite-se o desenvolvimento de sistemas produtivos eficientes, além desta ciência ser a forma mais eficiente de levar descobertas dos laboratórios de pesquisa para o agricultor, consumidor e demais integrantes dos arranjos produtivos por meio da comercialização de mudas melhoradas (BORÉM; MIRAMDA, 2009).

O germoplasma da pimenteira-do-reino, responsável pela ampliação dos cultivos, caracteriza-se por estreita variabilidade genética (devido ao reduzido material botânico

introduzido no Brasil e a propagação assexuada através de estacas), sendo este um dos aspectos que têm contribuído para dificultar as pesquisas de melhoramento genético convencional.

Segundo Lameira et al. (1996), pela via de propagação vegetativa, somente se torna possível a produção de até 50 estacas enraizadas de pimenteira-do-reino por ano a partir de uma planta com 2 anos de idade. Para um programa de melhoramento, essa quantidade é insuficiente para a multiplicação rápida do material com potencial genético que atenda aos objetivos dos fitomelhoristas. Através da micropropagação, ou multiplicação de plantas *in vitro* é possível à produção de até 15 mil plantas por ano a partir de um explante, tornando-a uma técnica viável para aumentar o número de plantas de alta qualidade propagadas.

A Embrapa Amazônia Oriental tem investido em estudos de micropropagação, de cultura de embrião e regeneração de plantas *in vitro* de pimenteira-do-reino, desde 1997. A partir de 1999, essa instituição tem adotado métodos de melhoramento genético para a pimenteira-do-reino nos quais estão incluídas estudos de pré-melhoramento envolvendo as fases em que as técnicas de cultura de tecidos como: germinação *in vitro*, clonagem e manutenção de plantas *in vitro* são utilizadas em alguma fase do melhoramento (POLTRONIERI et al., 1999; BARBOSA, 2002).

As técnicas de cultura de tecidos têm permitido a multiplicação rápida de plantas com qualidade superiores tanto nos aspectos fitossanitários quanto vegetativo. Desse modo, a produção de mudas por reprodução sexuada, via germinação *in vitro*, é uma das alternativas para gerar variabilidade genética a partir das cultivares de pimenteira-do-reino e também, para serem utilizadas como fonte de explantes para a micropropagação.

Neste sentido, para obter um protocolo de multiplicação *in vitro* de pimenteira-do-reino são necessários os avanços nas pesquisas com intuito de alcançar a metodologia adequada para as seguintes hipóteses: há diferença na ontogênese de cultivares de pimenteira-do-reino observada durante a germinação *in vitro* em meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) na presença ou não de diferentes concentrações NaH_2PO_4 ; existe influência do tipo e da concentração do regulador de crescimento na multiplicação *in vitro* de cultivares da espécie em estudo; cultivares de pimenteira-do-reino respondem de formas distintas durante a fase de enraizamento *in vitro* quando submetidas a diferentes concentrações de sacarose; e a taxa de sobrevivência é diferente durante a aclimatização das diferentes cultivares.

À vista desse conhecimento, este trabalho teve como objetivo avaliar a ontogênese, a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de cultivares de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.) durante o processo de micropropagação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cultura da pimenteira-do-reino

A história das especiarias é muito bem entrelaçada com a história da humanidade, sendo que dentre todas as famílias das espécies utilizadas como condimentos, a pimenteira-do-reino, conhecida botanicamente como *Piper nigrum* L., é predominante. Ela também é chamada de “rei” das especiarias e é uma das mais antigas conhecidas pela humanidade (NAIR, 2011).

A planta pimenteira-do-reino, como geralmente é conhecida no Brasil, também pode ser chamada por pimenta-preta ou pimenta-redonda. É utilizada em larga escala como condimento, em forma de grãos inteiros, secos e moídos ou misturados a outros condimentos. Geralmente usada na culinária de diversos países como aditivo para incrementar o sabor aos alimentos em diferentes preparações, pois possui um óleo volátil que proporciona sabor forte e levemente picante, proveniente de um composto químico, o alcaloide piperina o qual é responsável pelo seu aroma intenso (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005).

A planta é autógama cuja floração nas condições climáticas da Amazônia ocorre de novembro a abril, na estação de maior ocorrência de chuvas. Sua inflorescência caracteriza-se como uma espiga pendulosa de 5 a 20 cm de comprimento com 70 a 100 floretas hermafroditas, ou seja, é uma planta díioica com dois estames dispostos lateralmente ao ovário e ao estigma (POLTRONIERI et al., 1999). Predominantemente são autopolinizadas e a dispersão de pólen é auxiliado por gotas de chuva ou orvalho e também por geitonogamia, ocasionando a formação do fruto após seis meses de polinização. Mecanismos de dispersão ativos e eficientes de pólen e sementes servem para garantir o fluxo gênico dentro e entre os segmentos populacionais que levam ao estabelecimento de populações (NAIR, 2004).

Pertence ao gênero *Piper*, o maior da família *Piperaceae*, o qual agrega cerca de 2000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo 300 na região Amazônica e 150 na região sudeste do Brasil (JARAMILLO; MANOS, 2001; QUIJANO-ABRIL et al., 2006). Dentre essas espécies, a *P. nigrum* L. é a mais importante comercialmente, apresentando tanto variedades selvagens quanto cultivadas. É uma planta trepadeira, perene, semilenhosa e, para seu bom desenvolvimento exige o uso de tutores para sua sustentação.

O caule é formado por duas partes distintas: a haste central ou ramo ortotrópico responsável pelo crescimento em altura das plantas. Estes possuem raízes adventícias do tipo grampiformes que se originam nos nós e se aderem livremente ao suporte de madeira. As hastes laterais são desprovidas de raízes aderentes cujas gemas originam as flores e os frutos, estes são chamados de ramos de frutificação ou plagiotrópicos. As folhas da pimenteira-do-reino são pecioladas e se localizam a altura dos nós existentes nos ramos. O fruto é uma drupa séssil, proveniente de um único óvulo. Quando maduro, o fruto possui de 4 a 6 mm de diâmetro e sua casca adquire coloração avermelhada. A semente apresenta o endosperma esbranquiçado. No Pará, a maturação ocorre no período de junho a setembro e no sul da Bahia e Espírito Santo há dois períodos de maturação, março a abril e outubro e novembro. O intervalo entre floração e maturação é de seis meses (PROJETO PAS CAMPO, 2004).

Em diversos tipos de solo a pimenteira-do-reino se adapta. Os solos amazônicos prestam-se ao seu cultivo com obtenção de bons resultados, tendo em vista que, sem considerar os aspectos nutricionais da planta, a sua maior exigência é quanto às propriedades físicas, consideradas como boas na maioria destes. O plantio é feito em terrenos de terra firme, não sendo utilizados os solos de várzeas, devido a sua condição de encharcamento e excesso de umidade, fatores estes que os tornam impróprios para o cultivo, pela deficiência de oxigênio que prejudica o desenvolvimento do sistema radicular da planta, e consequentemente, o aparecimento de fungos patogênicos (BAENA; RODRIGUES, 2005). Devem ser evitados solos arenosos ou pedregosos, topografias excessivamente onduladas. As condições de fertilidade do solo não são consideradas limitantes, visto que podem ser corrigidos com uso racional de fertilizantes (PROJETO PAS CAMPO, 2004).

De acordo com Albuquerque e Conduru (1971) a cultura da pimenteira-do-reino foi introduzida no Brasil no século XVII, pelo Estado da Bahia, difundindo-se para os Estados da Paraíba, Maranhão e Pará, a princípio com produção insignificante. Esta cultura só começou a ser utilizada comercialmente no século XX, desde 1933 quando imigrantes japoneses trouxeram 20 mudas da cultivar “Cingapura” (Kuching) e introduziram no Município de Tomé-Açu, no Estado do Pará. Apenas três mudas sobreviveram e a partir dessa base genética comum ocorreu à expansão comercial devido à intensificação da produção de pimenta-do-reino, no Pará, a partir da propagação vegetativa desse material botânico passando a ser produzida em escala comercial (CASTRO, 1979; DUARTE, 1999; BARBOSA, 2002).

Segundo Albuquerque et al. (1989), a cultura se desenvolve muito bem em clima quente e úmido, com precipitação pluviométrica média de 2500 mm/ano, com umidade acima de 80% e temperatura média em torno de 23°C a 28°C e em solos com boa drenagem. Desse

modo, entende-se que a região norte do Brasil oferece todas as condições necessárias para seu bom desenvolvimento.

As duas principais regiões produtoras do país têm suas particularidades. No Estado do Pará, região Norte da Amazônia, plantações de pimenteira-do-reino estão localizados em áreas com precipitação pluviométricas de cerca de 2.000 mm/ano e temperaturas médias entre 26°C e 28°C. Enquanto que no Estado do Espírito Santo, região Sudeste da Mata Atlântica, a pimenteira é cultivada em áreas com precipitação de 1.200 mm/ano e temperatura média de 23°C (PARTELLI, 2009).

Em geral, o Estado do Espírito Santo adota mais tecnologia para o favorecimento das condições ideais de cultivo quando comparado com o Estado do Pará, obtendo como consequência do investimento em tecnologias o aumento da produtividade (cerca de 3.000 kg/ha). Observa-se naquele Estado uma melhor utilização dos fertilizantes, pois dentre as tecnologias adotadas inclui-se a fertilização por irrigação (SERRANO et al., 2006).

2.2 Importância socioeconômica da cultura

A Índia é o mais importante produtor de pimenteira-do-reino no mundo. Discussões sobre a economia de pimenta e padrões de comercialização no país são sempre relevantes. Atualmente, a Índia responde por 49,5% da área total no mundo, mas em 1951 foi de 70%. Embora o país detenha a maior área plantada de pimenteira no mundo, com 191.426 ha e produção de 56.200 toneladas, contribui apenas com 29,8% da produção mundial, ou seja, sua produtividade de 294 kg ha⁻¹ é extremamente baixa. Na verdade, a contribuição total da Índia para a produção mundial caiu de 66% em 1951 para 29,8% em 2011. Enquanto isso, a Tailândia com uma área total de apenas 2.808 ha encabeça a lista com produtividade de 3.594 kg ha⁻¹ (NAIR, 2011).

O International Trade Centre (ITC), em Genebra, estima que o comércio de especiarias seja em torno de 400.000 a 450.000 toneladas com um valor total de US\$ 1,5 a 2 bilhões anuais, apresentando uma taxa de crescimento anual de 3,6% em quantidade e 8,4% em valor de especiarias. A pimenta-do-reino contribui com 34% do comércio total em especiarias. Tratando-se de mercado consumidor, a Dinamarca está no topo da lista no consumo de pimenta, seguida pela Alemanha e Bélgica. Os EUA são consumidores consideráveis, enquanto o Canadá e a Suíça estão na cauda da lista (NAIR, 2011).

Segundo a International Pepper Community – IPC (2011), a qual apresenta dados das exportações dos países produtores de pimenta-do-reino nos anos de 2001 a 2010 (Anexo A), neste período houve um declínio de 5.099 t nas exportações brasileiras, ou seja, em 2001 o país exportou 33.885 t de pimenta contra 28.786 t em 2010, participando assim com 12,89% na exportação mundial neste ano. Desse modo, em termos mundiais, a posição do Brasil na lista de países exportadores foi de terceiro lugar no ano de 2010 seguido da Índia que no mesmo período exportou 15.464 t. O Vietnã e a Indonésia apresentaram exportações de 96.860 t e 49.146 t ocupando assim, respectivamente, a primeira e segunda posição no *ranking* de exportações mundiais. Em termos de produção (Anexo B), o Brasil, em 2010, ocupou o quarto lugar como maior produtor de pimenta-do-reino com produção de 34.000 t, sendo o maior destaque para o Vietnã com 110.000 t, seguidos da Indonésia (59.000 t) e da Índia (50.000 t).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2012) a produção brasileira de pimenta-do-reino, em 2011 atingiu 43.869 t e este ano de 2012 pode chegar a 51.191 toneladas, ou seja, há previsão de 16,69% de aumento na produção. Desse modo, o Brasil mantém-se no *ranking* dos países mais produtores dessa especiaria (Tabela 1).

Tabela 1. Área plantada, área colhida, produção e rendimento médio de pimenteira-do-reino no ano de 2011 e estimativa para o ano de 2012 no Brasil.

Ano	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Produção (t)	Rendimento Médio (kg ha ⁻¹)
2011	21.380	20.886	43.869	2.100
2012	22.371	22.225	51.191	2.303

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados extraídos das tabelas que compõem o acervo do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) (mês junho 2012), e representam uma pequena amostra dos dados disponíveis do IBGE (2012) no SIDRA (2012) em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>.

Desse modo, o Brasil produz em média 39.770 t de pimenta-do-reino por ano e devido às condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento da pipericultura no Pará, seu cultivo tornou-se uma das principais atividades econômicas da agricultura paraense, pois quase 80% da produção nacional são provém desse Estado, com grande concentração nos municípios de Tomé-Açu, Castanhal e Baião. O restante da produção sai do Espírito Santo e da Bahia (Tabela 2), sendo o consumo interno de cinco a seis mil toneladas por ano, com a maior parte da produção destinada à exportação, uma vez que, por questões culturais, o brasileiro consome pouca pimenta-do-reino (IBGE, 2012).

Tabela 2. Produção de pimenta-do-reino no ano de 2011 e estimativa para o ano de 2012 nos Estados brasileiros produtores.

Estados Produtores	Produção (t) / ano	
	2011	2012
Pará	33.349	40.088
Espírito Santo	6.371	6.696
Bahia	4.011	4.260
Paraíba	99	108
Maranhão	39	39

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados extraídos das tabelas que compõem o acervo do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) (mês junho 2012), e representam uma pequena amostra dos dados disponíveis do IBGE (2012) no SIDRA (2012) em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp>.

A pimenta-do-reino é o primeiro produto agrícola na pauta de exportação do Pará. Somente o comércio de minério de ferro e de madeira se equipara ao desta iguaria na região. Embora o Estado tenha a maior área colhida (17.825 ha) dentre os Estados produtores sua produtividade atual é baixa por fatores os quais se destaca a doença fusariose. A vulnerabilidade das cultivares ao ataque do patógeno causador desta doença e a rápida disseminação em plantas provenientes da mesma base genética têm contribuído para o agravamento do quadro produtivo, que de acordo com Lemos (2003), torna-se mais curto, com uma média de cinco a seis anos de sobrevivência em área de ocorrência da doença.

Além da importância econômica, a pipericultura tem importância social no cenário brasileiro, por se tratar de um cultivo gerador de renda, genuinamente de exportação e atrativo de mão de obra para o campo, diminuindo o êxodo rural para os grandes centros urbanos. Devido o cultivo gerar renda de mais de 50 milhões de dólares por ano e cerca de 70 a 80 mil empregos no período da safra (LEMOS et al., 2011), este proporciona a oportunidade de cada tonelada de pimenta colhida corresponder a um trabalhador no campo. Sendo assim, a pipericultura se adéqua como cultura alternativa para pequenos produtores, pois se trata de um produto de exportação que alcança bons preços no mercado internacional, possibilitando ao agricultor aumentar sua renda, atribuindo importância à atividade para o desenvolvimento socioeconômico da região.

2.3 Cultivares de pimenteira-do-reino

Cultivar é um grupo de indivíduo de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outros por uma margem mínima de descritores (ciclo, cor das

sementes, características morfológicas, reação a doenças, produção e padrões isoenzimáticos ou de ácidos nucleicos) que possua denominação própria, homogeneidade e estabilidade quanto aos descritores em sucessivas gerações (BORÉM; MIRANDA, 2009).

As cultivares de pimenteira-do-reino podem ter sido originadas a partir de espécies selvagens por meio do processo de domesticação e seleção. Mais de cem cultivares são conhecidas, porém a maioria pode ter desaparecido devido ao aparecimento de doenças devastadoras ou também substituição por híbridos. A migração humana tem contribuído para a propagação das cultivares (NAIR, 2011).

Segundo Lemos et al. (2011), como resultado da introdução e avaliação de material genético de *P. nigrum* L. nas condições edafoclimáticas do Estado do Pará, atualmente, o sistema de produção conta com sete cultivares, dentre as quais estão:

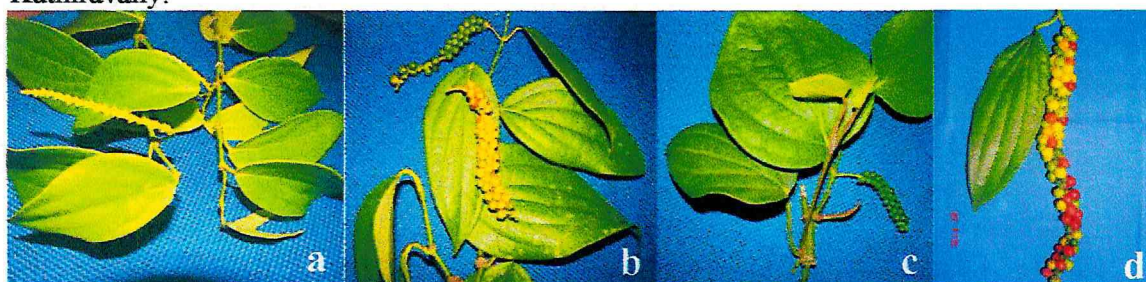
Cingapura: Introduzida no Brasil em 1933 por imigrantes japoneses. O material original tinha o nome de Kuching, em alusão ao local de origem. No Estado do Pará também é conhecida como pretinha. As plantas tem formato cilíndrico, folhas pequenas e estreitas, espigas curtas com comprimento médio em torno de 7,0 cm e frutos de tamanho médio (Figura 1-a). Não apresenta resistência às principais doenças (fusariose, podridão do pé e viroses), porém apresenta resistência à murcha amarela. A colheita das espigas ocorre no período de agosto a outubro. É recomendada para pequenos, médios e grandes produtores, para condições de solos de textura média com boa drenagem.

Guajarina: Descende da cultivar Arkulam Munda, foi introduzida da Índia por volta de 1970. A planta apresenta formato cilíndrico quando adulta, com folhas alongadas e de tamanho médio; espigas longas, com comprimento médio de 12,0 cm, com mais de 90% de flores hermafroditas; os frutos apresentam bom enchimento nas espigas, sendo esféricos e graúdos (Figura 1-b). É suscetível a fusariose, podridão do pé, murcha amarela e viroses. A colheita ocorre de agosto a outubro. É recomendada para ambientes com período de estiagem definidos e solos bem drenados, em áreas sem ocorrência de murcha amarela.

Kuthiravally: Proveniente de Kerala, sul da Índia e foi introduzida no Brasil na década de 80. Apresenta folhas largas com em média de 10,12 cm e comprimento médio de 15,75 cm; espigas longas com comprimento médio de 12,04 cm e extremidade recurvada repleta de frutos graúdos (0,49 cm de diâmetro) de maturação mais tardia (Figura 1-c). É resistente à murcha amarela causada por *F. oxysporum*, mas suscetível à podridão das raízes e secamento dos ramos (*F. solani* f.sp. *piperis*). Sua colheita é tardia e ocorre no período de setembro a novembro. Os solos para o cultivo devem ser de textura média e bem drenados podendo ser consorciada principalmente com espécies arbórea e algumas essências florestais.

Bento: Provém de uma seleção feita pelo produtor no município de Santa Izabel da Pará. Provavelmente trata-se de um material segregante da cultivar Guajarina devido à semelhança de alguns caracteres morfológicos. Apresenta folhas largas de aproximadamente 8,5 cm com comprimento médio de 17,44 cm; espigas longas com comprimento médio de 13,36 cm; os frutos são graúdos (Figura 1-d). É suscetível a fusariose, podridão do pé, e apresenta pouca tolerância à murcha amarela e viroses. A colheita ocorre de julho a setembro (POLTRONIERI, mídia digita, 2012).

Figura 1. Principais cultivares de pimenteira-do-reino. a. Cingapura; b. Guajarina; c; e. Kuthiravally.



Fotos: a, b, c - Oriel Filgueira de Lemos ; d- Lana Roberta Reis dos Santos
Fonte: LEMOS et al., 2011.

É importante ressaltar que, embora as cultivares não apresentem resistência a fusariose, principal doença da pimenteira-do-reino, é notório a utilização dessas no sentido de diversificar o material de cultivo predominantemente de Cingapura, evitando assim a uniformidade genética, através da utilização de uma única cultivar. Um ciclo de produtividade elevada mais precoce torna-se muito vantajoso sob o ponto de vista econômico, possibilitando melhor convivência com doença importante como a fusariose (POLTRONIERI et al., 2005).

2.4 Principais doenças da pimenteira-do-reino

2.4.1 Fusariose e viroses

Os problemas fitossanitários observados na pipericultura ao longo dos anos foram muitos, dentre os quais, destaca-se a fusariose que leva a morte das plantas, reduz a vida útil

da lavoura e causa sérios prejuízos ao agricultor devido ao alto investimento na implantação da lavoura (DUARTE; ALBUQUERQUE, 1997; SILVA et al., 2011).

Dentre as estratégias de controle da fusariose, a aplicação de fungicidas tem sido tradicionalmente recomendada. Porém, a eficiência biológica e econômica do controle químico é limitada, podendo causar, ainda, prejuízos ao ambiente. A aplicação de materiais orgânicos no solo pode ser considerada como uma alternativa de controle dessa doença (BENCHIMOL et al., 2006).

Segundo Van Bellen (2005) utilizando os recursos naturais de forma inteligente, pode-se garantir qualidade de vida para as futuras gerações. Por meio destas diretrizes, a pode-se buscar o desenvolvimento sustentável sem degradar o meio ambiente. É neste sentido que, apesar das dificuldades, estudos têm sido direcionados na tentativa de controlar a fusariose. Um dos mais recentes é a metodologia para o controle alternativo ainda na fase de produção de mudas, a partir da utilização de folhas de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.) incorporadas ao solo onde as mudas crescem e permite que estas sejam transplantadas para o campo totalmente livres da doença (TREMACOLDI, 2011).

Outras causas possíveis de serem mencionada como motivo de redução da produção e exportação brasileira, principalmente a paraense, são as doenças causadas pelos vírus como o *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV). Há poucos estudos voltados para estas viroses que afetam a pimenteira-do-reino. No Brasil, o CMV foi relatado pela primeira vez em lavouras de pimenteira-do-reino no município de Tomé-Açu, no Pará (COSTA et al., 1970), e em 1990 apresentou-se em outros Estados como Minas Gerais e Espírito Santo.

Os sintomas de mosaico causados pelo ataque do vírus CMV são folhas com áreas cloróticas dispersas pelo tecido verde das folhas formando um mosqueado típico e malformação foliar, espigas curtas e falhadas. Porém, dependendo da cultivar infectada, os sintomas podem se apresentar de diferentes maneira (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2004). A doença mosqueado-amarelo, causada pelo PYMoV, afeta folhas jovens e se caracteriza pelo aparecimento de pontos cloróticos brilhantes e dispersos na folha ou entre as nervuras. As folhas são deformadas com bordas onduladas. Também ocorre folhagem raleada e, conseqüentemente, redução no tamanho e número de frutos por espiga (BOARI, 2008).

2.5 Ontogênese

Ontogenia ou ontogênese é o estudo das origens e desenvolvimento de um organismo desde o embrião (ovo fertilizado), dos diferentes estádios até sua plena forma desenvolvida. A ontogenia é estudada em biologia do desenvolvimento. Em termos gerais, ontogenia é definida como a história das mudanças estruturais de uma determinada unidade, que pode ser uma célula, um organismo ou uma sociedade de organismos, sem que haja perda da organização que permite aquela unidade existir (MATURANA; VARELA, 1992). Mais recentemente, o termo ontogenia tem sido usado na biologia celular para descrever o desenvolvimento de vários tipos celulares num organismo determinado.

Um vegetal de interesse econômico, como uma planta de cultivo anual em crescimento, apresenta diferentes fases. No início, como depende de reservas contidas nas sementes, o crescimento é lento; posteriormente, após o desenvolvimento do sistema radicular e emergência das folhas, há um rápido crescimento por meio da retirada de água e nutrientes do substrato onde encontra-se e a partir de sua atividade fotossintética. Após atingir o tamanho definitivo, entra para a fase de senescência, que resulta em um decréscimo no acúmulo de matéria seca. Uma cultura anual, em condições ecológicas adequadas, ocupa, no período total de crescimento, em termos de porcentagem, 10% para germinar, 6% para emergir, 51% no grande período de crescimento, 15% para reprodução, 8% na maturação e 10% até a colheita (LUCCHESI, 1984).

A fisiologia do crescimento e do desenvolvimento permite acompanhar o ciclo biológico de um vegetal, fase por fase, desde a formação do zigoto até ao estado adulto, isto é, o seu desenvolvimento ontogenético. É óbvio que, para apreender-se claramente o comportamento ontogenético de um organismo, é necessário analisar a sequência dos fenômenos que nele se sucedem (ACCORSI et al., 1966).

Vários estudos utilizando a ontogênese para o melhor conhecimento do crescimento e desenvolvimento de organismos vegetais têm sido aplicado para as mais diferentes situações com intuito de obter respostas quanto ao comportamento de tais organismos quando submetidos a diferentes situações. Isto pode ser visto nos estudos de Sampaio (2005) analisando a ontogênese floral, esporo e gametogênese em anteras de *Aeschynomene falcata* (Poir) DC. e *Aeschynomene sensitiva* Sw. (Papilionoideae – Leguminosae) obtendo evidências morfológicas e anatômicas de importância relevante para a taxonomia do grupo.

Polovnikova e Voskresenskaya (2008) analisaram as atividades de componentes antioxidantes e de polifenol oxidase na ontogenia de órgãos vegetativos de trevo violeta (*Trifolium pratense* L.) e prado festuca (*Festuca pratensis* Huds.) crescendo em condições de cidade. Observaram que em todas as fases de desenvolvimento, a espécie prado festuca mostrou-se mais tolerantes e foi caracterizada pelo menor teor dos compostos estudados do que o trevo violeta, que mostrou-se mais sensíveis ao habitarem em territórios de cidade caracterizada pela influência da poluição industrial. Portanto, um dos fatores determinantes de sobrevivência das plantas na megapolis é sua tolerância aos compostos fitotóxicos contaminantes do solo e do ar.

Em ontogênese de pimenteira-do-reino, Lemos et al. (2010a) realizaram trabalhos para avaliar a germinação *ex situ* de sementes de pimenteira-do-reino de diferentes cultivares até a formação da plântula. Em outra pesquisa, Lemos et al. (2010b) analisaram ontogenia *in vitro* de quatro cultivares de pimenteira-do-reino. Nestes estudos, obtiveram resultados quanto aos estádios de desenvolvimento germinativo (sementes intumescidas em nível do embrião; emissão e alongamento da radícula; emissão de caulículo; emissão de hipocótilo; emissão de cotilédones; emissão de epicótilo e plântulas formadas) de diferentes genótipos.

2.6 Métodos de propagação

Do ponto de vista biológico, os organismos vivos reproduzem-se sexual e/ou assexuadamente. No primeiro caso, a variabilidade genética e a evolução são favorecidas; no segundo, isso não acontece. Do ponto de vista comercial, é interessante que cultivares de importância agrônômica sejam propagadas assexuadamente, pois esse tipo de propagação resulta em plantas uniformes quanto ao seu fenótipo, ou seja, crescimento, floração, frutificação etc (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010a).

O processo de propagação da pimenteira-do-reino mais utilizado para implantação de plantios comerciais é a propagação vegetativa, ou também chamada de reprodução clonal, que consiste no enraizamento de estacas, que se inicia pelo pré-enraizamento em canteiros, promovendo um crescimento rápido, precoce e uniforme. Além de menos trabalhoso, esse método traz ainda outras vantagens como a facilidade no desenvolvimento de raízes e a

conservação de todas as características da planta matriz, como vigor e produtividade (PROJETO PAS CAMPO, 2004).

Contudo, a vulnerabilidade das cultivares ao ataque do patógeno é favorecida pela forma de propagação assexuada utilizada que beneficia a disseminação da doença devido à propagação por estacas provenientes de material original de má qualidade e das cultivares comerciais serem susceptíveis a doenças (LEMOS et al., 2011).

Não se recomenda propagar a pimenteira-do-reino por sementes, pois a propagação sexuada apresenta desenvolvimento muito lento, frutificação irregular e tardia e rendimento muito baixo (COSTA et al., 2005). Entretanto, devido à propagação sexuada ter como vantagem a geração de variabilidade genética nos indivíduos, a propagação por sementes de pimenteira-do-reino é adotada basicamente em programas de melhoramento genético. Ressalta-se que a viabilidade das sementes é perdida rapidamente após 40-50 dias de armazenamento e a germinação ocorre aos 15 a 90 dias após a sementeira, dependendo da cultivar e das condições de cultivo (NAMBIAR et al., 1978; LEMOS, 2003).

2.7 Biotecnologia: cultura de tecidos e micropropagação

A moderna biotecnologia utiliza, dentre outras, tecnologias avançadas de genética, a biologia molecular, a cultura de células e tecidos, a engenharia genética e a clonagem, sendo vasta sua aplicação também no setor agropecuário. Sua utilização na pesquisa agrônômica é importante entre outras vantagens, pelo aumento da velocidade de geração de novas tecnologias, o que é um dos empecilhos com que se debatem as atuais técnicas do melhoramento clássico (BARBOSA, 2002).

A cultura de tecidos de plantas é um termo que exprime o conceito de que uma ampla gama de tipos de tecidos e órgãos vegetais da planta podem ser cultivados sob condições assépticas e *in vitro*, visando a micropropagação, ou a multiplicação *in vitro*, auxiliar o melhoramento genético, a conservação e a limpeza clonal (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010a) podendo também ser utilizada para intercâmbio e avaliação de germoplasma (ANDRADE, 2002).

Desse modo, a propagação *in vitro* de plantas, também chamada de micropropagação, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro sob

adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂. É uma parte importante de biotecnologia, conjuntamente com outras duas áreas: DNA recombinante e fermentação (BARRUETO CID, 2001).

Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais são capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes (qualquer parte da planta destinada ao uso *in vitro*) são uma mistura de células em variados estados fisiológicos, bioquímicos e de desenvolvimento. Nesse sentido, espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares (ANDRADE, 2002).

Entretanto, nem todos os explantes reagem da mesma forma a uma determinada condição *in vitro* (DHAR; JOSHI, 2005). Os requerimentos nutricionais e hormonais também poderão variar conforme o explante, ou seja, o nível morfológico deste poderá influir no processo havendo a necessidade de adicionar alguns ingredientes e ou reduzir outros (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010a).

Para Zhang et al. (2003), os meios nutritivos e a sua composição operam o “milagre” da vida, ou seja, a conversão dos explantes em plântulas e das plântulas em mudas, as quais têm o caráter clonal embutido em sua natureza e, por isso, possuem caráter de genótipo superior. São muitos os fatores que estão envolvidos em um protocolo eficiente de regeneração: a condição da cultura (meio de cultura, reguladores de crescimento, concentração de sacarose, luz, temperatura, recipientes), a fonte de explante (folha, raiz, caule, meristema etc) e o genótipo (espécie, cultivar ou variedade que esta sendo utilizada).

Visto isso, a micropropagação constitui uma ferramenta importante para a multiplicação de genótipos desejáveis bem como para a conservação *in vitro*, para o intercâmbio de germoplasma e para produção padronizada de mudas originando plantas com desenvolvimento homogêneo (LIMA et al., 2003).

A tecnologia de micropropagação, apesar de proporcionar a obtenção de um maior número de plantas com alta qualidade fitossanitária em um menor período de tempo, ainda apresenta um custo elevado quando comparada aos métodos convencionais de propagação (JUNGHANS et al., 2009).

Para Oliveira (2010) são muitas as vantagens da micropropagação, ou seja, além da produção de mudas em grande escala em qualquer época do ano e com economia de tempo e espaço pode-se incluir: a) rápida disponibilização de um grande número de mudas de materiais selecionados; b) homogeneidade no desenvolvimento das mudas, que permite a uniformização do plantio facilitando o planejamento das práticas culturais e o manejo, pois as

mudas manterão o mesmo padrão de desenvolvimento; e c) obtenção de plantas com características genéticas idênticas à matriz.

Segundo Castro et al. (2009), basicamente todos os protocolos de micropropagação envolvem as seguintes etapas: seleção de plantas matrizes e dos explantes, limpeza e assepsia do material vegetal, estabelecimento da cultura *in vitro*, multiplicação *in vitro*, enraizamento *in vitro* e aclimatização das plantas.

A propagação *in vitro* de plantas tem despertado grande interesse, seja pela produção de plantas livres de patógenos e de material elite, ou pela produção de mudas em grande escala em curto tempo (LEMOS, 2003). É neste sentido que a Embrapa Amazônia Oriental tem pesquisado a micropropagação, a cultura de embrião e a regeneração de plantas *in vitro* de pimenteira-do-reino, desde 1997. A partir de 1999, essa instituição de pesquisa tem adotado os seguintes métodos de melhoramento para a pimenteira-do-reino: hibridação intraespecífica; hibridação interespecífica; e indução de mutações através de radiação gama de fonte ^{60}Co . Nos três métodos estão incluídas as fases em que as técnicas da moderna biotecnologia, ou seja, germinação *in vitro*, micropropagação e manutenção *in vitro* são utilizadas (POLTRONIERI et al., 1999; BARBOSA, 2002).

Estudos desenvolvidos por Lemos (2003) com pimenteira-do-reino utilizando estratégias apropriadas para aplicação de mutagenese associada às técnicas *in vitro*, fez-se necessário a definição de protocolo de micropropagação entre outras técnicas. Moura et al. (2008) utilizaram a micropropagação para avaliar diferentes concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenteira-do-reino.

De maneira geral, para pimenteira-do-reino, a metodologia utilizada nestes e outros estudos passa pela seleção do material a ser utilizado (cultivar); coleta de frutos maduros para obtenção das sementes, ou coleta de estacas de ramos ortotrópicos com dois ou três nós para formação de mudas para utilização de gemas e ápices caulinares; assepsia do material (em câmara de fluxo laminar, com álcool 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2% por 15 minutos em agitação, e lavagens em água destilada autoclavada por cinco vezes); germinação *in vitro* em meio de cultura com a metade dos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de vitaminas, sacarose a 3% e ágar a 0,65% para solidificação, adição ou não de carvão ativado, combinado ou não com NaH_2PO_4 ; estabelecimento da cultura [meio MS suplementando com concentrações da auxina (ácido indolacético - AIA) e/ou citocinina (6-benzilaminopurina - BAP) combinado ou não com carvão ativado]; proliferação de brotos (meio MS com concentrações de AIA e/ou BAP); enraizamento de

brotos (metade da concentração dos sais de MS suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético - NAA); aclimatização e formação de mudas.

De modo mais específico, a cultura de tecidos tem-se mostrado uma alternativa para manipular plantas cultivadas, como é o caso da pimenteira-do-reino. Para tanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é crucial, pois esta é a maior limitação na aplicação da moderna biotecnologia para o melhoramento vegetal (BARBOSA, 2002).

3 ONTOGÊNESE, MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)

3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae e inclui a espécie pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), planta trepadeira perene que cresce aderida a tutores de madeira ou troncos de árvores podendo atingir até cinco metros de altura, produzindo frutos pequenos e globoso do tipo baga com uma só semente os quais são amplamente comercializados como condimentos alimentares. Sua cultura é milenar tendo a exploração e o comércio iniciados na Índia, de onde se espalhou para Oriente Médio e a Europa (SILVA; SOUZA, 2009).

A pimenta-do-reino se destaca no comércio mundial como uma das especiarias mais comercializadas e utilizadas pelo homem, ocorrendo desde a antiguidade (NEPOMUCENO, 2005). Isso porque a planta gera vários produtos que são utilizados em escala doméstica ou em escala industrial de processamento de alimentos (BASTOS et al, 2008).

Segundo dados do International Pepper Community – IPC (2011), em 2010, a área total cultivada foi de 476,5 mil hectares, sendo 38,19% na Índia, seguida da Indonésia (30,43%), Vietnã (10,49%), Sri Lanka (6,45%), China (5,04%). O Brasil ocupou o sexto lugar com 20.000 hectares, participando com 4,20% do total (ANEXO C). Esse quadro reflete diretamente na produção brasileira que em 2010 o Brasil ocupou o quarto lugar (34.000 t), porém em 2003 este volume foi de 50.000 t, ou seja, houve um declínio na produção de 16.000 t e isto ocorreu gradativamente ao longo desses anos.

O quadro brasileiro em termos de área cultivada, área colhida e produção de pimenteira-do-reino é apenas um reflexo dos dados apresentados pelo Estado do Pará que contribui com quase 80% da produção nacional, seguido do Estado do Espírito Santo (15,28%), Bahia (9,62%), Paraíba (2,37%) e Maranhão (0,94%).

Apesar da importância econômica da cultura para o Brasil e para o Pará, o quadro produtivo do Estado sofre muitas oscilações provocadas por vários fatores, como a baixa cotação em alguns anos do produto no mercado interno e, mais acentuadamente, por problemas fitossanitários (BASTOS et al, 2008). A Amazônia, de clima quente e úmido, possui condições favoráveis à produção agrícola, apresenta alta diversidade biológica cujas

espécies podem tornar-se pragas e doenças dos cultivos de interesse econômico como é o caso da pimenteira-do-reino. Tal fato pode levar à redução da produtividade e, conseqüentemente, à perda de competitividade do agronegócio (LUNZ et al., 2007).

A inclusão das técnicas da moderna biotecnologia abrem perspectivas para melhores possibilidades de avanços em pesquisas agrônômicas e estudos de diversas culturas de importância econômica (BARBOSA, 2002), como é o caso da pimenteira-do-reino. Uma das técnicas para auxiliar um programa de melhoramento genético é utilizar-se da cultura de tecidos como ferramenta, sendo a micropropagação uma dessas vias. Para a micropropagação é necessário que se tenham plantas de qualidade para serem doadoras de explante. Sendo assim, uma das formas para obtenção de plantas sadias para servirem de doadoras de explantes por meio da germinação *in vitro*.

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em pimenteira-do-reino vem sendo realizada desde a década de 80 quando Mathews e Rao (1984) verificaram a formação de calos na maioria dos explantes usados no estudo (segmentos de hipocótilo, gemas axilares, ápice caulinar), em meio de cultura contendo uma larga combinação de auxina-citocinina, com exceção de segmentos de folha e tecido de antera. Além disso, observaram que ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* diferenciaram em múltiplas brotações quando cultivado em meio MS contendo os reguladores de crescimento: ácido indolacético (IAA) e 6-benziladenina (BA), 1 mg L⁻¹ de cada, e posteriormente enraizados em meio contendo a metade da concentração dos sais MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (NAA).

Desde então, outros estudos vem sendo desenvolvidos sobre a micropropagação de pimenteira-do-reino. Lemos (2003), em seu trabalho sobre mutagênese de pimenteira-do-reino, precisou definir um processo de micropropagação. Este utilizou ápices caulinares e gemas axilares em meio MS suplementados com diferentes combinações dos reguladores de crescimento (BAP x IAA) visando à proliferação de brotos.

Moura et al. (2008), também realizou estudos objetivando testar o efeito de concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), porém com adição de carvão ativado em alguns caracteres avaliados nas fases de estabelecimento e proliferação de brotos da pimenteira-do-reino via ápices caulinares a fim de contribuir para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação da espécie.

Visto isso, é possível observar a importância da utilização dos reguladores de crescimento no processo de micropropagação, uma vez que estes induzem respostas fisiológicas na planta, tais como indução de raízes, indução de brotações, alongamento de

entrenós etc. Para Taiz e Zeiger (2009), as citocininas atuam regulando muitos processos celulares, controle da divisão celular e o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal.

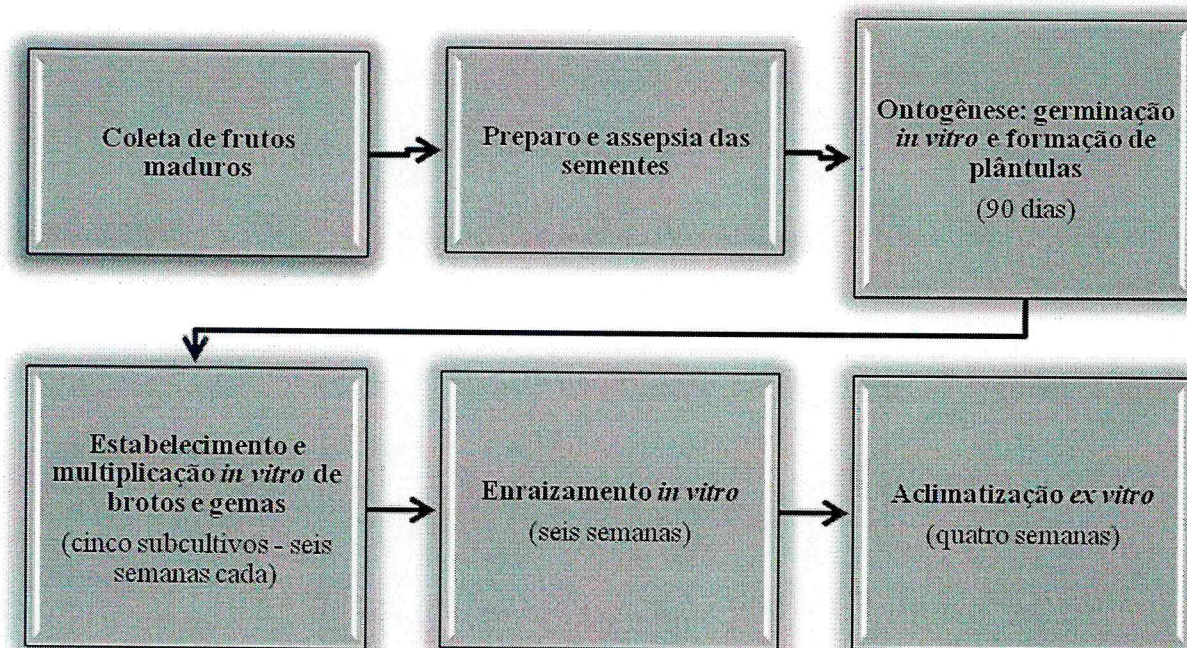
A produção de mudas via cultura de tecido são de custos elevados, por isso, deve-se investir também em pesquisas envolvendo as fases finais do processo de micropropagação, enraizamentos para posterior aclimatização com elevadas taxas de sobrevivência. Para Arigita et al. (2002), a baixa eficiência de aclimatização pode ser devido à heterotrofia dos tecidos cultivados, resultantes do ambiente imposto pelas condições de cultivo *in vitro*. Entre os fatores relacionados à condição heterotrófica das plantas *in vitro*, destaca-se a adição de fonte de carboidrato ao meio de cultura (DIGNART et al., 2009). Essa condição de cultivo pode resultar em alterações morfológicas e fisiológicas que são responsáveis por grande parte das perdas de plântulas durante a aclimatização.

À vista desse conhecimento, este trabalho teve como objetivo avaliar a ontogênese, a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de cultivares de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.) pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. As cultivares de pimenteira-do-reino estudadas foram: Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally. O trabalho constou das seguintes etapas: germinação, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização *ex vitro*, sendo esta última etapa instalada em casa de vegetação (Figura 2).

Figura 2. Sequência das etapas desenvolvidas desde a coleta dos frutos para germinação das sementes *in vitro* e acompanhamento da ontogenia, passando pela multiplicação, enraizamento *in vitro* até a aclimatização *ex vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino. Belém, PA. 2012.



3.2.1 Coleta dos frutos e assepsia das sementes

Para produção de plântulas, frutos de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.) das cultivares descritas foram coletados de plantas cultivadas no banco ativo de germoplasma (BAG) de pimenteira-do-reino, localizado na Embrapa Amazônia Oriental – Belém/Pará, em estágio maduro de coloração amarelo a vermelho (Figura 3-a), os quais foram conduzidas ao laboratório e submetidos à pré-assepsia que constou de despulpamento manual das sementes,

lavagem em água corrente com detergente líquido, imersão em solução de fungicida derosal a 0,2% durante 20 minutos e imersão em a hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por cerca de 12 horas em estufa a 37 °C (Figura 3-b).

Figura 3: Em “a”, frutos maduros de pimenteira-do-reino selecionados para submissão ao processo de assepsia. Em “b”, sementes imersas em solução de NaClO e mantidas em estufa a 37 °C. Embrapa Amazônia Oriental – Belém/PA, 2012.



Em câmara de fluxo laminar, as sementes de cada cultivar foram submetidas à solução de álcool 70% (v/v) por um minuto e a solução de NaClO a 1,5% (v/v) por 15 minutos. Em seguida estas foram lavadas por cinco vezes em água destilada autoclavada e transferidas para placas de Petri esterilizadas para posterior semeio *in vitro*.

3.2.2 Ontogênese: germinação *in vitro* e formação de plântulas

Sob câmara de fluxo laminar, as sementes assépticas das cultivares de pimenteira-do-reino foram semeadas (Figura 4-a) em frascos cilíndricos de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo a concentração completa ou com metade ($\frac{1}{2}$ MS) da concentração dos sais, 3% de sacarose, vitamina de MS, 0,2 % de phytigel para solidificação do meio de cultura, adição ou não de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), variando suas concentrações, e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. O ensaio foi constituído de

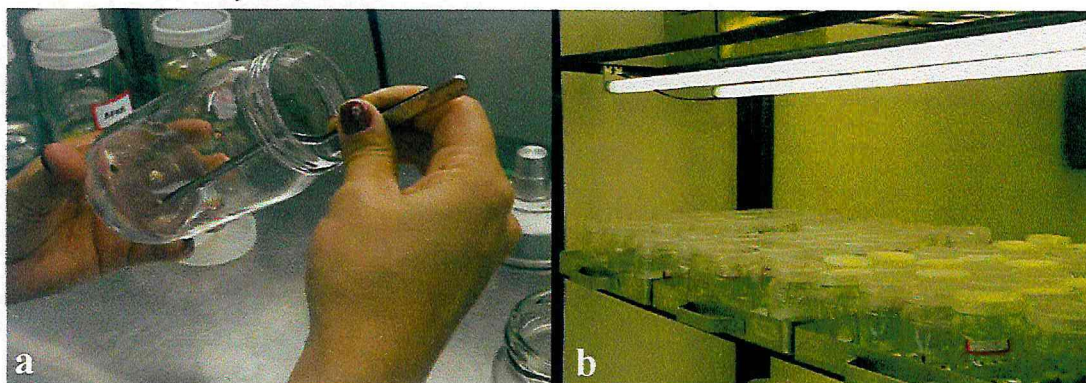
cinco tratamentos distribuídos de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos usados para germinação *in vitro* de sementes das quatro cultivares de pimenteira-do-reino.

Tratamentos	Concentração	
	NaH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	Sais de MS
T1 (testemunha)	0	½ MS
T2	0,10	½ MS
T3	0,17	½ MS
T4	0,25	½ MS
T5	0	MS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com três repetições para cada tratamento representadas por um frasco com cinco sementes. A incubação foi em sala de crescimento sob condições controlada de iluminação e temperatura com fotoperíodo de 16 h luz.dia⁻¹, com intensidade de luz de cerca de 3.000 lux, proporcionada por três lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w e temperatura ambiente de 25 ± 3 °C (Figura 4-b).

Figura 4. Em “a”: inoculação, em meio de cultura, de sementes de pimenteira-do-reino; em “b”: cultivo das sementes em sala de crescimento em meio de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.



Os dados tomados aos 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 dias de cultivo referem-se aos estádios de desenvolvimento observados quanto às sementes sem respostas (SSR), intumescidas ao nível do embrião (INE), emissão de radícula (ERD), emissão de caulículo (ECL), emissão do hipocótilo (EHP), emissão de cotilédones (ECT) e plântula formada a partir da emissão do epicótilo (EEP). A Avaliação do experimento foi realizada quanto à percentagem de respostas para cada estágio de desenvolvimento durante a germinação *in vitro*

das diferentes cultivares de pimenteira-do-reino considerando cada tratamento as quais foram submetidas.

3.2.3 Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos e gemas

As plântulas das cultivares de pimenteira-do-reino doadoras de explantes germinadas *in vitro* estavam com 130 dias de cultivo. Estas foram incisadas e os explantes assépticos obtidos, ápices caulinares e gemas axilares, (Figura 5) foram submetidos ao estabelecimento *in vitro* em meio de cultura MS, com sacarose a 3% e phytigel a 0,2%, suplementados com diferentes combinações dos reguladores de crescimento thidiazuron (TDZ) e/ou 6-benzilaminopurina (BAP). As combinações utilizadas de fitoreguladores constituíram de TDZ (0,0 ou 0,05 mg L⁻¹) e BAP (0,5; 1,0 ou 2,0 mg L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 sendo em seguida distribuídos em tubos de ensaio (25 x 170 mm) com 20 ml de meio de cultura, vedados com papel alumínio e filme de PVC resinite e submetidos à autoclavagem a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições laboratoriais de cultivo foram de fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹, com intensidade de luminosa de 3.000 lux proporcionada por três lâmpadas fluorescentes brancas por prateleira e temperatura de 25 ± 3 °C.

Visando à proliferação de brotos e de gemas apicais e axilares, após a fase de estabelecimento, os brotos gerados incisados para obtenção de explantes de ápices caulinares e gemas axilares, os quais foram cultivados nas mesmas condições de cultivo impostas durante o estabelecimento, tanto para os meios de cultivo como para as condições laboratoriais. Os recipientes utilizados eram frascos cilíndricos de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura básico. Houve realizados cinco subcultivos, cada um com duração de seis semanas. As avaliações feitas a cada subcultivo foram quanto ao número de gemas por explante e o número de brotos por explante.

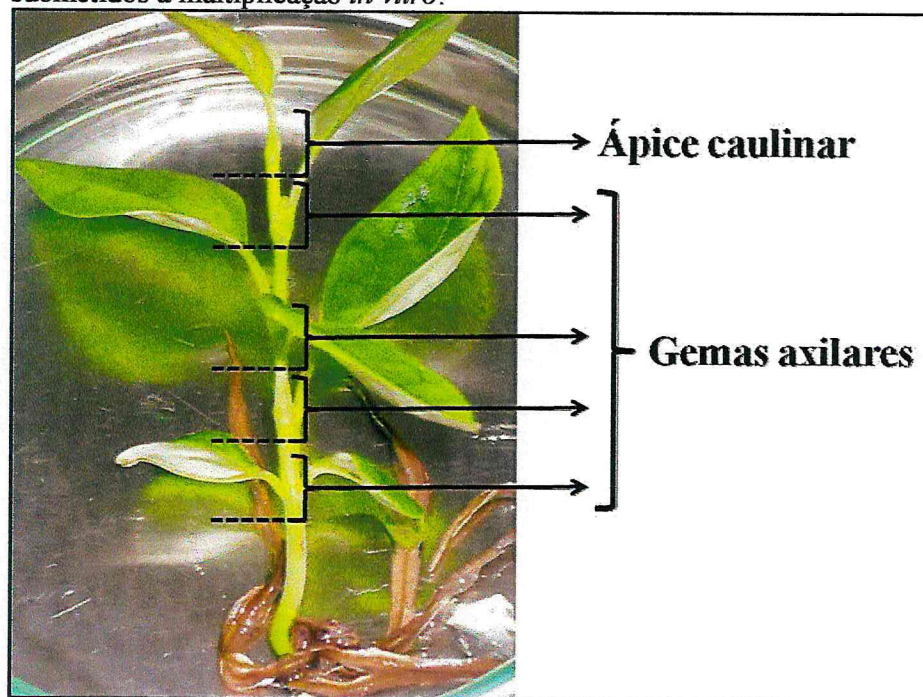
O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5, ou seja, quatro cultivares e cinco combinações dos fitoreguladores (TDZ x BAP) (Quadro 1), totalizando 20 interações, cada uma variando o número de repetições a cada subcultivo. Cada repetição foi representada por um frasco contendo de 4 a 5 explante. Os dados, número de brotos e número de gemas, foram submetidos à análise de variância e as

médias da interação entre cultivar e tratamento foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, caso houvesse diferença entre elas.

Quadro 1. Tratamentos usados na multiplicação *in vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino.

Cultivares	TDZ (mg L^{-1})	BAP (mg L^{-1})	Tratamentos
Bento	0,0	0,5	T1
Cingapura		1,0	T2
Guajarina		2,0	T3
Kuthiravally	0,05	0,5	T4
		1,0	T5

Figura 5. Plântula de pimenteira-do-reino aos 130 dias após o semeio *in vitro*. Detalhes dos locais de excisão para obtenção dos explantes a serem submetidos à multiplicação *in vitro*.



3.2.4 Enraizamento *in vitro*

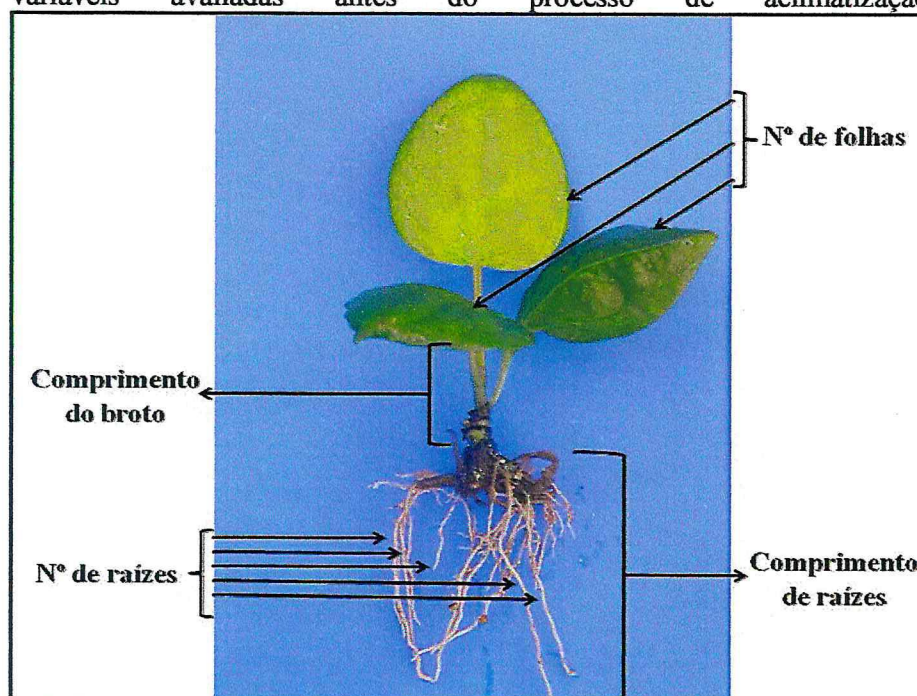
Após o quinto subcultivo os brotos das cultivares foram inoculados em frascos de vidro cilíndricos de 300 mL contendo 40 mL de meio básico de cultura para indução do enraizamento. O meio de cultura foi constituído da $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (NAA) e phytigel a 0,2%. As concentrações de sacarose testadas

foram de 15; 30; 45; 60 g L⁻¹ e sua ausência no meio de cultura (controle). Após o preparo dos meios de cultura, todos os tratamentos tiveram o pH do meio ajustado para 5,8 e em seguida distribuídos em frascos cilíndricos de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura básico sendo submetidos à autoclavagem a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. As condições laboratoriais de cultivo em sala de crescimento foram de fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹, com intensidade de luminosa de 3.000 lux proporcionada por três lâmpadas fluorescentes brancas por prateleira e temperatura de 25 ± 3 °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5, ou seja, quatro cultivares e cinco concentrações de sacarose, totalizando 20 tratamentos, cada um com número variado de repetições, de 8 a 11, e com número de brotos de 7 a 10 por repetição.

O cultivo foi mantido por seis semanas em sala de crescimento nas condições laboratoriais citadas anteriormente. Após este período, as avaliações realizadas foram quanto à indução de raízes, sendo observado o número de raízes por broto, o comprimento médio das raízes por broto, o comprimento dos brotos e o número de folhas por broto (Figura 6). Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade, caso houvesse diferença entre elas.

Figura 6. Broto de pimenteira-do-reino enraizado *in vitro* mostrando as variáveis avaliadas antes do processo de aclimatização.



3.2.5 Aclimatização

Os brotos enraizados *in vitro*, também chamados “plantlets”, das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino foram os provenientes do experimento de enraizamento que utilizou o meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA e quatro concentrações de sacarose ($15, 30, 45$ e 60 g L^{-1}) sendo o cultivo mantido em sala de crescimento em condições laboratoriais de fotoperíodo de $16 \text{ h luz dia}^{-1}$, com intensidade de luminosa de 3.000 lux proporcionada por três lâmpadas fluorescentes brancas por prateleira e temperatura de $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ pelo período de seis semanas.

As plântulas *in vitro* foram encaminhadas a sala de lavagem para serem retiradas dos frascos e as raízes lavadas em água destilada para retirada do resíduo de meio de cultura, antes de serem transferidas para bandejas plásticas de polipropileno com 24 células, com duas plântulas por célula, utilizando o substrato vermiculita para aclimatização (Figura 7). Em casa de vegetação na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA as bandejas foram mantidas com irrigação intermitente por duas vezes ao dia até que a umidade do substrato nas células das bandejas fosse à desejada. Quinzenalmente, estas foram nutridas com solução de $\frac{1}{2}$ MS com 10 mL em cada célula. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, variando de 4 a 7 o número de repetições. Os dados tomados a cada semana, durante quatro semanas, foram quanto ao percentual de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização.

Figura 7. Plântulas das cultivares de pimenteira-do-reino, provenientes do enraizamento *in vitro*, submetidas à aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação. Embrapa Amazônia Oriental. Belém/PA.



3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Ontogênese: germinação *in vitro* e formação de plântulas

A caracterização morfológica identificada nas cultivares estudadas como as primeiras manifestações de germinação iniciam-se entre o 20º e 30º dia após a semeadura com o intumescimento da micrópila ao nível do embrião (INE) (Figura 8-b) em todas as cultivares testadas. Em seguida, a radícula rompe o tegumento, dando início à germinação ao 30º dia de cultivo, porém esta protrusão de emissão de radícula (ERD) ocorre em maior proporção aos 40 dias após o semeio. A radícula, que possui coloração esbranquiçada é glabra, alonga-se formando uma curva para baixo empurrando o tegumento que contém os cotilédones para cima (Figura 8-c).

Aos 50 dias, a raiz começa a apresentar escurecimento em sua coloração, ganhando tonalidade levemente amarronzada. As raízes secundárias começam a surgir e pêlos translúcidos passam a ser percebidos. O ápice para emissão do caulículo (ECL) (Figura 8-d) ocorre neste período e perdura por pouco tempo, no máximo dois dias, pois logo há o surgimento do hipocótilo (EHP) (Figura 8-e), que aos 60 dias após semeadura apresentou-se em maior número nas plântulas observadas das quatro cultivares. O caulículo distingui-se do hipocótilo porque esse se apresenta curvado e com coloração verde-clara, enquanto que o hipocótilo é epígeo, cilíndrico e longo em relação ao epicótilo, também diferindo em sua coloração a qual é verde-escura.

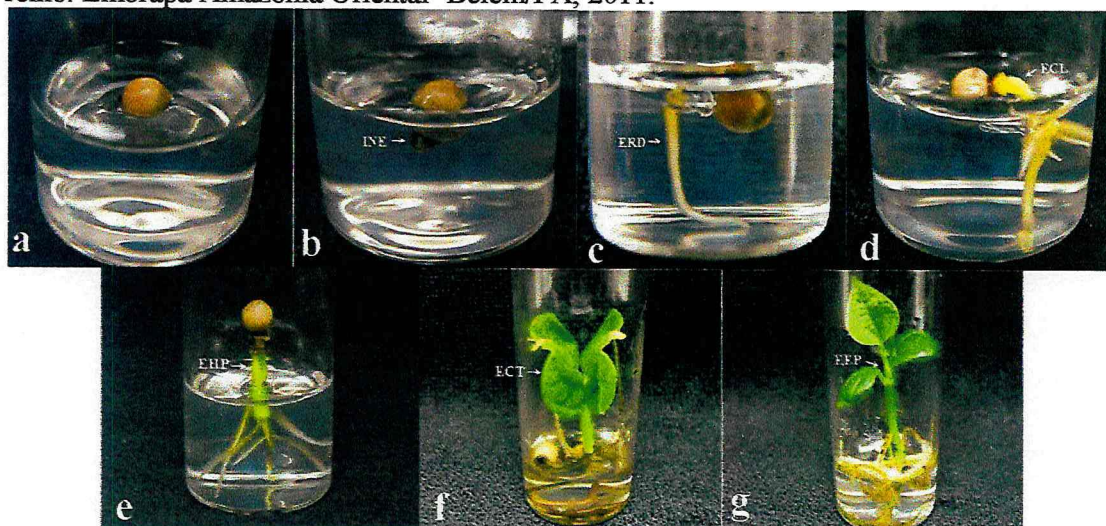
A fase subsequente tem culminância aos 70 dias de cultivo com a emissão dos cotilédones (ECT) (Figura 8-f) caracterizados por serem opostos, livres, sésseis e apresentando coloração verde-escuro. O epicótilo (EEP) (Figura 8-g) começa a surgir discretamente entre os cotilédones aos 70 dias após o semeio, porém seu ápice foi percebido no 90º dia de cultivo, pois primeiramente surge a primeira folha permanente para depois o epicótilo alongar-se.

De acordo com a classificação de Duke e Polhill (1981) a espécie apresenta germinação epígea, devido os cotilédones se elevarem acima do substrato, e fanerocotiledonar, pelo motivo dos cotilédones saírem por completo do tegumento.

Estudos que visam o conhecimento da morfologia de plântulas são ainda escassos na literatura (MELO et al., 2004). Entretanto, na botânica sistemática somente os caracteres de

planta adulta são frequentemente utilizados, enquanto as características das plântulas são pouco adotadas, talvez pela limitação de dados e falta de tradição. A observação do desenvolvimento da plântula permite diferenciar grupos taxonômicos muito semelhantes entre si, bem como auxiliar nos estudos de regeneração e nos trabalhos de melhoramento genético, além do reconhecimento das espécies em viveiros de produção e em campo (SILVA et al., 2008).

Figura 8. Estádios de desenvolvimento ao longo de 90 dias após semeio de pimenteira-do-reino. Embrapa Amazônia Oriental- Belém/PA, 2011.



Legenda: a – SSR (sementes sem respostas), b- INE (intumescidas ao nível do embrião), c – ERD (emissão de radícula), d – ECL (emissão de caulículo), e – EHP (emissão do hipocótilo), f – ECT (emissão de cotilédones), g – EEP (emissão do epicótilo).

Em relação aos tratamentos, independentes das cultivares estudadas, uma vez que estas apresentaram a mesma performance no decorrer das observações, estes influenciaram nos aspectos morfológicos no processo de germinação *in vitro* apresentando períodos de culminância durante os estádios de desenvolvimentos. De maneira geral, observou-se que os estádios iniciais da germinação, intumescimento ao nível do embrião (INE) e emissão de radícula (ERD), apresentaram percentuais maiores aos 30 e 40 dias após inoculação no tratamento testemunha (T1), respectivamente.

Ao maiores percentuais para o estágio de sementes intumescidas ao nível do embrião (Figura 9), ao 30º dia, ocorreram no T1 ($\frac{1}{2}$ MS + 0 g L⁻¹ NaH₂PO₄), estes foram de 60,0% para as cultivares Bento e Guajarina e 53,3% para Cingapura e 60% para Kuthiravally no T3 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,17 g L⁻¹ NaH₂PO₄). Para o estágio de emissão de radícula (Figura 10), ao 40º dia, apresentaram percentuais de 53,3% para Bento, 46,7% para Cingapura e Kuthiravally, porém

o maior valor neste estágio para a cultivar Guajarina foi obtido em T4 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,25 g L⁻¹ de NaH₂PO₄) com 46,7% no mesmo período.

Figura 9. Percentual de sementes das cultivares de pimenteira-do-reino intumescidas ao nível do embrião a partir do 30º dia até o 50º dia após semeio *in vitro*.

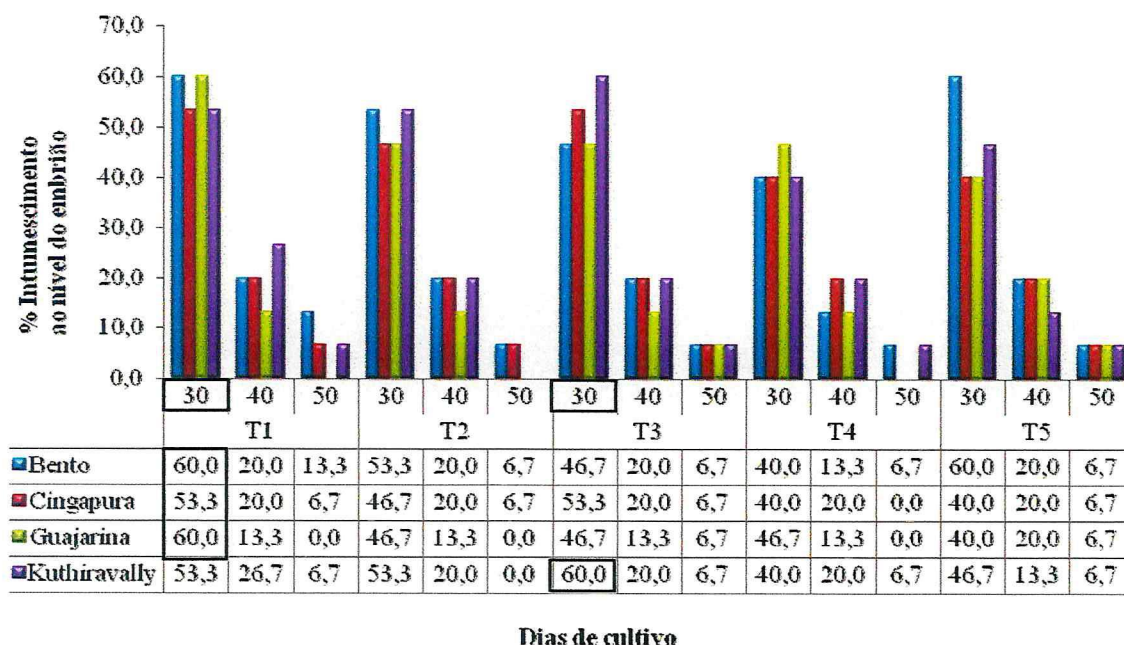
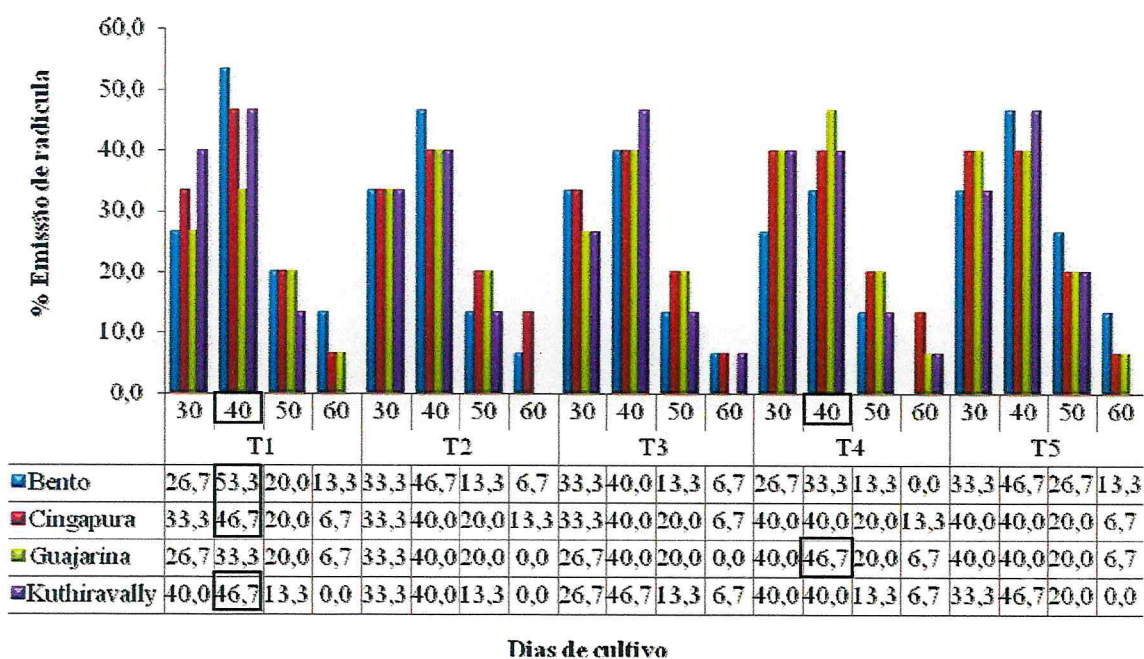
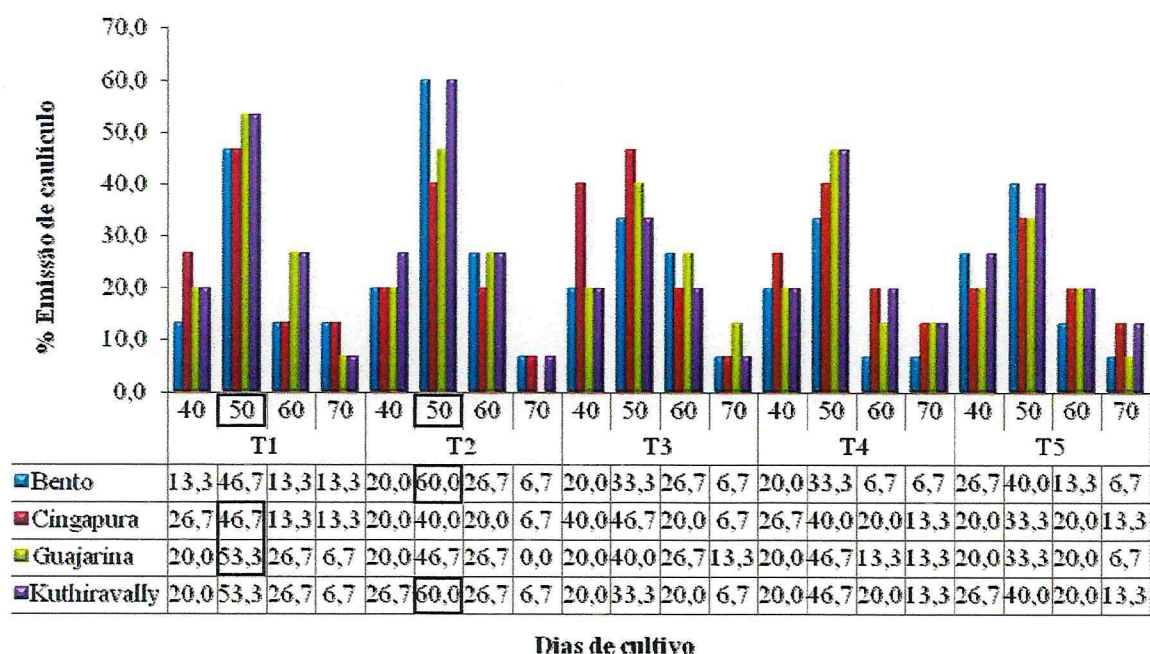


Figura 10. Percentual das cultivares de pimenteira-do-reino que emitiram radícula a partir do 30º dia até o 60º dia após semeio *in vitro*.



Os tratamentos, T1 ($\frac{1}{2}$ MS + 0 g L⁻¹ NaH₂PO₄) e T2 ($\frac{1}{2}$ MS + 0,10 g L⁻¹ de NaH₂PO₄), apresentaram concomitantemente as maiores taxas percentuais aos 50 dias após o semeio no estádio de emissão de caulículo (ECL). Para o tratamento T1 estas taxas foram de 46,7% e 53,3%, respectivamente para Cingapura e Guajarina, enquanto que em T2 obteve-se 60,0% para as cultivares, Bento e Kuthiravally (Figura 11).

Figura 11. Percentual de cultivares de pimenteira-do-reino que responderam com emissão de caulículo a partir do 40º dia até o 70º dia após semeio *in vitro*.



Nos estádios de emissão do hipocótilo (EHP) e emissão de cotilédones (ECT), simultaneamente os maiores percentuais foram alcançados aos 60 e 70 dias após o início do cultivo. Para fase de emissão do hipocótilo (Figura 12), as cultivares Guajarina e Kuthiravally atingiram, respectivamente, 53,3% e 46,7% quando germinadas nas condições do tratamento T2, Cingapura em T1 alcançou 46,7%, enquanto Bento obteve 53,3% de emissão do hipocótilo em T4. Na avaliação da emissão de cotilédones, a cultivar Bento quando submetida ao tratamento T5 (MS + 0 g L⁻¹ de NaH₂PO₄) respondeu melhor aos 70 dias de cultivo com percentual de 53,3% para este estádio. Os maiores percentuais de emissão de cotilédones foram de 46,7% para Cingapura, 60,0% para Guajarina e 53,3% para Kuthiravally, todos obtidos no tratamento T2 (Figura 13).

Figura 12. Percentual das cultivares de pimenteira-do-reino com emissão de hipocótilo a partir do 40º dia até o 90º dia após semente *in vitro*.

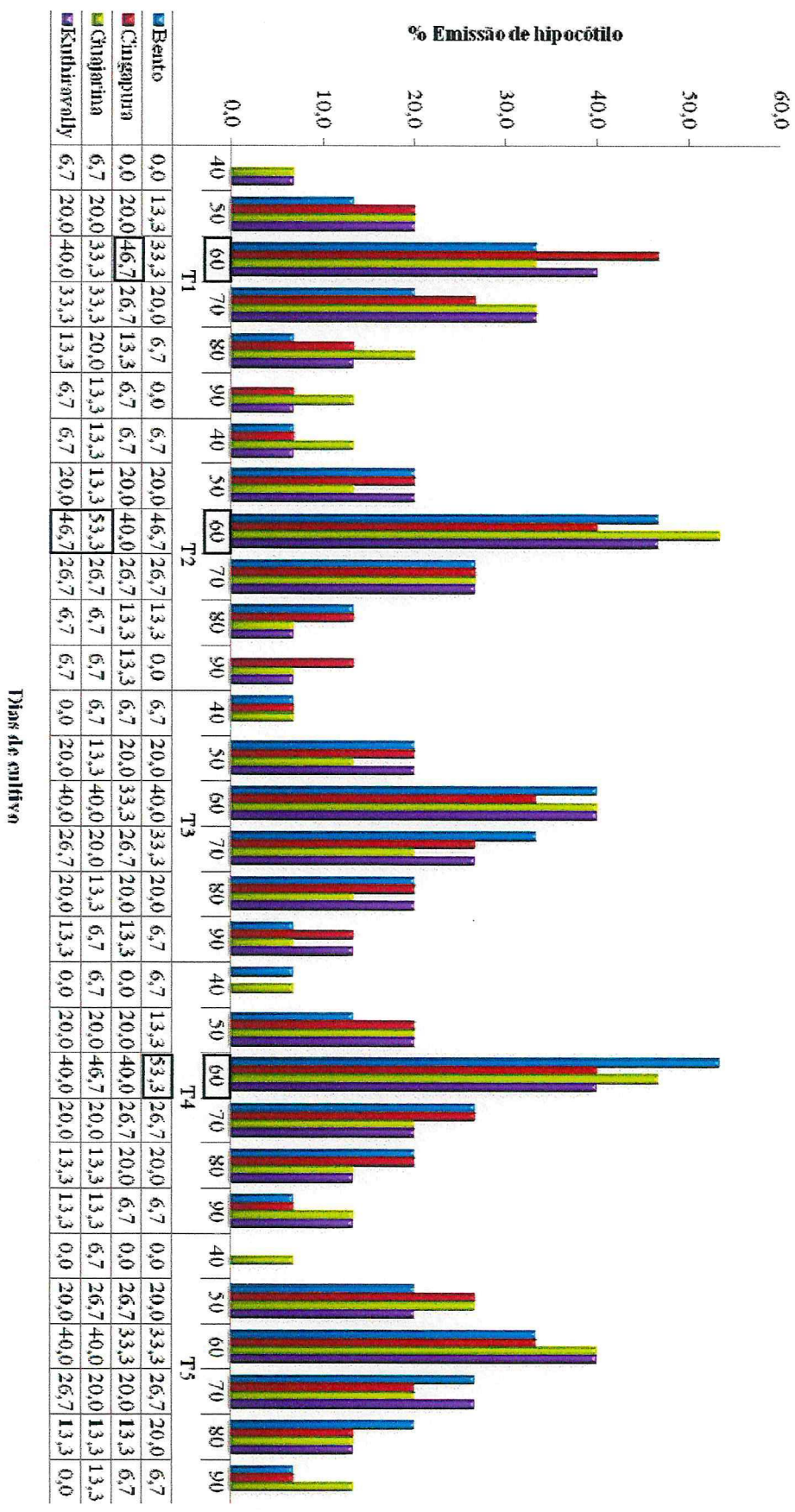
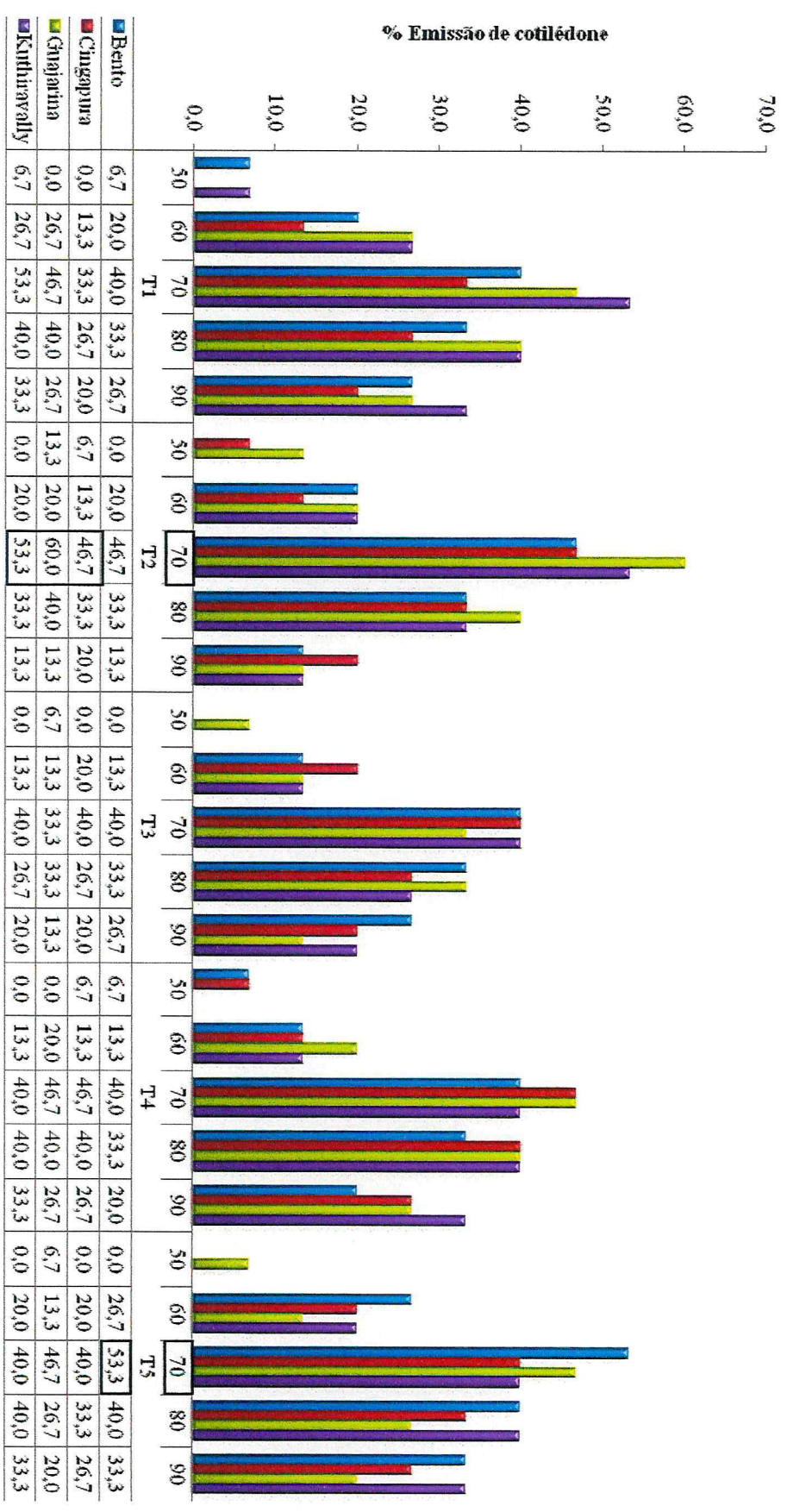


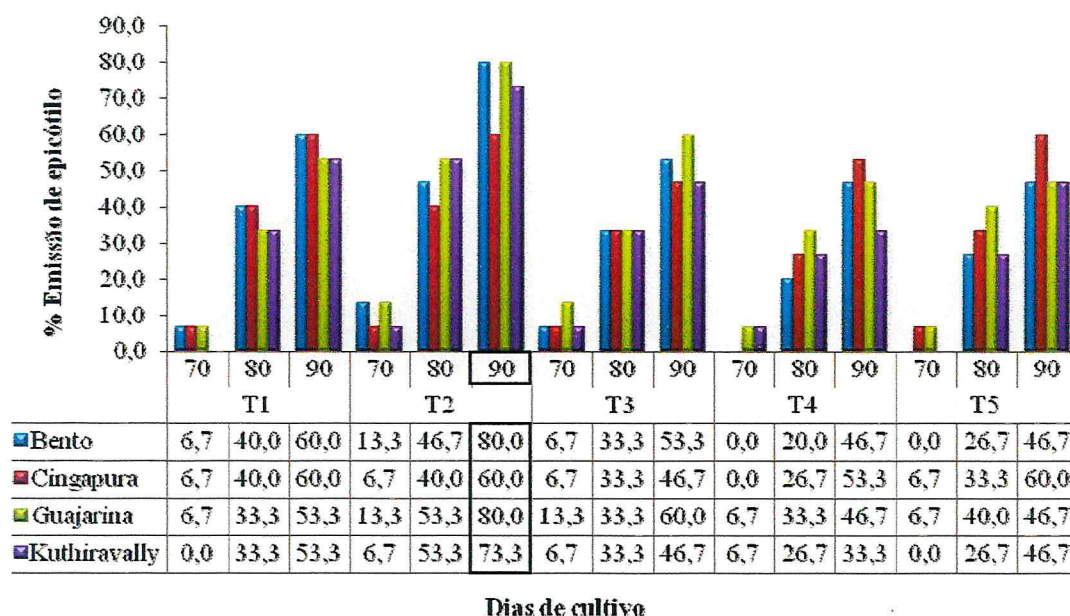
Figura 13. Percentual das cultivares de pimenteira-do-reino com emissão de cotilédone a partir do 50º dia até o 90º dia após semeadura *in vitro*.



Dias de cultivo

Na fase final do processo de germinação caracterizado pela emissão do epicótilo com a total formação da plântula, o tratamento T2 possibilitou maiores percentuais de germinação para todas as cultivares com 80,0% para Bento e Guajarina, 60,0% para Cingapura e 73,3% para Kuthiravally (Figura 14).

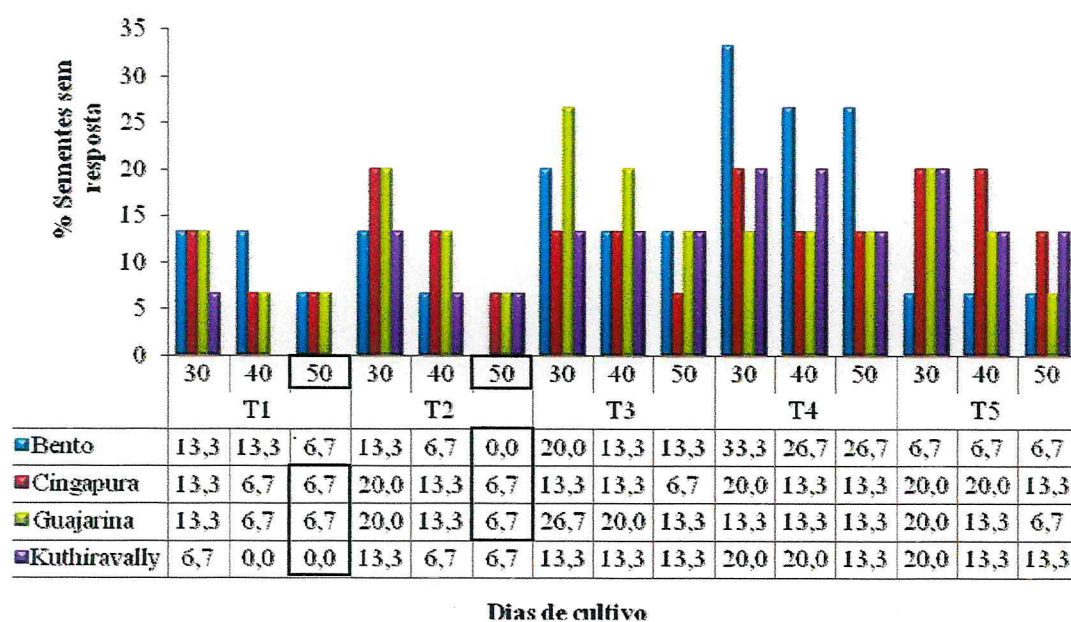
Figura 14. Percentual de plântulas formadas de cultivares de pimenteira-do-reino com emissão de epicótilo a partir do 70º dia até o 90º dia após semeio *in vitro*.



Aos 50 dias de cultivo *in vitro* ocorreu a avaliação final para sementes sem respostas SSR (Figura 15), ou seja, aquelas que não entraram em processo de germinação. A cultivar Bento não apresentou sementes sem respostas quando submetidas ao tratamento T2, igualmente ocorreu com a cultivar Kuthiravally no tratamento T1, assim pode-se dizer que 100% das sementes cultivadas nestes tratamentos germinaram. Quanto as cultivares Cingapura e Guajarina, estas apresentaram menores percentuais de sementes que não responderam ao processo germinativo ao serem cultivadas nos tratamentos T1 e T2. Nestes dois tratamentos o percentual foi de 6,7%, isso significa que 93,3% das sementes estavam em processo de germinação aos 50 de após o semeio.

Noventa dias depois da germinação *in vitro* as plântulas formadas continuaram crescendo *in vitro* até os 130 dias de cultivo, e desta forma fossem utilizadas como fonte de explante em processo de multiplicação *in vitro*.

Figura 15. Percentual de sementes das cultivares de pimenteira-do-reino que não iniciaram o processo de germinação *in vitro* até o 50º dia após semeio.



Segundo Pasqual (2001) o meio de cultura deve suprir a necessidade de tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais. Cálcio, magnésio e potássio são absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+}); nitrogênio na forma de amônio (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{-}); fósforo como íons fosfato (HPO_4) e (H_2PO_4). Os sais usados para fornecer macronutrientes também podem fornecer íons dos elementos sódio (Na^{+}) e cloro (Cl^{-}), sendo que as células vegetais toleram bem altas concentrações dos mesmos.

Entretanto, altas concentrações de fosfato de sódio diminuíram o crescimento dos explantes (segmentos nodais) de amoreira-preta micropropagados, possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida. A taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura (VILLA et al., 2008)

O fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) é um componente do meio White (1963) e B5 (GAMBORG et al., 1968). O meio MS possui baixas concentrações de sódio, porém, estudos com a micropropagação de orquídeas demonstraram a necessidade de se adicionar ao meio concentrações maiores desse sal. Em estudos com orquídeas *Phalaenopsis nebula*, verificou-se regeneração de plantas a partir de cultura de calos, em meio MS, com a adição de 170 mg L^{-1} de fosfato de sódio (CHEN et al., 2000).

Lemos (2003) desenvolveu trabalhos em que uma das etapas constava de germinação *in vitro* de pimenteira-do-reino. Este obteve plântulas formadas aos 69 dias após a inoculação das sementes utilizando meio de cultura MS com adição de $0,17 \text{ g L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 . Todavia, de acordo com nossos resultados, a adição de $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 não apresentou maiores taxas em nenhuma das fases de desenvolvimento ontogenético, deixando claro que para as cultivares Bento, Cingapura, Guajaria e Kuthiravally pode-se usar a concentração de $0,10 \text{ g L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 adicionada a $\frac{1}{2}$ MS, uma vez que a concentração completa de MS (T5) não apresentou valores elevados em nenhum dos estádios, exceto para cultivar Bento na fase de emissão de cotilédones, diferentemente dos resultados apresentados por Lemos (2003).

Moura et al. (2008) testaram diferentes concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenteira-do-reino. Para obtenção das plântulas fonte de explantes, sementes de pimenteira-do-reino foram germinadas *in vitro* utilizando o meio básico de cultura MS (completa concentração dos sais) sem a adição de NaH_2PO_4 , ou seja, semelhante ao tratamento T5 o qual não apresentou os maiores percentuais de plântulas formadas no final do processo de germinação *in vitro*, com exceção para cultivar Cingapura.

3.3.2 Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos e gemas

Os explantes das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally fornecidos por brotos pré-estabelecidos em meio de cultura MS suplementado com as combinações de thidiazuron (TDZ) nas concentrações de $0,0$ e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ e de 6-benzilaminopurina (BAP) a $0,5$; $1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ apresentavam aspecto verde e com a presença, em alguns brotos, de calo na base incisada em contato com o meio de cultura, principalmente nos tratamentos com combinações de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP (T1) e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP (T2).

Isto deve ter sido provavelmente ocasionado pelas combinações das concentrações dos reguladores de crescimento envolvidos, pois se sabe que BAP é uma citocinina e, segundo Barrueto Cid (2010a), em geral na cultura de tecidos, estas são usadas para promover a indução de brotos adventícios a partir de calos ou para induzir multibrotações a partir de gemas axilares ou apicais, enquanto o TDZ tem uma posição ambígua, pois atua como auxina ou como citocinina. O TDZ pode ser substituído *in vitro* por auxinas ou pelas combinações de

auxinas e citocininas (SINGH et al., 2003). Ele possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações (GRAÇA et al., 2001).

Visto isso, pode-se dizer que não é apenas a quantidade de reguladores de crescimento que importa para o processo morfogênético, o qual se buscou neste estudo, senão o tipo e o balanço dos fitorreguladores utilizados, pois este balanço influencia diretamente na resposta *in vitro* da cultura.

A fase de estabelecimento permitiu a obtenção de brotos a partir do uso de cinco combinações dos reguladores de crescimento TDZ x BAP, a qual foi denominada de tratamentos, *versus* as cultivares envolvidas, visando à identificação da melhor interação.

Análise de Variância – Número de brotos para interação entre cultivares e tratamentos no primeiro e segundo subcultivo

A Tabela 4 apresenta as análises de variâncias para a avaliação do número de brotos da interação cultivar (Cingapura, Bento, Guajarina e Kuthiravally) *versus* tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5), considerando o primeiro e o segundo subcultivos. Nelas, as hipóteses testadas foram H0: as médias dos números de brotos são iguais para os diferentes tipos de interações *versus* H1: pelo menos uma das médias do número de brotos é diferente das demais interações. Assim, como 2,28 é maior que 0,79, no primeiro subcultivo e 2,28 é maior que 0,73, no segundo subcultivo, isto é, o valor crítico de F é maior que F calculado, tanto no primeiro quanto no segundo subcultivo, concomitantemente, não rejeita-se a hipótese de que as médias dos números de brotos são iguais para as diferentes interações. Ou seja, pode-se concluir, ao nível de 5%, que os brotos têm, em média, o mesmo número para as diferentes interações entre cultivar *versus* tratamento.

Tabela 4. Análise de variância – Interação cultivar *versus* tratamento para o número de brotos no 1º subcultivo e 2º subcultivo.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	I e II	I	II	I	II	I e II
Cultivar (C)	3	1,667	3,405	3,98	0,96	3,10
Tratamentos (T)	4	0,331	14,430	0,79	4,09	2,87
Interação (C x T)	12	0,331	2,583	0,79	0,73	2,28
Resíduos	20	0,42	3,53			
Total	39					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; I: Primeiro subcultivo; II: Segundo subcultivo.

Primeiro subcultivo: média geral = 1,858; desvio padrão = 0,692; coeficiente de variação = 37,25.

Segundo subcultivo: média geral = 3,937; desvio padrão = 1,565; coeficiente de variação = 39,75.

Análise de Variância – Números de brotos e número de gemas para interação entre cultivares e tratamentos no terceiro subcultivo

A Tabela 5 apresenta as análises de variâncias para os números de brotos e número de gemas da interação cultivar (Cingapura, Bento, Guajarina e Kuthiravally) *versus* tratamentos (T1, T2, T3, T4 e T5) para o terceiro subcultivo. Nela, as hipóteses testadas foram H0: as médias dos números de brotos e/ou número de gemas são iguais para os diferentes tipos de interações *versus* H1: pelo menos uma das médias dos números de brotos e/ou número de gemas são diferentes das demais interações. Assim, como 6,06 é maior que 2,14, para o número de brotos e 9,23 é maior que 2,14, para o número de gemas, isto é, o valor crítico de F é menor que F calculado, tanto para o número de brotos como para o número de gemas, rejeita-se a hipótese de que as médias de número de brotos e/ou número de gemas são iguais em todas as interações. Ou seja, pode-se concluir, ao nível de 5%, que os brotos e/ou as gemas não têm, em média, o mesmo número para as diferentes interações cultivar *versus* tratamentos.

Tabela 5. Análise de variância – Interação cultivar *versus* tratamento para o número de brotos e número de gemas no 3º subcultivo.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	B e G	B	G	B	G	B e G
Interação (C x T)	19	0,849	4,054	6,06	9,23	2,14
Resíduos	20	0,140	0,439			
Total	39					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; C: cultivar; T: tratamento; B: broto; G: gema; B e G: broto e gema.

Brotos: média geral = 2,666; desvio padrão = 0,697; coeficiente de variação = 26,14.

Gemas: média geral = 4,904; desvio padrão = 1,483; coeficiente de variação = 30,25.

Teste Estatístico – Terceiro subcultivo

Como a análise de variância na multiplicação *in vitro* para o número de brotos e número de gemas, a partir do terceiro subcultivo, mostra que as médias da interação cultivar *versus* tratamentos não são estatisticamente iguais, utilizou-se o Teste Tukey para comparação das médias obtidas. As Figuras 16 e 17 mostram as representações gráficas para comparar as

médias do número de broto e do número de gemas, respectivamente para a interação analisada.

Na Figura 16, observar-se que houve a formação de cinco grupos quando se comparou as médias dos números de brotos, ou seja, A, B, C, D e E. O grupo E é formado pelos maiores valores médios da interação cultivar *versus* tratamentos para o número de brotos. Neste grupo observa-se que a combinação de reguladores de crescimento $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP (T2) apresenta as médias de 2,90 quando o tratamento T2 interage com a cultivar Kuthiravally, 3,44 na interação com Cingapura e 4,25 na interação deste tratamento com a cultivar Bento. Ou seja, das seis medias deste grupo, três correspondem ao tratamento T2. A cultivar Kuthiravally aparece em outras duas interações com médias de número de brotos de 3,23 quando interage com o tratamento T1 ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) e de 4,00 ao interagir com o tratamento T3 ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP).

Ao comparar as médias do número de gemas neste terceiro subcultivo, houve a formação de sete grupos (Figura 17), ou seja, A, B, C, D, E, F e G. O grupo com os maiores valores médios para o número de gemas foi o grupo G. Neste, os tratamentos com as duas menores concentrações de BAP sem o fitorregulador TDZ, isto é, o T4 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) e T5 ($0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ x $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP) foram os que se apresentaram com maior frequência dentro do grupo na interação com as quatro cultivares estudadas. As médias obtidas com o tratamento T4 foram, 5,51 na interação com Kuthiravally, 5,75 quando o tratamento interage com Bento, 6,09 com Guajarina e 6,72 na interação com a cultivar Cingapura. Quanto às médias do grupo G relacionadas ao T5, estas foram 4,68 quando T5 interage com Kuthiravally, 4,88 na interação com Guajarina, 5,60 com Bento e 6,42 com a cultivar Cingapura.

Tabela 6. Análise de variância – Interação cultivar *versus* tratamento para o número de brotos e número de gemas no 4º subcultivo.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	B e G	B	G	B	G	B e G
Interação (C x T)	19	4,237	4,74	5,10	3,75	1,67
Resíduos	120	0,831	1,26			
Total	139					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; C: cultivar; T: tratamento; B: broto; G: gema; B e G: broto e gema.

Brotos: média geral = 3,581; desvio padrão = 1,139; coeficiente de variação = 31,80.

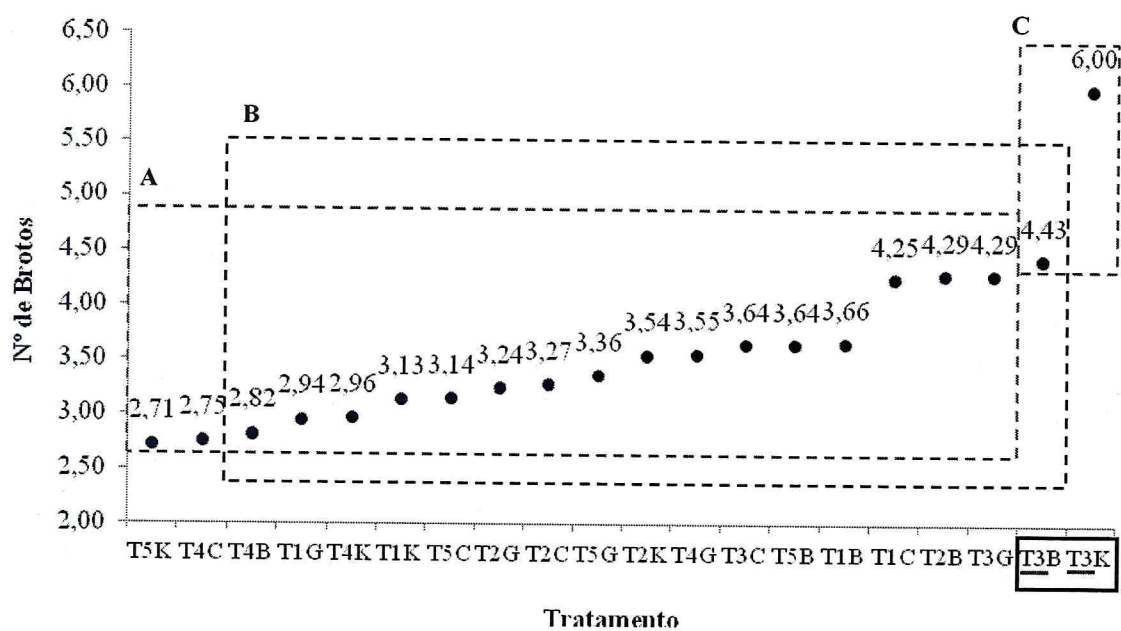
Gemas: média geral = 6,116; desvio padrão = 1,318; coeficiente de variação = 21,56.

Teste Estatístico – Quarto subcultivo

De acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias do número de brotos, houve a formação de três grupos no quarto subcultivo (Figura 18), sendo estes A, B e C. Os valores das médias do grupo C foram os maiores e estão relacionados ao tratamento T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP). As médias obtidas neste grupo foram de 4,43 quando o tratamento T3 atua com a cultivar Bento e 6,00 na interação com a cultivar Kuthiravally. É válido ressaltar que a média de 4,43 obtida no grupo C não diferiu estatisticamente das médias obtidas pelo grupo B.

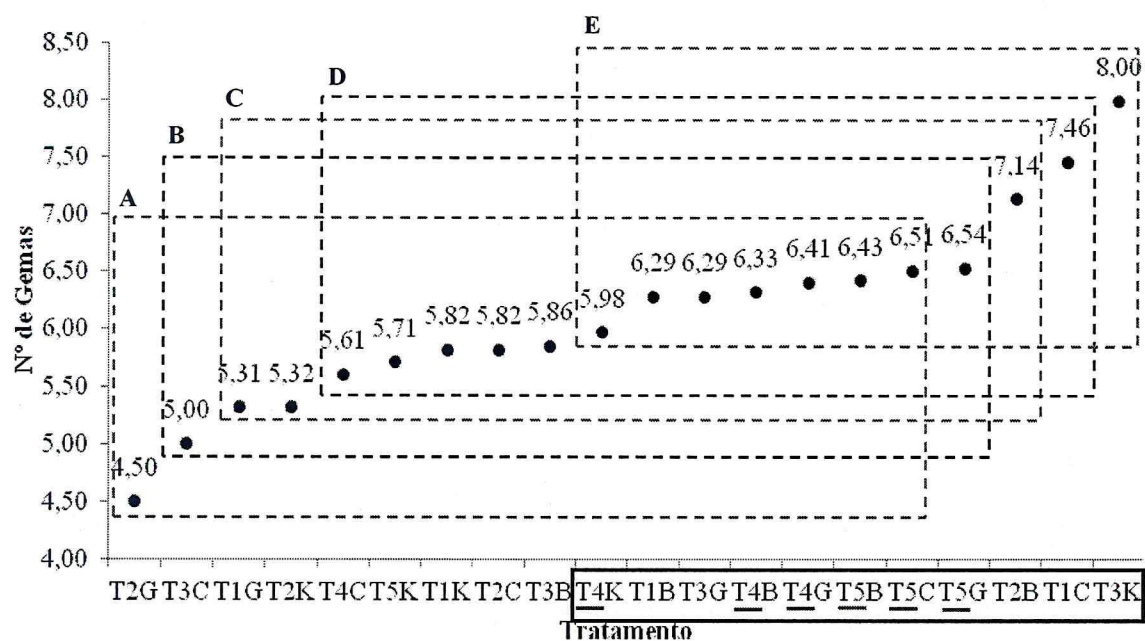
Para o número de gemas, obteve-se cinco grupos formados sem diferença estatística entre as médias contidas neles. Estes são: A, B, C, D e E, sendo o E o que contém os maiores valores médios (Figura 19). Os mesmos tratamentos, T4 e T5, que apresentaram os maiores valores médios de número de gemas no subcultivo anterior foram os mesmos que proporcionaram neste subcultivo. Nas condições do tratamento T4, as cultivares Kuthiravally, Bento e Guajarina apresentaram as médias 5,98; 6,33 e 6,41, respectivamente. Enquanto que no tratamento T5, com os genótipos de Bento, Cingapura e Guajarina obteve-se as médias de 6,43; 6,51 e 6,54, respectivamente.

Figura 18. Resultado gráfico dos grupos formados a partir da ANOVA - Interação tratamento *versus* cultivar para o número de brotos - 4º Subcultivo.



Legenda: T1B – T1 x Bento; T1C – T1 x Cingapura; T1G – T1 x Guajarina; T1K – T1 x Kuthiravally; T2B – T2 x Bento; T2C – T2 x Cingapura; T2G – T2 x Guajarina; T2K – T2 x Kuthiravally; T3B – T3 x Bento; T3C – T3 x Cingapura; T3G – T3 x Guajarina; T3K – T3 x Kuthiravally; T4B – T4 x Bento; T4C – T4 x Cingapura; T4G – T4 x Guajarina; T4K – T4 x Kuthiravally; T5B – T5 x Bento; T5C – T5 x Cingapura; T5G – T5 x Guajarina; T5K – T5 x Kuthiravally. T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP). As médias dentro de cada grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 19. Resultado gráfico dos grupos formados a partir da ANOVA - Interação tratamento *versus* cultivar para o número de gemas - 4º Subcultivo.



Legenda: T1B – T1 x Bento; T1C – T1 x Cingapura; T1G – T1 x Guajarina; T1K – T1 x Kuthiravally; T2B – T2 x Bento; T2C – T2 x Cingapura; T2G – T2 x Guajarina; T2K – T2 x Kuthiravally; T3B – T3 x Bento; T3C – T3 x Cingapura; T3G – T3 x Guajarina; T3K – T3 x Kuthiravally; T4B – T4 x Bento; T4C – T4 x Cingapura; T4G – T4 x Guajarina; T4K – T4 x Kuthiravally; T5B – T5 x Bento; T5C – T5 x Cingapura; T5G – T5 x Guajarina; T5K – T5 x Kuthiravally. T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP). As médias dentro de cada grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Análise de Variância – Números de brotos e número de gemas para interação entre cultivares e tratamentos no quinto subcultivo

A Tabela 7 mostra as análises de variâncias para os números de brotos e número de gemas da interação entre as cultivar estudadas *versus* os tratamentos para o quinto subcultivo. Nela, as hipóteses testadas foram às mesmas dos subcultivos anteriores. Observando os valores de F, estes demonstram que: 6,28 é maior que 1,65, para o número de brotos e 6,29 é maior que 1,65, para o número de gemas, isto é, o valor crítico de F é menor que F calculado, tanto para o número de brotos como para o número de gemas. Assim, rejeita-se a hipótese de que as médias do número de brotos e/ou número de gemas são iguais em todas as interações. Ou seja, pode-se concluir, ao nível de 5%, que os brotos e/ou as gemas não têm a mesma média para as diferentes interações de cultivar *versus* tratamentos.

Tabela 7. Análise de variância – Interação cultivar *versus* tratamento para o número de brotos e número de gemas no 5º subcultivo.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	B e G	B	G	B	G	B e G
Interação (C x T)	19	4,034	5,648	6,28	6,29	1,65
Resíduos	160	0,643	0,898			
Total	179					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; C: cultivar; T: tratamento; B: broto; G: gema; B e G: broto e gema.

Brotos: média geral = 3,004; desvio padrão = 1,001; coeficiente de variação = 33,33.

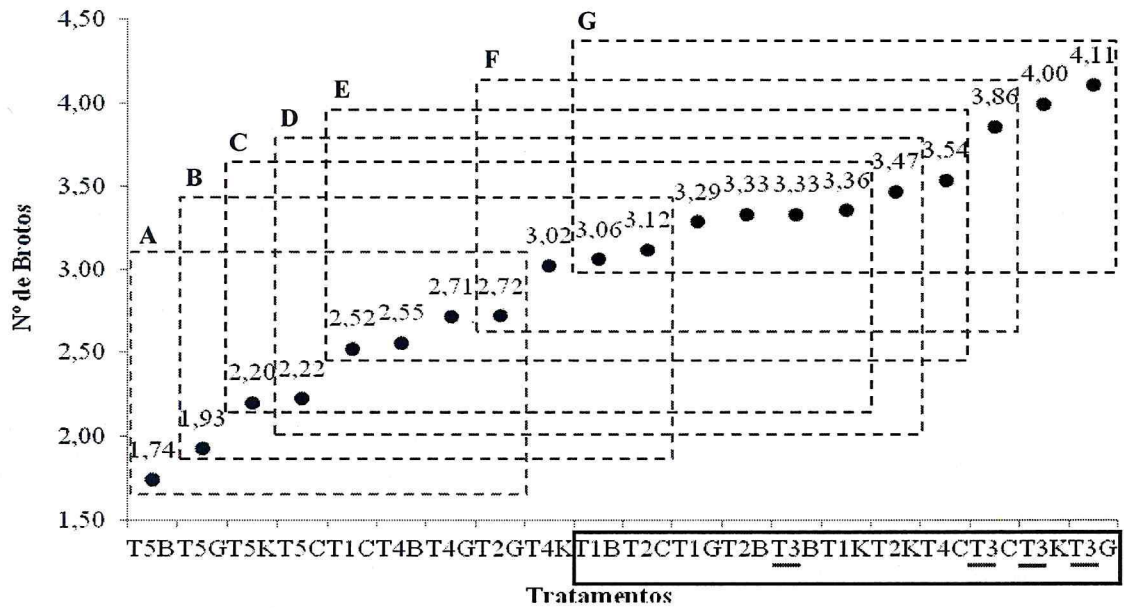
Gemas: média geral = 5,778; desvio padrão = 1,184; coeficiente de variação = 20,49.

Teste Estatístico – Quinto subcultivo

Neste subcultivo, a interação das cultivares *versus* tratamentos formou sete grupos, A, B, C, D, E, F e G, pelo teste de Tukey (Figura 20). Dentro de cada um deste não há diferença significativa entre suas médias. O grupo G apresentou os maiores valores médios para o número de brotos. O tratamento T3 é o que aparece com maior frequência dentro deste grupo apresentando as médias 3,33; 3,86; 4,00 e 4,11 resultante do cultivo das cultivares Bento, Cingapura, Kuthiravally e Guajarina, respectivamente. Ao observar as cultivares que mais aparecem no grupo G, estas se apresentam com frequências equivalentes, ou seja, as cultivares são influenciadas pelos tratamentos a qual estão submetidas não sobressaindo um genótipo em reação ao outro.

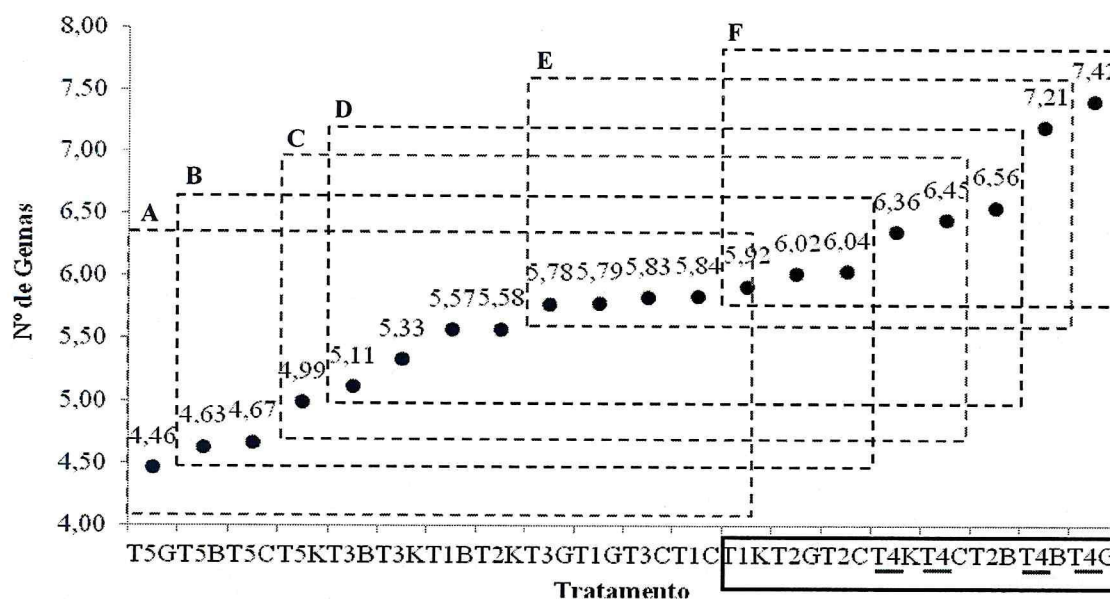
A Figura 21 demonstra os seis grupos formados pelo teste estatístico realizado para comparação de médias do número de gemas. Dentre os grupos A, B, C, D, E e F, este último apresenta os maiores valores médios sem que estes sejam diferentes entre si. Das oito médias contidas no grupo F, quatro destas estão relacionadas ao tratamento T4 no cultivo dos genótipos Kuthiravally (6,36), Cingapura (6,45), Bento (7,21) e Guajarina (7,42).

Figura 20. Resultado gráfico dos grupos formados a partir da ANOVA - Interação tratamento *versus* cultivar para o número de brotos - 5º Subcultivo.



Legenda: T1B – T1 x Bento; T1C – T1 x Cingapura; T1G – T1 x Guajarina; T1K – T1 x Kuthiravally; T2B – T2 x Bento; T2C – T2 x Cingapura; T2G – T2 x Guajarina; T2K – T2 x Kuthiravally; T3B – T3 x Bento; T3C – T3 x Cingapura; T3G – T3 x Guajarina; T3K – T3 x Kuthiravally; T4B – T4 x Bento; T4C – T4 x Cingapura; T4G – T4 x Guajarina; T4K – T4 x Kuthiravally; T5B – T5 x Bento; T5C – T5 x Cingapura; T5G – T5 x Guajarina; T5K – T5 x Kuthiravally. T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP). As médias dentro de cada grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 21. Resultado gráfico dos grupos formados a partir da ANOVA - Interação tratamento *versus* cultivar para o número de gemas - 5º Subcultivo.



Legenda: T1B – T1 x Bento; T1C – T1 x Cingapura; T1G – T1 x Guajarina; T1K – T1 x Kuthiravally; T2B – T2 x Bento; T2C – T2 x Cingapura; T2G – T2 x Guajarina; T2K – T2 x Kuthiravally; T3B – T3 x Bento; T3C – T3 x Cingapura; T3G – T3 x Guajarina; T3K – T3 x Kuthiravally; T4B – T4 x Bento; T4C – T4 x Cingapura; T4G – T4 x Guajarina; T4K – T4 x Kuthiravally; T5B – T5 x Bento; T5C – T5 x Cingapura; T5G – T5 x Guajarina; T5K – T5 x Kuthiravally. T1 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T2 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); T3 (0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); T5 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP). As médias dentro de cada grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao considerar apenas a performance dos tratamentos ao longo dos subcultivos para o número de brotos, percebemos que no quarto e quinto subcultivos, a combinação de 0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP referente ao tratamento T3 foi a melhor para obtenção dos maiores número de brotos, ou seja, esta combinação favoreceu a proliferação de novas brotações. Porém, alguns fatores não desejáveis foram observados neste e nos outros tratamentos cuja adição de TDZ e BAP ao meio de cultura MS foi realizada (Figura 22-a,b,c).

Quanto ao número de gemas, o tratamento T4 (0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP), foi o que apresentou os melhores resultados tanto analisado estatisticamente quanto a partir das observações morfológicas realizadas no decorrer do cultivo. Neste tratamento, os brotos apresentavam-se alongados e com a coloração das folhas verde-escura, e sem a presença de calos na base (Figura 22-d). O tratamento T5, com adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio, também apresentou aspectos desejáveis (Figura 22-e), porém o comprimento dos brotos não foram tão satisfatórios para obtenção do número de gemas quando comparados com os brotos obtidos no T4. O tratamento T4, desde o terceiro até o quinto subcultivo, apresentou a mesma

performance tanto estatisticamente quanto em seus aspectos morfológicos, enquanto que o tratamento T5 manteve-se no melhor grupo apresentando as maiores médias apenas no terceiro e quarto subcultivos.

Estudos vem sendo desenvolvidos para a proliferação de brotos *in vitro* utilizando TDZ, BAP ou ainda outras citocininas, porém a combinação de TDZ x BAP não tem sido explorado. O TDZ vem sendo utilizado como uma alternativa para substituição das citocinina sintéticas mais frequentemente utilizadas, como a cinetina (CIN) e a BAP. Akasaka et al. (2000) em estudos de micropropagação de amendoim, verificaram que ao utilizar TDZ ou BAP como citocininas, o TDZ estimulou maior multiplicação de brotos, em concentrações bem inferiores as do BAP e em tempo inferior ao tempo requerido ao se utilizar o BAP.

Segundo Graça et al. (2001) o TDZ possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações. Isto se deve, por este ser mais potente que outras citocininas, as concentrações requeridas em meio de cultura são menores que das demais citocininas para se obter resultados similares de multiplicação. Assim, esse regulador de crescimento costuma ser utilizado em baixas concentrações, sendo altamente eficiente em promover a multiplicação de brotações, sendo necessárias altas concentrações de outras citocininas como benziladenina, benzilaminopurina e zeatina para produzir efeito similar dependendo da espécie.

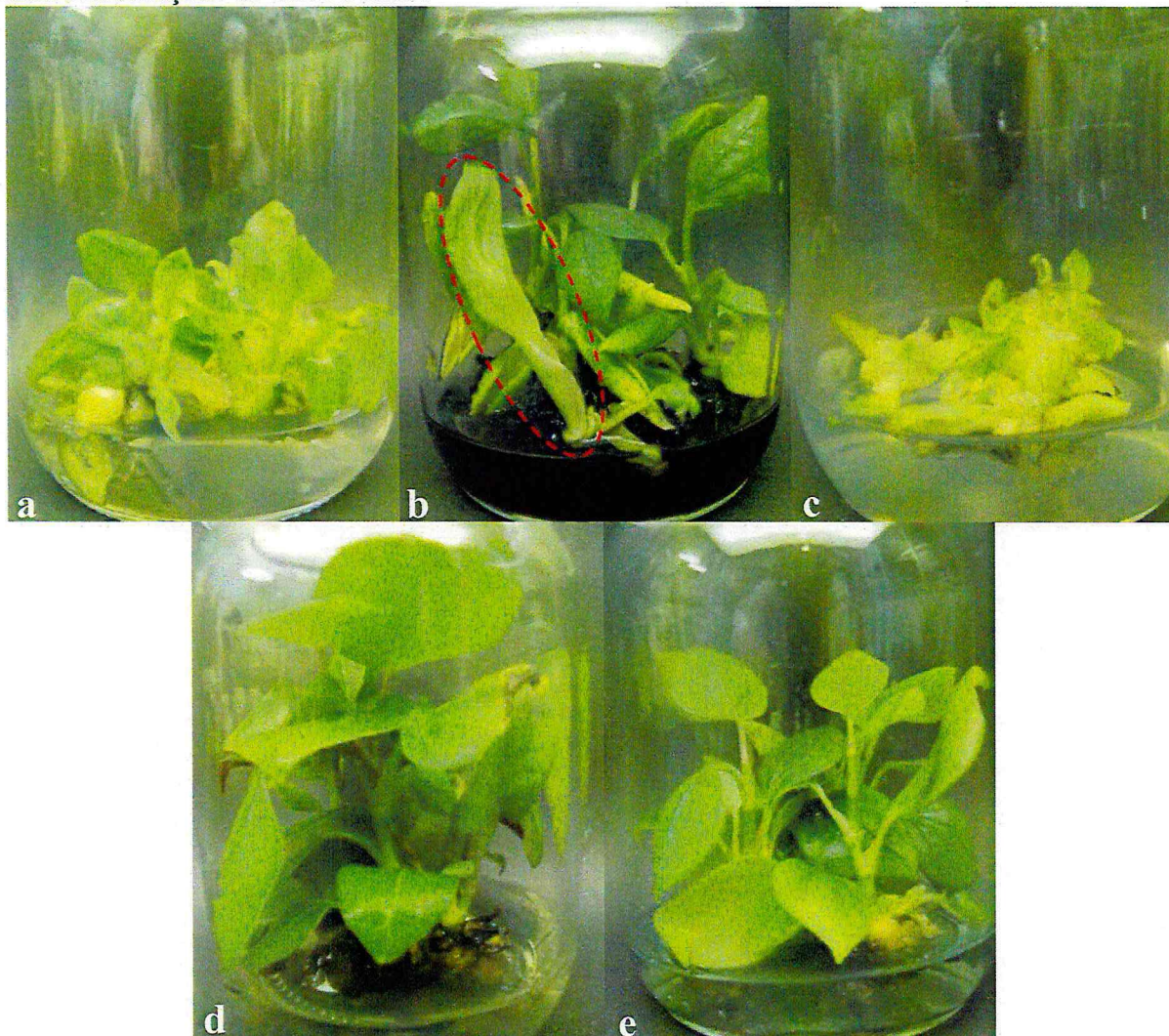
Ao analisar o efeito das citocininas BAP e TDZ, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* MAID., Graça et al. (2001) verificaram que o número de brotações foi significativamente maior com o uso de BAP comparado ao uso de TDZ suplementados ao meio de cultura. As brotações subcultivadas em TDZ se apresentaram amareladas, pouco desenvolvidas e com formação excessiva de calos na base.

Observações semelhantes foram visualizadas neste estudo com pimenteira-do-reino em todos os tratamentos que combinaram TDZ e BAP, ou seja, T1, T2 e T3 no cultivo das cultivares de pimenteira-do-reino. A presença de calo na base se manteve constante desde a fase de estabelecimento até o último subcultivo, principalmente na combinação de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP. Estes calos cresciam no decorrer do cultivo causando oxidação da massa calosa e escurecimento do meio de cultura (Figura 22 - b e 23). A coloração das folhas eram verde-clara, enroladas, vidrificadas e, as vezes, apresentavam deformações, as brotações eram pouco desenvolvidas percebendo-se a formação de rosetas com maior frequência na cultivar Kuthiravally (Figura 22-a,b,c).

De acordo com Kevers et al. (2004), a vitrificação é uma desordem fisiológica e morfológica. Não é um fenômeno frequente e depende das condições *in vitro* para que ocorra

e se expresse em diferentes graus (PEREZ et al., 2001). A planta vitrificada apresenta desenvolvimento insuficiente, folhas quebradiças e translúcidas, pouco desenvolvimento e primórdios foliares alongados, entre outras características (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010b).

Figura 22. Aspectos visuais observados no decorrer do cultivo *in vitro* durante a fase de multiplicação de brotos de pimenteira-do-reino ao serem submetidos a diferentes tratamentos com combinações de TDZ e BAP.

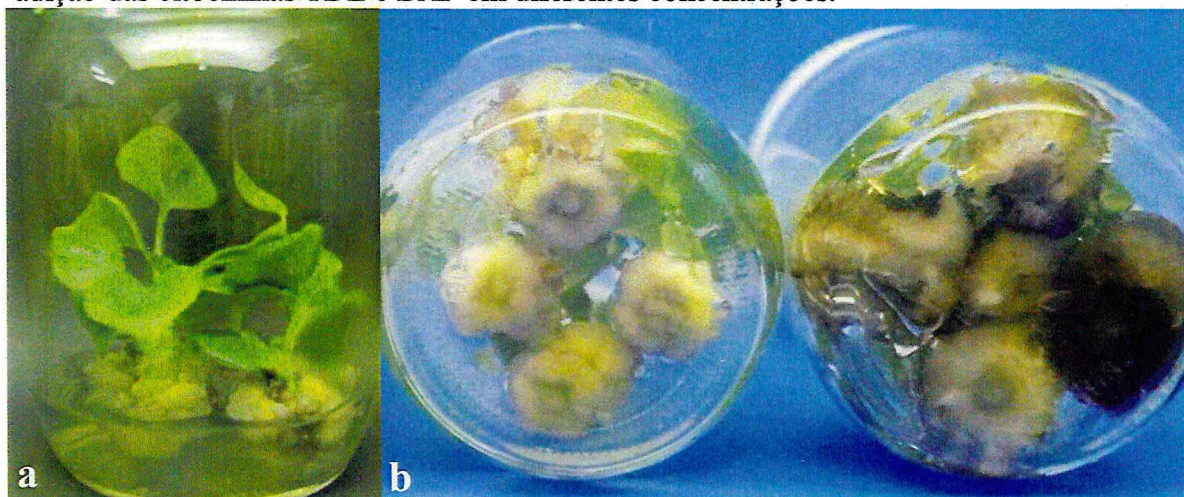


Legenda: a - broto curto (T1 - 0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); b - folha deformada, meio de cultura escurecido devido a oxidação da massa calosa (T2 - 0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP); c - formação de rosetas (T3 - 0,05 mg L⁻¹ de TDZ x 2,0 mg L⁻¹ BAP); d - brotos com aspectos desejáveis (T4 - 0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 0,5 mg L⁻¹ BAP); e - brotos com aspectos desejáveis, porém mais curtos (T5 - 0,0 mg L⁻¹ de TDZ x 1,0 mg L⁻¹ BAP)

A oxidação fenólica, responsável pela cor marrom dos explantes, é um fenômeno frequente principalmente em plantas perenes, como é o caso da pimenteira-do-reino. Sabe-se que tal reação é desencadeada no processo de senescência ou por injúria dos tecidos

(BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010b). No caso exposto da oxidação da calosidade formada na base dos brotos da pimenteira-do-reino *in vitro*, acredita-se que este processo esteja vinculado a razões internas, como por exemplo, um processo de apoptose destes calos. Descarta-se as razões externas, pois a oxidação não ocorreu logo no início de cada subcultivo após o tecido do explante ter sido injuriado pelo bisturi.

Figura 23. Formação de calos na base dos brotos cultivados em meio de cultura MS com adição das citocininas TDZ e BAP em diferentes concentrações.



Legenda: a, b - massa calosa, b – crescimento da massa calosa, da esquerda para a direita, começando a oxidar.

A adição exógena de reguladores de crescimento ao meio de cultura desencadeia uma alteração do balanço hormonal endógeno dos tecidos dos explantes. A presença constante ou excessiva de citocininas no meio de indução ou multiplicação de brotos pode desequilibrar exageradamente o balanço hormonal endógeno dos explantes, além de inibir as respostas desejadas (LEMOS, 2010). A indução de brotos em explantes nodais de *Pterocarpus marsupium*, uma espécie de leguminosa arbórea, somente foi possível por meio da utilização de meio de cultura com 0,4 μM TDZ. Todavia, a presença contínua de TDZ, após a indução, de brotação inibiu o alongamento dos brotos, sendo necessário a transferência dos explantes para outro meio com 5 μM BA (HUSAIN et al., 2007).

Souza et al. (2003) verificaram em ensaios com *Lychnophora pinaster* Mart que tanto o número quanto o comprimento dos brotos foram influenciados tanto pelas citocininas empregadas como pelas suas concentrações. À medida que se aumentou a concentração de BAP no meio de cultura, houve diminuição no número de brotos. No meio contendo 1,0 mg L^{-1} de BAP, além do número e tamanho de brotos terem sido menores, esses apresentaram brotos malformados e vitrificados.

Resultados semelhantes ocorreram neste estudo com pimenteira-do-reino com as quatro cultivares utilizadas, porém nos tratamentos os quais se utilizou TDZ. Algumas brotações mostraram-se vitrificadas com desenvolvimento anormal e má formação, semelhante aos sintomas característicos de altas concentrações de citocininas.

3.3.3 Enraizamento *in vitro*

O enraizamento foi realizado a partir de brotos obtidos após o quinto subcultivo das cultivares Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally de pimenteira-do-reino. De acordo com as observações realizadas, percebeu-se que o início dos primórdios radiculares na base dos brotos começaram a surgir a partir do 10º dia, quando submetidos ao meio de enraizamento com sacarose a 15 e 30 g L⁻¹ e a partir do 15º dia para os brotos em meios de cultura com as concentrações de 45 ou 60 g L⁻¹. O início do desenvolvimento de novas gemas também obedeceu esta mesma ordem entre as concentrações de sacarose.

O tratamento controle, sem a adição de sacarose, não respondeu tanto à formação de novas gemas como para o desenvolvimento de raízes durante as seis semanas de cultivo em meio de enraizamento para 44% dos brotos inoculados. Estes permaneceram durante o período de cultivo sem aparente respostas visíveis. Houve a oxidação de 56% dos brotos restante do tratamento controle, os quais definharam e morreram. Devido à ausência de qualquer tipo de respostas desejáveis, o tratamento controle não foi avaliado quanto as variáveis analisadas nos demais tratamentos, ou seja, número de raízes/broto, comprimento das raízes/broto, comprimento de brotos e número de folhas/broto a fim de que os dados fossem submetidos à análise de variância.

Tem-se constatado que na ausência de sacarose ocorre uma drástica redução no número de segmentos nodais de mamoeiro enraizados *in vitro* podendo até mesmo ampliar o tempo de enraizamento começando após 1 a 2 meses de cultivo (FITCH et al., 2003).

Calvete et al. (2002) observaram que na ausência de sacarose, na fase de enraizamento *in vitro* em morangueiro, não houve desenvolvimento de raízes, sendo que plantas produzidas na concentração de 45 g L⁻¹ apresentaram maior enraizamento.

A presença de sacarose no meio de cultura é essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta, ou do explante, é limitada. A concentração mais usual deste carboidrato em meio nutritivo varia de 2% a 3%, no entanto, ocasionalmente, ela pode ser

usada em concentrações maiores de até 6%. O tipo e a concentração dos carboidratos no meio de cultura têm influenciado a morfogênese de tecidos vegetais (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010a).

Para os tratamentos com concentrações de 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose, os quais foram possíveis à obtenção de dados para cada cultivar, estes foram submetidos à análise de variância. Observando os valores de F (Tabela 8 e 9), para interação cultivares *versus* concentrações de sacarose, conclui-se que não houve diferença significativa entre as médias obtidas para todas as variáveis analisadas (número de raízes/broto, comprimento de raízes/broto, comprimento de brotos e número de folhas), pois os valores de F calculado foram menores que os valores do F crítico.

As Tabelas 8 e 9 demonstram que os tratamentos com diferentes concentrações de sacarose apresentam os valores de F calculado para as variáveis número de raízes/broto (6,77), comprimento das raízes/ broto (10,46) e número de folhas (5,23), maiores que os valores do F crítico (2,66). Portanto conclui-se que há diferença significativa entre os tratamentos. Para estas variáveis as médias foram submetidas ao teste Tukey para comparação das médias a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Análise de variância – Interação cultivar *versus* concentrações de sacarose para o número de raízes/broto e comprimento das raízes/ broto.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	NR e CR	NR	CR	NR	CR	NR e CR
Cultivar (C)	3	32,214	1,113	5,74	2,31	2,66
Sacarose (S)	3	38,009	5,042	6,77	10,46	2,66
Interação (C x S)	9	8,014	0,847	1,43	1,76	1,94
Resíduos	160	5,612	0,482			
Total	175					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; NR: número de raízes/ broto; CR: comprimento de raízes/broto.

Número de raízes/broto: média geral = 5,805; desvio padrão = 2,627; coeficiente de variação = 45,25.

Comprimento de raízes/broto: média geral = 1,689; desvio padrão = 0,773; coeficiente de variação = 45,78.

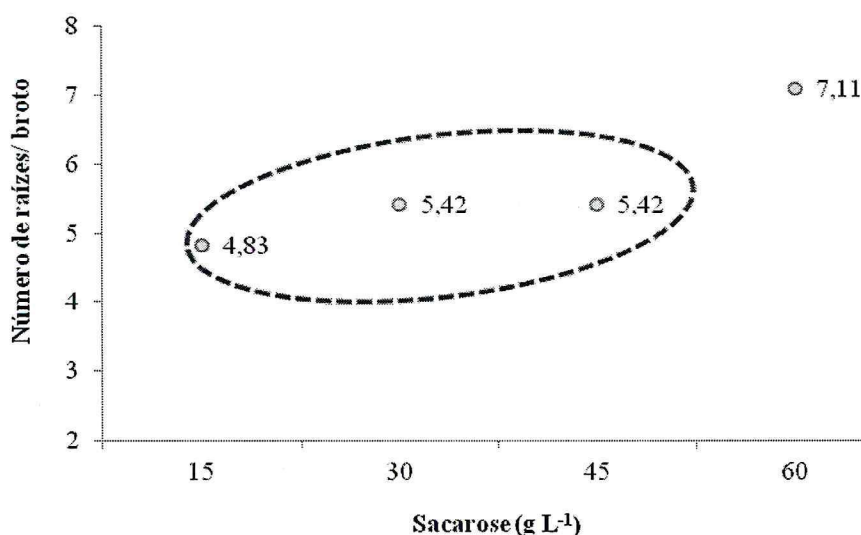
Tabela 9. Análise de variância – Interação cultivar *versus* concentrações de sacarose para o comprimento de brotos e número de folhas.

Fonte de Variação	G.L	QM		Fcalculado		Fcrítico
	CB e NF	CB	NF	CB	NF	CB e NF
Cultivar (C)	3	0,457	2,363	2,13	3,65	2,66
Sacarose (S)	3	0,292	3,391	1,36	5,23	2,66
Interação (C x S)	9	0,212	1,095	0,99	1,69	1,94
Resíduos	160	0,214	0,648			
Total	175					

Legenda: G.L - Grau de liberdade; QM – Quadrado médio; CB: comprimento de brotos; NF: número de folhas
 Comprimento de brotos: média geral = 1,124; desvio padrão = 0,489; coeficiente de variação = 43,55.
 Número de folhas: média geral = 2,006; desvio padrão = 0,908; coeficiente de variação = 45,28.

As médias obtidas do número de raízes/broto de pimenteira-do-reino quando submetidos ao meio de enraizamento *in vitro* contendo diferentes concentrações de sacarose, ao serem comparadas pelo teste Tukey formaram um grupo com as concentrações de 15, 30 e 45 g L⁻¹ no qual as médias contidas neste grupo foram de 4,83; 5,42 e 5,42, respectivamente. Estas médias não diferiram estatisticamente entre si, porém a concentração de 60 g L⁻¹ resultou na maior média (7,11) para a variável analisada (Figura 24).

Figura 24. Resultado gráfico do teste de Tukey para comparação das médias do número de raízes/broto obtidas a partir de tratamentos com diferentes concentrações de sacarose.



Legenda: As médias dentro do grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Skrebsky et al. (2004) com ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen) enraizados *in vitro*, pois obtiveram maior

número de raízes com a utilização de concentrações de sacarose entre 45 e 60 g L⁻¹ aos 15 dias após a inoculação *in vitro*.

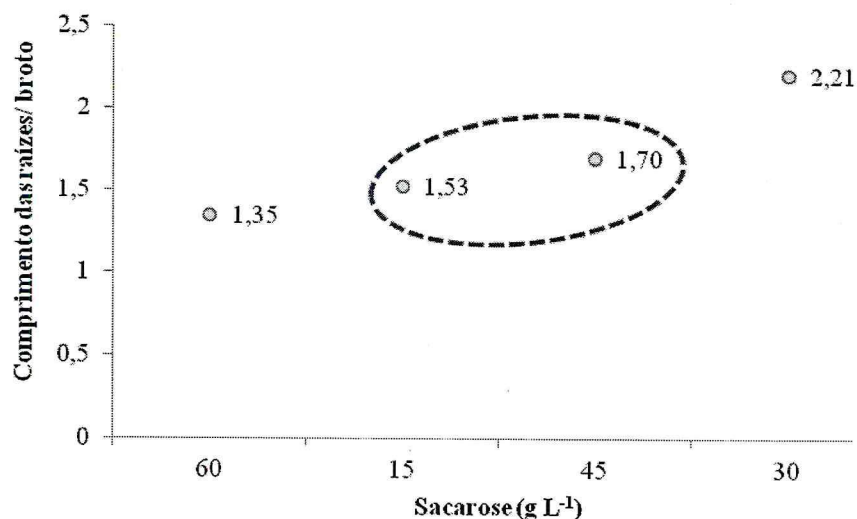
Schmidt et al., (2007) obtiveram resultados diferentes, obtendo menores percentuais de enraizamento com doses mais elevadas de sacarose no enraizamento *in vitro* de mamoeiro. Para os autores, a concentração de sacarose que promoveu o máximo enraizamento de segmentos nodais foi de 25,45 g L⁻¹, proporcionando um percentual de enraizamento de 44,7%. Nas concentrações de 45 e 60 g L⁻¹ os percentuais de enraizamento foram de aproximadamente 19 e 6%, respectivamente, enquanto que na ausência de sacarose, o percentual de enraizamento foi de 23%. Porém não são mencionados os aspectos visuais das raízes obtidas nas diferentes concentrações.

Para pimenteira-do-reino, observou-se que, apesar da dosagem de 60 g L⁻¹ apresentar a maior média para o número de raízes/broto, diferindo estatisticamente das demais, visualmente as raízes obtidas nesta concentração eram curtas e espessas. Ou seja, à medida que se aumentou a dosagem de sacarose houve a indução dos primórdios radiculares, porém com inibição em seu crescimento (Figura 27-f).

A Figura 25 mostra que ao comparar estatisticamente as médias do comprimento das raízes/ broto em meio de enraizamento, houve a formação de um grupo com as concentrações de 15 e 45 g L⁻¹, com médias de 1,53 e 1,70, respectivamente. Porém, para esta variável analisada a maior média (2,21) é representada pela concentração de 30 g L⁻¹ e a menor média (1,35) obteve-se com a dosagem de 60 g L⁻¹.

Visualmente, as raízes formadas em meio de cultura contendo a dosagem de 30 g L⁻¹ de sacarose eram mais finas e alongadas e não apresentavam pilosidade (Figura 27-d). O comprimento dos brotos, apesar de não ter diferença estatística entre suas médias, estes eram mais longos e com maior número de folhas, estatisticamente igual ao número de folhas dos brotos submetidos à dosagem de 15 g L⁻¹.

Figura 25: Resultado gráfico do teste de Tukey para comparação das médias do comprimento das raízes/broto obtidas em tratamentos com diferentes concentrações de sacarose.



Legenda: As médias dentro do grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para Schmidt et al. (2007), as concentrações de sacarose que corresponderam ao máximo crescimento de segmentos nodais e de folhas em mamoeiro foram de 28,9 g L⁻¹ e 29,4 g L⁻¹, respectivamente. O comprimento médio das raízes também seguiu essa tendência, promovendo o crescimento das raízes, com comprimentos médios em torno de 1 cm, nas concentrações de 15 e 30 g L⁻¹, enquanto que nos níveis de 0, 45 e 60 g L⁻¹ o comprimento médio das raízes foi próximo de 0,4; 0,7 e 0,6 cm, respectivamente.

O teste estatístico realizado para comparação das médias obtidas da variável número de folhas/broto formou dois grupos, A e B, não havendo diferença significativa entre as médias contidas dentro de cada um destes. O grupo B foi o que apresentou os maiores valores médios de 2,01 e 2,20 para as dosagens de sacarose de 30 e 15 g L⁻¹, respectivamente (Figura 26).

Usando concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, Dignart et al. (2009) analisando o cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*, obtiveram resultados similares para número de folhas e comprimento de parte aérea das plântulas nestas concentrações. Com base nesse resultado pode-se afirmar que, no cultivo *in vitro* de *C. walkeriana*, é possível utilizar tanto a concentração convencional de sacarose (30 g L⁻¹) como a metade desta.

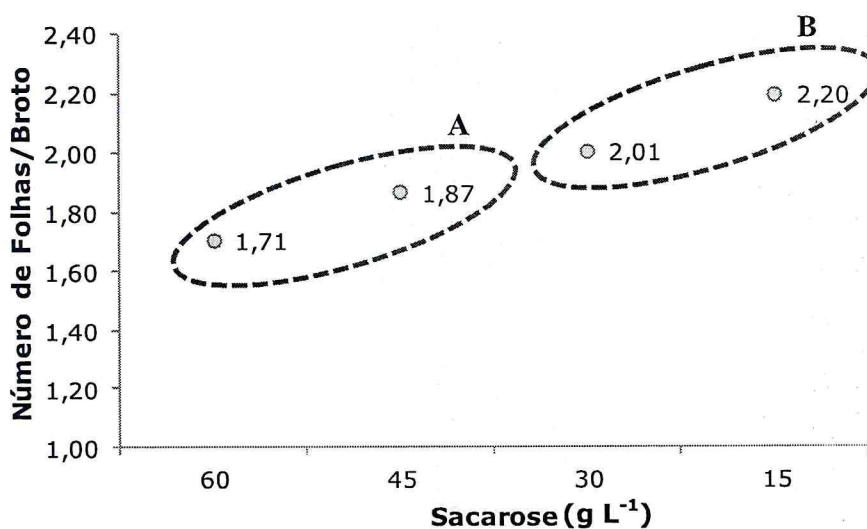
Resultados relatados por Nicoloso et al. (2001) mostraram que brotos de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, dentro de

um período de 35 ± 5 dias após a inoculação, apresentaram excelente desenvolvimento do sistema radicular, bem como da parte aérea.

Durante a rizogênese, o crescimento acelerado das raízes pode retardar o desenvolvimento da parte aérea, porque crescimento ativo do sistema radicular necessita de substâncias orgânicas translocadas da parte aérea para a base, o que compromete o desenvolvimento do caule e das folhas (BARCELÓ et al., 2001).

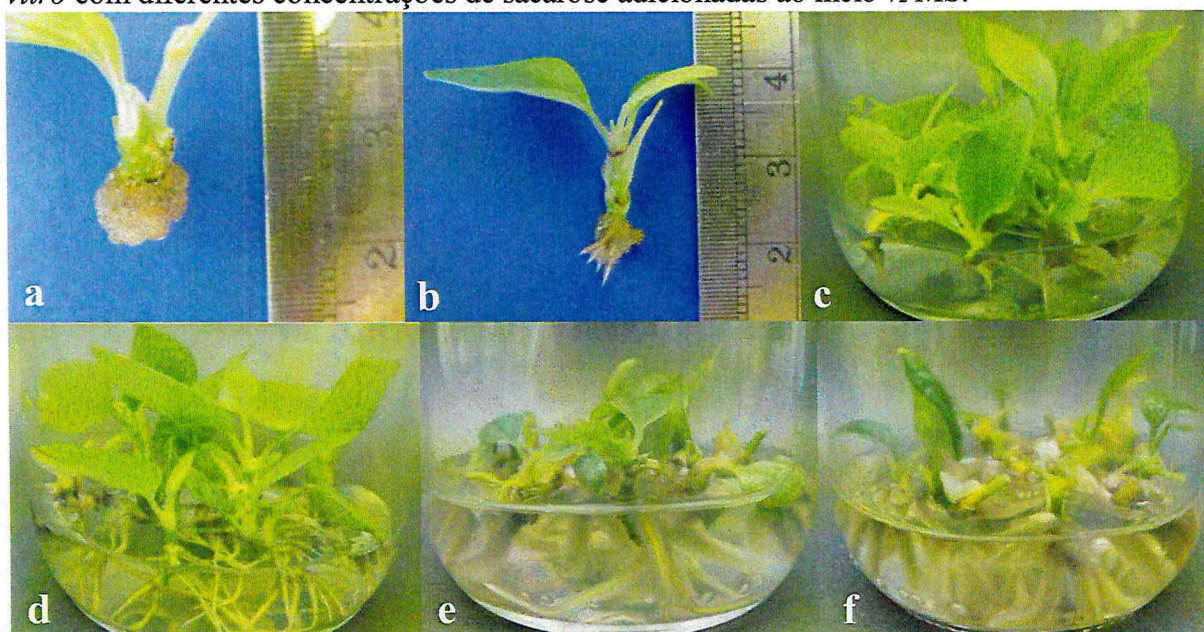
De maneira geral, para pimenteira-do-reino observou-se que o tratamento com dose de 15 g L^{-1} de sacarose durante o enraizamento *in vitro*, provocou o aparecimento de calo na base de alguns brotos, os quais desapareceram a partir do desenvolvimento dos primórdios radiculares (Figura 27-a,b). Em termos de características visuais, observou-se poucas raízes, pequenas e finas, com bom desenvolvimento da parte aérea (Figura 27-c). O número de folhas/broto nos tratamentos com 45 e 60 g L^{-1} de sacarose apresentaram-se reduzidos, além destas serem curvadas e com aspecto de vitrificação (Figura 27-e,f).

Figura 26. Resultado gráfico do teste de Tukey para comparação das médias do número de folhas/broto entre quatro concentrações de sacarose.



Legenda: As médias dentro de cada grupo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 27. Aspectos visuais de brotos de pimenteira-do-reino submetidos a enraizamento *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio $\frac{1}{2}$ MS.



Legenda: a - massa calosa na base do broto (MS+15 g L⁻¹ de sacarose); b - início do desenvolvimento de raízes ($\frac{1}{2}$ MS + 15 g L⁻¹ de sacarose); c - $\frac{1}{2}$ MS + 15 g L⁻¹ de sacarose na sexta semana de cultivo; d- $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹; e- $\frac{1}{2}$ MS + 45 g L⁻¹; f - $\frac{1}{2}$ MS + 60 g L⁻¹.

Baseado nestes resultados pode-se dizer que o aumento da concentração de sacarose, de modo geral, estimula o crescimento e a formação de raízes de algumas espécies, enquanto que em outras, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citado como benéfico na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas após fase de micropropagação.

3.3.4 Aclimatização

Observando a Figura 28 referente à 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semana de aclimatização, a, b, c e d, respectivamente, é possível perceber que os tratamentos com diferentes concentrações de sacarose, cujas cultivares foram submetidas durante o processo de enraizamento *in vitro*, influenciaram sobre as taxa de sobrevivência das plântulas.

De maneira geral, durante as quatro semanas, todas as cultivares apresentaram maiores percentuais de sobrevivência quando estas eram provenientes do enraizamento *in vitro* com 30 g L⁻¹ de sacarose, e dentre as cultivares, a Cingapura foi a que apresentou as maiores taxas

semanais de sobrevivência 93,55%; 87,63%; 84,95% e 83,87%, para a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semanas, respectivamente.

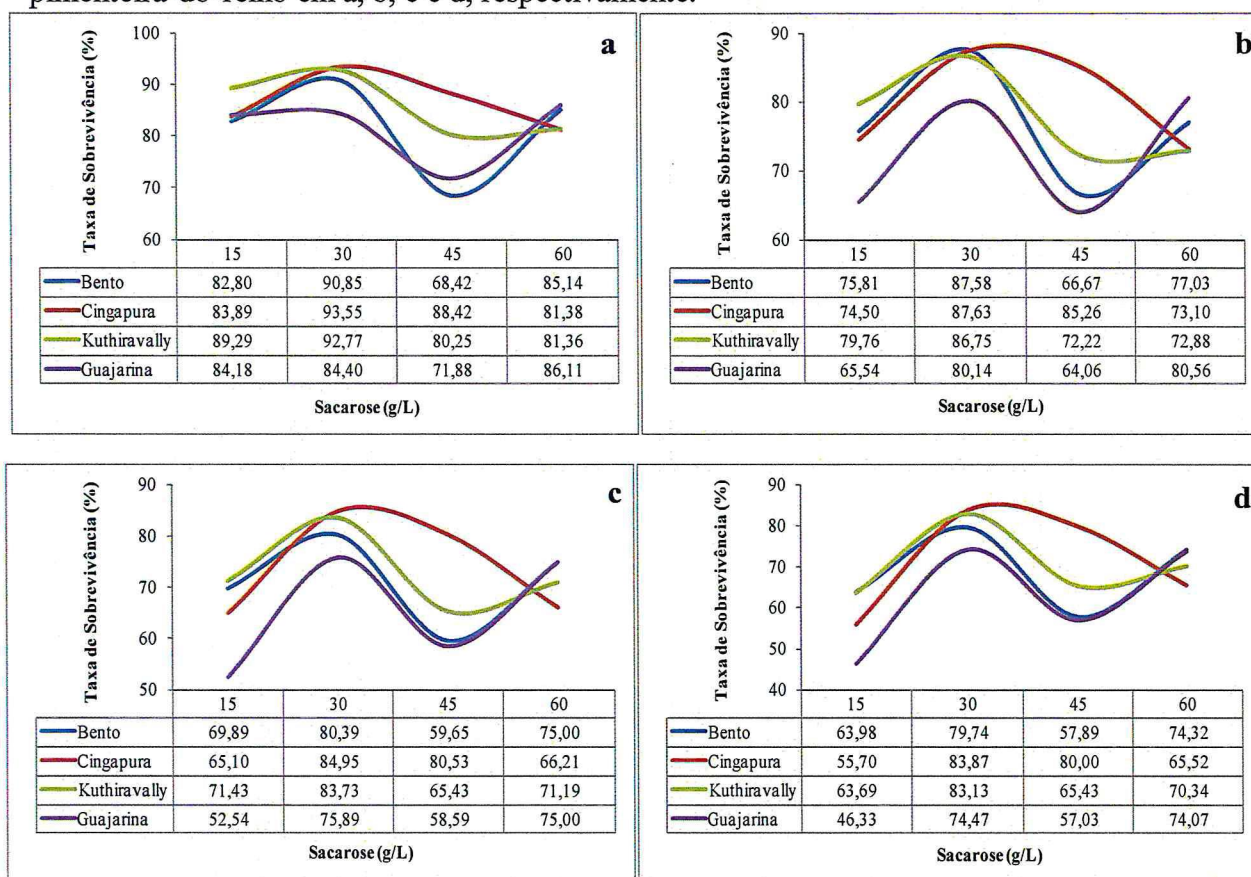
Os menores percentuais de sobrevivência foram obtidos das plântulas que vieram do enraizamento *in vitro* em meio de cultura com dosagem de 45 g L⁻¹ de sacarose e mantiveram-se constantes na 1ª e 2ª semana para todas as cultivares, exceto para Cingapura que teve seus menores valores relacionados ao tratamento com 60 g L⁻¹ para 1ª e 2ª semana com 81,38% e 73,10%, respectivamente. Entretanto, na última semana, todas as cultivares apresentaram percentuais menores de sobrevivência para as plântulas derivadas do tratamento com 15 g L⁻¹ de sacarose, exceto a cultivar Bento com 63,98% para este tratamento e 57,89% para o de 45 g L⁻¹ de sacarose.

As taxas de sobrevivência foram declinando no decorrer das semanas de aclimatização, porém na 4ª semana estas taxas apresentavam-se praticamente estáveis para plântulas aclimatizadas provenientes das dosagens com 30, 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose. Maiores taxas de mortalidades estão relacionadas às cultivares que foram submetidas à concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose durante a fase de enraizamento *in vitro*, com 5,91; 9,40; 7,74 e 6,21% para Bento, Cingapura, Guajarina e Kuthiravally, respectivamente. Para as demais concentrações de sacarose, a maior taxa de mortalidade não chegou a 2%.

Para Schmildt et al. (2007), uma das etapas mais delicadas da micropropagação é a transferência das mudas para condições *ex vitro*. Pois, para se obter sucesso durante a aclimatização, faz-se necessário otimizar a fase de enraizamento.

Entre as possíveis causas da baixa taxa de sobrevivência em plantas aclimatizadas *ex vitro*, encontra-se o estresse hídrico provocado pela mudança de ambiente e a baixa capacidade fotossintética. Maior teor em sacarose no tecido foliar está relacionado com menor taxa de fotossíntese. Entretanto, as mudas obtidas *in vitro* nas concentrações mais elevadas de sacarose (45 e 60 g L⁻¹) mostraram maior taxa de sobrevivência *ex vitro* quando comparada com doses de 15 e 30 g L⁻¹ para plantas de morangueiro durante a aclimatização (CALVETE et al., 2000).

Figura 28. Taxa de sobrevivência na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semana de aclimatização de cultivares de pimenteira-do-reino em a, b, c e d, respectivamente.



Os resultados de taxas de sobrevivência durante a aclimatização também estão diretamente relacionados à qualidade das raízes formadas durante a fase de enraizamento *in vitro*, ou seja, os tratamentos com 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose produziram raízes grossas e curtas, o que as torna indesejáveis para o posterior processo de aclimatização devido a ineficiência para absorção de água e nutrientes. Por outro lado, explantes submetidos ao enraizamento *in vitro* em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose produziram raízes finas com características desejáveis a serem submetidas à aclimatização.

Skrebsky et al. (2004), para aclimatização de ginseng brasileiro, obtiveram porcentagem de sobrevivência das plantas cultivadas *ex vitro*, as quais foram retiradas do cultivo *in vitro* na presença de 15 e 75 g L⁻¹ de sacarose foram as que apresentaram as menores porcentagens de sobrevivência. Para as plantas desenvolvidas na presença de 30, 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose obtiveram 100% de sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Segundo Calvete et al. (2000), plantas desenvolvidas por micropropagação são expostas a um meio de cultivo asséptico, com carboidratos e reguladores de crescimento, elevada umidade relativa do ar, baixa irradiação, limitados potenciais osmótico e baixa troca

de CO₂. Estes fatores contribuem para uma alta taxa de multiplicação, mas também induzem ao aparecimento de anormalidades anatômicas, morfológicas e fisiológicas, as quais interferem no estágio de transplante e aclimatização, causando baixa taxa de sobrevivência *ex vitro*.

3. 4 CONCLUSÕES

A germinação da pimenteira-do-reino, para todas as cultivares estudadas, é epígea e as plântulas são fanerocotiledonares, com início do processo de germinação no 20º dia e término aos 90 dia após a sementeira. É importante o conhecimento das várias fases do desenvolvimento da espécie para posteriores aplicações em programas de melhoramento genético.

Diferentes concentrações de NaH_2PO_4 influenciam na ontogênese da pimenteira-do-reino resultando em diferentes períodos de culminância para cada estágio na germinação *in vitro*. A concentração de $0,10 \text{ g L}^{-1}$ de NaH_2PO_4 adicionada ao meio $\frac{1}{2}$ MS é indicada para germinação *in vitro* de pimenteira-do-reino das cultivares estudadas.

Em todas as cultivares utilizadas, a associação de TDZ x BAP precisa ser otimizada para multiplicação de brotos, pois a combinações das concentrações testadas neste trabalho apresentaram aspectos indesejáveis nos brotos formados. A ausência de TDZ e presença de BAP no meio de cultura apresentaram respostas mais eficientes para obtenção de gemas.

Independente do genótipo de pimenteira-do-reino, para o enraizamento *in vitro*, a presença de sacarose como fonte de energia mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das raízes *in vitro*, tendo em vista que, na sua ausência não houve enraizamento. A concentração recomendada para adição em meio de enraizamento é de 30 g L^{-1} . Nesta concentração tem-se a formação de raízes com aspectos desejáveis para serem submetidas à aclimatização *ex vitro*.

Plantas aclimatizadas das quatro cultivares estudadas, apresentam maiores taxas de sobrevivência quando provenientes do enraizamento *in vitro* em meio de cultura contendo 30 g L^{-1} de sacarose. Plantas com raízes grossas e curtas são ineficientes para a sobrevivência no processo de aclimatização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, W. R.; BARROS, M. A. A.; MITIDIERI, J.; VENCOVSKY, R. **Correlação entre caracteres de *Sechium edule* Sw. considerada à luz da ontogenia.** Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz": Piracicaba, v. 23, p. 110-119, 1966.

AKASAKA, Y.; DAIMON, H.; MII, M. Improved plant regeneration from culture leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. **Plant Science**, v. 156, p. 169-175, 2000.

_____; CONDURÚ, J. M. P. **Cultura da pimenta-do-reino na Região Amazônica.** Belém: Instituto de Pesquisa Agropecuária Norte - IPEAN, (Série Fitotecnia), v.2, n.2, 1971. 149 p.

_____; VELOSO, C. A.C.; DUARTE, M. de L. R.; KATO, O. R. **Pimenta-do-reino: recomendações básicas para seu cultivo.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental - UEPAE, Documentos, 12), 1989. 40 p.

ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Planaltina: Embrapa Cerrados, (Documentos, 58), 2002. 16p.

ARIGITA, L.; GONZALEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p. 166-173, 2002.

BAENA, A. R. C.; RODRIGUES, T. E. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/solos.htm>>. Acesso em: 07 julho 2012.

BARCELÓ, C. J.; NICOLÁS, R. G.; SABATER, G. B.; SÁNCHEZ, T. R. **Fisiología vegetal.** 6.ed. Madri: Pirámide, 2001. 566p.

_____; _____; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R. H. S. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18 n. 3, p. 188-192, 2000.

CASTRO, F. M. de. **50 Anos da imigração japonesa na Amazônia**. Belém: Falangola, 1979. 122 p.

CASTRO, A. C. R. de [et al.]. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas – Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2009. 385 p.

CHEN, Y.; CHANG, C.; CHANG, W. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Arkansas, v. 36, n. 5, p. 420-423, Oct. 2000.

COSTA, R. S. C. da.; NASCENTE, A. S.; NUNES, A. M. L.; FERREIRA, M. das G. R.; MEDEIROS, I. M. de. **Cultivo da Pimenta-do-reino em Rondônia**. Embrapa Amazônia Oriental, Sistema de produção 4, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/CultivoPimentadoReinoRO/mudas.htm>>. Acesso em: 01 outubro 2011.

COSTA, A. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H.; CARDOSA, M. **Moléstia da pimenta do reino causada pelo vírus do mosaico do pepino**. Belém, PA: IPEAN (INPEA. Série Fitotecnia, n. 1), 1970. 18 p.

DHAR, U.; JOHSI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew (Asteraceae): effect of explants type, age, and planta growth regulators. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, p. 195-200, 2005.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun., 2009.

DUARTE, M. L. R. **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 269 p.

_____; ALBUQUERQUE, F. C. Doenças e métodos de controle. In: _____. **Cultivo da pimenteira-do-reino na região norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. p. 91-111.

_____; _____. Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) Controle de doenças. In: VALE F. C. R.; ZAMBOLIM L. (Eds). **Controle de doenças de plantas**, v. 2. Viçosa: UFV, 1997. p. 879-923.

_____; _____. **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, _____. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>>. Acesso em: 01 outubro 2011.

DUKE, J.A.; POLHILL, R.M. Seedlings of Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Garden, 1981. p.941-949.

FITCH, M. M. et al. Photoautotrophic rooting and growth of papayas *in vitro*. **Annals Society of Plant Physiologists (Abstract)**, p. 572, 2003.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

GRAÇA, M. E.C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. DE S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus Dunnii* MAID. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.43, p.107-112, jul./dez. 2001.

HOMMA, A. K. O. Introdução e importância econômica. In: DUARTE, M. de L. R. (ed.). **Cultivo de pimenta-do-reino na região Norte**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 185 p, 2004. (Sistema de produção, 1).

HUSAIN, M. K.; ANIS, M.; SHAHZAD, A. *In vitro* propagation of indian kino (*Pterrocarpus marsupium* Roxb.) using Thidiazuron. **In Vitro Cellular and Developmental Biology, Plant**. New York, v. 43, p. 59-64, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro. v.24. n.2. p 71. 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205.pdf>. Acesso em: 05 junho 2012.

_____. **Sistema de recuperação automática – SIDRA**. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?>>. Acesso em: 05 junho 2012.

INTERNATIONAL PEPPER COMMUNITY – IPC. **Pepper statistics 2001-2010**. 2011. Disponível em: <http://www.ipcnet.org/n/statpdf/index.php?p=swps>. Acesso em: 05 junho 2012.

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.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; SOUZA, F. V. D. Redução de custos na micropropagação. In: CASTRO et al. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. cap. 6, p. 153-175.

KEVERS, C.; FRANK, T.; STRASSER, R.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagação shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 77, p. 181-191, 2004.

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, E. E. P. Organogênese. In: BRASILEIRO, A. C. M. et al. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2010. cap. 4. p. 104-127.

LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 159 p. Tese de doutorado. Piracicaba - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

_____; 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), 2011. 45 p.

_____; SANTOS, L. R. R. dos; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. de M.; PINHO, J. V. da S. **Ontogenia *in vitro* de quatro cultivares de pimenteira-do-reino.** In: Congresso Brasileiro de recursos Genéticos, 1., 2010, Salvador: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. 2010a. p. 197.

_____; _____; _____; _____; GAMA, T. do S. S. **Germinação *ex situ* de sementes de pimenteira-do-reino.** In: Congresso Brasileiro de recursos Genéticos, 1., 2010, Salvador: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. 2010b. p. 134.

LIMA, M. B.; SILVA, S. de O.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Brasília, DF: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 182p. 2003.

LUCCHESI, A. A. **Utilização prática da análise de crescimento vegetal.** Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz": Piracicaba, v. 41, p. 181-202, 1984.

LUNZ, A. M. et al. **Fitossanidade na Amazônia: inovações tecnológicas.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 425p.

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.

MATURANA, H. R.; VARELA F. J.; **The tree of knowledge: the biological roots of human understanding.** Boston: Shambhala Publications, 269p. 1992.

MELO, M. G. G.; MENDONÇA, M. S.; MENDES, A. M. S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.

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

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

NAIR, K. P. P. The agronomy and economy of black pepper (*Piper nigrum* L.) - the "king of spices". **Advances in Agronomy**, 2004. v. 82, 652 p.

_____. **Agronomy and Economy of Black Pepper and Cardamom: The "king" And "queen" Of Spices**. 1.ed. Elsevier, 2011. 380 p.

NAMBIAR, P. K. V.; PILLAY, V. S. SASIKUMARAN, S.; CHANDY, K. C. Pepper research at panniyur: a resume. **Journal of Plantation Crops**, v. 6, n. 1, p. 4-11, 1978.

NEPOMUCENO, R. **O Brasil na rota das especiarias: o leva e traz de cheiros, as surpresas da nova terra**. Rio de Janeiro: José Olympio, 2005. 174 p.

NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p. 11-18, 2001.

OLIVEIRA, H. S. de. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2010.

PARTELLI, F. L. Nutrition of black pepper (*Piper nigrum* L.) - a Brazilian experience. **Journal of Spices and Aromatic Crops**. Goiás, v. 18, n. 2, p. 73 -83, outubro/2009.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PEREZ, J. T.; EGEA, J.; OLMOS, E.; BURGOS, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars. **In Vitro-Plant**, New York, v. 93, p. 250-254, 2001.

POLOVNIKOVA, M. G. e VOSKRESENSKAYA, O. L. Activities of antioxidant system components and polyphenol oxidase in ontogeny of lawn grasses under megapolis conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**. Ioshkar-Ola, v. 55, n. 5, p. 699-705. 2008.

POLTRONIERI, M. C. **Mídia digital** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por ana.robert@hotmail.com em 21 de agosto, 2012.

_____.; LEMOS, O. F. de; ALBUQUERQUE, F. C. **Pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. In: **Programa de melhoramento genético e adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, documentos, v. 16, p. 127-137, 1999.

_____.; ALBUQUERQUE, F. C. de; DUARTE, M. de L. R. **Cultivares**. In: **Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental, Sistema de produção 01, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/importancia.htm>. Acesso em: 01 outubro 2011.

PROJETO PAS CAMPO. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da pimenta-do-reino**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p.

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, 2006. p.1266-1278.

SAMPAIO, Diana Salles. **Ontogênese floral, esporo e gametogênese em anteras de *Aeschynomene falcata* (Poir) DC. e *Aeschynomene sensitiva* Sw. (Papilionoideae – Leguminosae)**. 2005. 177 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T. do; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agrária**, Paraná, v.8, n.1, p.25-31, 2007.

SERRANO, L. A. L.; Lima, I. M.; Martins, M. V. V. **A cultura da pimenteira-do-reino do Estado do Espírito Santo**. INCAPER, Vitória. 2006.

SILVA, B. S. O. e; DRUMOND NETO, A. P.; SILVA, M. B. da. Pimenta-do-reino: importância da defesa fitossanitária para a sustentabilidade da atividade na região norte do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, Viçosa, v.1, n.1, p.84-88, julho. 2011.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. A. de L.; MATOS, V. P.; GONÇALVES, E. P. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* Willd., leguminosae – papilionideae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 104-114, 2008.

SILVA, R. dos S.; SOUZA, C. R. B. de; Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 255 – 260. 2009.

SINGH, N. D.; SAHOO, L.; SARIN, N. B.; JAIWAL, P. K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus Cajan* L. Mill.). **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 341-347, 2003.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E. Sacarose e período de cultivo in vitro na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, set/out, 2004.

SOUZA, A. V. de; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K.V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. de. Germinação de embriões e multiplicação in vitro de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, dez., 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artemed, 2009. 819 p.

TREMACOLDI, C. R. **Tecnologia para o controle da podridão de raízes em mudas de pimenteira-do-reino**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, (Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado técnico, 226), 2011. 4 p.

VAN BELLEN, H. M. **Indicadores de Sustentabilidade: uma análise comparativa**. Fundação Getúlio Vargas. 1ª ed. Rio de Janeiro, 2005. 256 p.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G. S.; MIYATA, L. Y. Cloreto de potássio e fósforo de sódio na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Tupy. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 37-41, jan./fev., 2008.

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

WHITE, P. R. **A handbook of plant tissue culture.** Lancaster: J. Cotteil, 1963. 345 p.

ANEXOS

Anexo A. Exportação total em toneladas de pimenta-do-reino dos principais países produtores no período de 2001 e 2010.

PAÍS	2001	2010
Brasil	33,885	28,786
Índia	22,740	15,464
Indonésia	23,684	49,146
Malásia	23,220	11,189
Sri Lanka	3,161	12,219
Vietnã	54,000	96,860
Thailândia	437	1,200
Madagascar	811	1,400
Outros	466	7,000
TOTAL	162,404	223,264

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados extraídos da International Pepper Community – IPC (2011), e representa uma pequena amostra dos dados disponíveis em <http://www.ipcnet.org/n/statpdf/index.php?p=toc>.

Anexo B. Produção total em toneladas e área cultivada em hectares de pimenteira-do-reino nos países produtores, no ano de 2010.

PAÍS	2010	
	Produção (t)	Área Cultivada (ha)
Brasil	34,000	20,000
Índia	50,000	182,000
Indonésia	59,000	145,000
Malásia	23,500	15,500
Sri Lanka	16,730	30,714
Vietnã	110,000	50,000
China, PR.	24,800	24,000
Thailândia	9,750	4,000
Madagascar	2,800	2,800
Outros	7,800	3,000
TOTAL	338,380	476,514

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados extraídos da International Pepper Community – IPC (2011), e representa uma pequena amostra dos dados disponíveis em <http://www.ipcnet.org/n/statpdf/index.php?p=toc>.

Anexo D. Composição do meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962).

Composto	mg.L ⁻¹
Macronutrientes	
KHO ₃	1.900
NH ₄ NO ₃	1.650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fe-EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
NaEDTA	37,3
Vitaminas	
Tiamina – HCl	0,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	100,0
Outros	
Sacarose	30.000,0
pH	5,8