



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA

Embrapa
Amazonia Oriental

FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES

**COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES
DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.) SUBMETIDAS AO CULTIVO *IN VITRO* COM FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.**

10/06
10/06
637872
M

**BELÉM-PARÁ
2015**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA

Embrapa
Amazônia Oriental

FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES

**COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES
DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.) SUBMETIDAS AO CULTIVO *IN VITRO* COM FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis Alb.***

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

BELÉM-PARÁ

2015



Universidade Federal da Amazônia

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMBRAPA BRASILIANA DE SEGUROS / AGROPECUÁRIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA



FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES

Moraes, Fabrícia Kelly Cabral

Comportamento morfológico e bioquímico de cultivares de pimenteira do reino (*Piper nigrum L.*) submetidas ao cultivo *in vitro* com filtrado de cultura de *Fusarium solani f. sp. piperis Alb.* /
Fabrícia Kelly Cabral Moraes. - Belém, 2015.

90 f. il.

Tese (Doutorado em Agronomia / Área de Concentração Produção Vegetal) – Universidade Federal Rural da Amazônia/Embrapa Amazônia Oriental, 2015.

1. Pimenteira do Reino - Cultivo 2. Pimenteira do Reino - Morfofisiologia 3. Filtrado Fúngico 4. *Piper nigrum* I.Título

CDD – 633.84

HERMINIUS

2016

FABRÍCIA KELLY CABRAL MORAES

**COMPORTAMENTO MORFOFISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE CULTIVARES
DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.) SUBMETIDAS AO CULTIVO *IN VITRO* COM FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia: área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro

Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

Aprovada em 28 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro - Presidente/Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dra. Simone de Miranda Rodrigues - 1º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dra. Hérica Santos de Oliveira - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dra. Joánné Moraes de Melo Souza - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa - 4º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

DEDICO

À minha mãe Lúcia Cleide Cabral Moraes, meu referencial de força e coragem.

Às minhas irmãs (Francianny, Kedma, Jaqueline e Rose) e sobrinha Náyra Luize por também darem sentido ao meu esforço.

Aos meus amigos e demais familiares, tão importantes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amor, amigo e companheiro Anderson Cabral, todo meu respeito e carinho.

OFEREÇO

Ao meu pai, João Furtado Moraes “in memorian”, meu referencial de bondade e sabedoria o qual me ensinou que o amor, a honestidade e acima de tudo a gratidão são as maiores dádivas de Deus.

Obrigada Pai, por tudo em que você me tornou.

Sou obra sua!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por sua infinita misericórdia, pelo dom da vida, força de vontade, saúde e por não me deixar esmorecer frente às dificuldades, permitindo assim, meu crescimento profissional e pessoal. Por me abençoar colocando em meu caminho pessoas tão especiais e principalmente por me mostrar que o amor e o respeito são essenciais seja em casa ou no trabalho, prevalecendo sobre as divergências e diferenças no decorrer do percurso.

Apoio Técnico/Científico

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, por ter me proporcionado minha formação profissional e por mais esta oportunidade de realizar este Curso.

A Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a e coordenadora do Curso de Pós-graduação, Dra. Herdjania Veras de Lima, por sua dedicação e empenho para com os docentes, discentes e para elevar o nível do curso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro, por sua competência e a quem estimo e admiro, por sua dedicação à pesquisa científica. Por todos os ensinamentos e orientação que recebi ao longo de nossa convivência. Pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

Ao corpo da docente da Pós Graduação, os quais não mediram esforços para transmitir valiosos conhecimentos e que tive o privilégio de conviver, em especial: Gisele Barata, Herdjania Veras, Ana Cristina Aguiar, Elisa Moura, Ana Rita de Lima.

À Dra. Simone de Miranda Rodrigues, Prof^a Dra. Joanne Moraes de Melo Souza e Prof. Dr. Roberto Cezar Lobo da Costa e a Prof^f Dra. Hérica Santos de Oliveira pela participação nesta banca, cujas contribuições são de significativo valor.

Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental

A Dra. Célia Regina Tremacoldi por ceder os isolados do fungo utilizado neste trabalho. Por sua amabilidade, atenção, esclarecimentos, e por estar disposta a ajudar e ensinar durante o minha estada no laboratório de fitopatologia.

Aos estagiários do laboratório de fitopatologia, em especial a Luciane Reis e Samuel Amaral e funcionário Sr. Manoel pelo auxílio durante as análises fitopatológicas no decorrer do experimento.

Laboratório Recursos Genéticos e Biotecnologia Vegetal da Embrapa Amazônia Oriental

Ao meu Co-orientador Dr. **Oriel Filgueira de Lemos** responsável pelos meus “primeiros passos” na Biotecnologia e pelo meu entusiasmo neste trabalho, digno de minha admiração e respeito, por sua dedicação. Agradeço pelas horas extras, tão valiosas para a conclusão deste trabalho e principalmente pelos muitos conselhos e ensinamentos profissionais e pessoais, que me acompanharão pelo resto de minha vida.

Os funcionários pela convivência e ajuda durante a realização deste trabalho, em especial: **Sr. José Gilberto Alves Costa** pelo respeito, auxílio, conselhos e pelos momentos de descontração.

A Dra. **Ilmarina Campos de Menezes** pela convivência diária, pelos conselhos, disponibilidade em ajudar e pelos momentos de descontração durante minha permanência no laboratório. Muito obrigada.

A Pesquisadora Dra **Simone Miranda** por sua alegria, descontração e por nossas conversas instrutivas.

As mestres **Camila Sousa, Dávia Leite, e Meiciane Campelo** e as doutoranda **Marly Pedroso, Helaine Pires e Lana Reis** pela amizade, pelas conversas e conselhos, pelos momentos de descontração e pelo auxílio quando solicitadas.

Aos demais colegas de laboratórios pela convivência e auxílio, quando necessário, durante o desenvolvimento das minhas atividades, em especial a **Orlando Maciel**.

Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia

À Profª Dra. **Gisele Barata** por ter permitido-me utilizar a estrutura de seu laboratório para a realização das análises bioquímicas. Por seus conselhos, atenção e esclarecimentos durante este período.

À Doutoranda **Ana Carolina Bueno** e a Mestre **Mayara do Nascimento** pela receptividade e disponibilidade com que me receberam, durante minha estada no Laboratório de Proteção de Plantas.

Família e amigos

Aos meus pais **Lúcia Cleide Cabral Moraes e João Furtado Moraes** (*In memoriam*), pelos ensinamentos, pela oportunidade de estudar, pela educação, princípios, honestidade e incentivo que me proporcionaram durante toda minha vida acadêmica. A melhor forma de retribuí-los é através de meu crescimento profissional e pessoal.

As minhas irmãs **Fracianny Moraes, Kedma Moraes, Jaqueline Moraes, Rose Moraes**, aos cunhados **Rogério Vieira e Rubenson Santos** e a minha amada sobrinha **Náyra Luize**, pela convivência e pelos momentos de felicidade e dificuldade que compartilhamos. Obrigada pelo incentivo.

Ao meu companheiro **Anderson Cabral** mesmo estando longe fisicamente, está presente em minha vida todos os dias, sempre com uma palavra amiga nos momentos mais difíceis. Pelo amor e cumplicidade que compartilhamos e pela paciência que teve comigo durante o período do Doutorado, principalmente por me incentivar e tranquilizar, por me ajudar na redação desta tese e pelos momentos inesquecíveis que coloriram esta etapa.

Aos demais familiares: avós, tias, tios, primas e primos maternos e paternos pelo incentivo.

A minha amiga e irmã Profª. Dra. **Hérica Santos de Oliveira** por seus conselhos e sugestões, por todo seu carinho, por compartilhar das minhas aflições, dificuldades e alegrias. Por me tranquilizar nos momentos de inquietação. Sei que posso e poderei contar e confiar sempre em sua amizade. Amizade não se explica ela simplesmente acontece!

Ao amigo Doutorando **Gledson Luiz Salgado de Castro** pela amizade, por dividir comigo os momentos de dificuldade durante a execução do experimento, pela ajuda durante o decorrer dos trabalhos, mas também pela dedicação e paciência, por todos os momentos de inquietação desde os tempos de mestrado, dos quais já se passaram mais de seis anos de uma agradável convivência.

Ao amigo MSc. **Dalton Dias da Silva Junior** por sua amizade, que certamente persistirá com o tempo. Pela oportunidade de aprender e por dividir comigo seus conhecimentos, por auxiliar nas análises bioquímicas, por sua ajuda e conselhos. Por sua responsabilidade e dedicação profissional.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Agronomia, em especial **Bruna Fujiyama, Hadrielly Borges, Déborah Galdino, Walter Velasco** pela convivência, respeito, incentivo e companheirismo durante o período de estudos. A todos, meus votos de sucesso e realização profissional e pessoal.

As amigas **Natasha Nina, Danielly Borges e Marcelle Auday** que não me faltaram nos momentos mais importantes.

Enfim, a todos que por ventura não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização desta tese.

MUITO OBRIGADA!

"Todas as vitórias ocultam uma abdicação".

(Simone Beauvoir)

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante"

(Antoine de Saint-Exupéry)

"A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma".

(John Ruskin)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Etapas da coleta e assepsia de sementes de <i>P. nigrum</i>	25
Figura 2 - Cultivo do isolado de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> e obtenção do filtrado de cultura fúngica	27
Figura 3 - Experimento com filtrado de diferentes concentrações 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v) em meio de cultura básico com a metade da concentração de sais de MS(1/2 ms).	28
Figura 4 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) de filtrado de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i>	30
Figura 5 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40, 50%) do filtrado de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias da inoculação.....	31
Figura 6 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) do filtrado de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação.....	32
Figura 7 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) do filtrado de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação.....	33
Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50 %) do filtrado de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação.....	34
Figura 9 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50 %) do filtrado de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre a área foliar específica de plantas de <i>P. nigrum</i> da cultivar Guajarina cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação.....	35
Figura 10 - Acúmulo de carbono total (CT) nas partes das plantas de <i>P. nigrum</i> cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias da imposição dos tratamentos.....	36
Figura 11 - Acúmulo de nitrogênio total (NT) nas partes das plantas de <i>P. nigrum</i> cultivadas <i>in vitro</i> após 45 dias da imposição dos tratamentos.....	36

CAPÍTULO 3

Figura 12 - Etapas da coleta e assepsia de sementes de <i>P. nigrum</i>	49
Figura 13 - Cultivo do isolado de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> e obtenção do filtrado de cultura fúngica	51
Figura 14 - Efeito das doses 0 e 35% de filtrados de cultura do isolado de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre as diferentes cultivares de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i>	58

Figura 15 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre o número de raízes, comprimento de raízes, massa fresca e massa seca de raízes de plantas de pimenteira-do-reino (<i>P. nigrum</i> L.) <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação.....	59
Figura 16 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre o número de gemas, comprimento do caule, massa fresca e massa seca do caule de plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação	60
Figura 17 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre o número de folhas, massa fresca , massa seca, área foliar total e área foliar específica de plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação	62
Figura 18 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre biomassa total de plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação	63
Figura 19 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre a razão de massa raiz, razão de massa foliar, razão de massa caule, razão de área foliar e razão raiz/parte aérea de plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação	64
Figura 20 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> sobre a taxa de crescimento relativo e a taxa assimilatória líquida de plantas de pimenteira-do-reino (<i>P. nigrum</i> L.) <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação	65
Figura 21 - Conteúdo de clorofila total, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e clorofila <i>a/b</i> das plantas de pimenteira-do-reino (<i>P. nigrum</i> L.) <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	66
Figura 22 - Conteúdos foliares de glicose em plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	67
Figura 23 - Conteúdos foliares de frutose em plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	68
Figura 24 - Conteúdos foliares de amido em plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	69
Figura 25 - Conteúdos foliares de aminoácidos totais em plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	70
Figura 26 - Conteúdos foliares de proteínas em plantas de <i>P. nigrum</i> <i>in vitro</i> após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP = Adenosina 5-difosfato
AFE = Área foliar específica
AFT = Área foliar total
AIA = Ácido Indol-3-acético
BAP = 6-benzilaminopurina
BSA = Albumina de soro bovino
°C = Graus Celsius
 $C_2H_3NaO_2$ = Acetato de sódio
EDTA = Ácido Etilenodiaminotetracético
EtOH = Álcool etílico
G6PDH = Glicose 6-fosfato desidrogenase
KOH = Hidróxido de potássio
 $MgCl_2$ = Cloreto de magnésio
mg – Miligrama
mL – Mililitro
 μL – microlitro
mM – Milimol
PGI = Fosfoglicose isomerase
pH = Potencial de Hidrogênio iônico
TAL = Taxa assimilatória líquida
TCR = Taxa de crescimento relativo
RAF = Razão de área foliar
RMC = Razão de massa caule
RMF = Razão de massa foliar
RMR = Razão de massa raiz
rpm = Rotações por minuto
NADP = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
 $NaClO$ = Hipoclorito de sódio
 NaH_2PO_4 = Fosfato de sódio monobásico
 $NaOH$ = Hidróxido de sódio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	15
2. REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2	20
COMPORTAMENTO MORFOLÓGICO DE PLANTAS DE PIMENTA PRETA SUJEITAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FILTRADO DE <i>Fusarium solani</i> f. sp <i>piperis</i> .	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
2.1. INTRODUÇÃO	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.2.1. Coleta dos frutos, Assepsia das sementes e Germinação <i>in vitro</i>	24
2.2.2. Propagação <i>in vitro</i> e multiplicação dos brotos doadores de explantes de <i>Piper</i> <i>nigrum</i>	25
2.2.3. Enraizamento dos brotos.....	26
2.2.4. Cultivo e Obtenção do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	26
2.2.5. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas <i>in vitro</i>	27
2.2.6. Análises morfológicas e de crescimento.....	28
2.2.7. Quantificação de Carbono e Nitrogênio orgânico total	29
2.2.8. Análise estatística	29
3. RESULTADOS	30
3.1. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas <i>in vitro</i>	30
3.2. Análises Morfológicas	30
3.3. Análises de Crescimento.....	33
3.4. Quantificação de Carbono e Nitrogênio orgânico total	35
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES	41
CAPÍTULO 3	44
VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E DE CRESCIMENTO EM QUATRO CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO (<i>Piper nigrum</i> L.) SUBMETIDAS AO CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM FILTRADO DE CULTURA DE <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> Alb.	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
3.1. INTRODUÇÃO	46
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.2.1. Coleta dos frutos e Assepsia das sementes	48

3.2.2. Obtenção e Multiplicação dos brotos doadores de explantes de <i>Piper nigrum</i> L.	49
3.2.3. Enraizamento e alongamento <i>in vitro</i> dos brotos	50
3.2.4. Cultivo do isolado do fungo e preparo do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	50
3.2.5. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas <i>in vitro</i>	51
3.2.6. Análises morfológicas das plantas submetidas ao filtrado.....	52
3.2.7. Análise estatística	52
3.2.8. Análises de crescimento das plantas submetidas ao filtrado.....	53
3.2.9. Determinações Bioquímicas de plantas submetidas ao filtrado	54
3.2.9.1. Pigmentos cloroplastídicos.....	54
3.2.9.2. Determinação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose)	55
3.2.9.3. Determinação de Amido	55
3.2.9.4. Determinação de Aminoácidos Totais	56
3.2.9.5. Determinação do Teor de Proteínas.....	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Análises morfológicas e de crescimento.....	58
4.2. Determinações Bioquímicas.....	65
4.2.1. Pigmentos cloroplastídicos	65
4.2.2. Determinação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose)	67
4.2.2.1. Glicose	67
4.2.2.2. Frutose.....	67
4.2.2.3. Sacarose	68
4.2.3. Determinação de Amido	68
4.2.4. Determinação de Aminoácidos Solúveis Totais.....	69
4.2.5. Determinação do Teor de Proteínas Solúveis Totais	70
5. DISCUSSÃO	72
5.1. Análises morfológicas e de crescimento.....	72
5.2. Determinações Bioquímicas.....	76
6. CONCLUSÕES	81
7. CONCLUSÕES GERAIS	82
8. REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	88

RESUMO

A cultura da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L) tem grande expressão econômica para o Brasil e particularmente para o Estado do Pará, pois é um produto tipicamente de exportação, mas apresenta grande oscilação de preço no mercado internacional. Entretanto, o fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* provoca a doença fusariose o que tem ocasionado sérios prejuízos na produção e ciclo econômico no Brasil. O objetivo deste trabalho foi averiguar o comportamento das cultivares de pimenteira-do-reino *in vitro* submetidas a cultivo em meio de cultura MS com adição de filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*, quanto às alterações no crescimento, na morfofisiologia e na bioquímica das plantas. Para tanto, frutos das cultivares Guajarina, Kottanadan, Balankotta e Cingapura foram coletados e as sementes germinadas *in vitro* para produção de plantas. Inicialmente os frutos no estádio maduro de coloração amarela e vermelha, foram coletados e submetidos à pré-asepsia a qual constatou de: despolpamento das sementes, lavagem em água corrente com detergente líquido, imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% durante a noite em estufa a 37°C. Das plantas vigorosas e mais desenvolvidas, explantes (segmento apical e nodal) foram retirados e introduzidos em meio de cultura de multiplicação de brotos durante cinco subcultivos em meio básico MS, 3% de sacarose e 0,2% de phytigel, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,2 mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e submetido à autoclavagem por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm e 120 °C. Os brotos multiplicados após cinco subcultivos foram enraizadas em meio de cultivo com a metade dos sais de MS (½ MS), vitaminas, 3% de sacarose e 0,2% de phytigel, suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de Ácido Naftalenoacético, em 4 semanas. Para a determinação da concentração do filtrado em meio de cultura visando avaliar o comportamento das cultivares, brotos enraizados *in vitro* da cultivar Guajarina foram cultivados em meio de multiplicação de brotos com a adição de filtrado fúngico nas doses 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v).. Após 45 dias foram avaliados os aspectos morfofisiológicos. Foram observadas alterações morfológicas e redução no crescimento da cultivar Guajarina a partir da dose 20% de filtrado fúngico. As alterações provocadas foram no comprimento radicular, número de raízes, número de folhas e área foliar, proporcionalmente reduzidos à medida que se aumentou a concentração de filtrado fúngico. Então, brotos enraizados das quatro cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) em meio de cultivo MS (½ MS), vitaminas, 3% de sacarose e 0,2% de phytigel, suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de Ácido Naftalenoacético (ANA) em 4 semanas foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultivo ½ MS e filtrado fúngico nas doses 0 e 35% (v/v), e mantidas em sala de crescimento sob condições controladas com fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 3000 lux e temperatura de 25 ± 2°C, e avaliados quanto as alterações na morfologia, bioquímica e crescimento. Foram observadas alterações morfológicas e redução no crescimento das cultivares quando submetidas a ação do filtrado fúngico. O filtrado de cultura fúngica provocou alterações morfofisiológicas principalmente no sistema radicular. O filtrado fúngico acarretou diminuição na produção de biomassa total e na taxa de crescimento relativo das plantas de *P. nigrum*, com exceção da cultivar Kottanadan. Ocorreu redução na concentração de proteínas nas cultivares de pimenteira-do-reino. Observou-se ainda alterações nos conteúdos de glicose, frutose e amido para as cultivares Guajarina e Kottanadan. Desta forma, as cultivares de *P. nigrum* apresentam respostas morfofisiológicas, bioquímicas e de crescimento distintas quando sob a ação do filtrado fúngico, sendo a cultivar Cingapura a mais suscetível ao filtrado fúngico e a menos suscetível a cultivar Kottanadan.

Palavras chave: Pimenteira do Reino - Cultivo. Pimenteira do Reino - Morfofisiologia. Filtrado Fúngico. *Piper nigrum*.

ABSTRACT

The plantation of Black pepper (*Piper nigrum* L) is very expressive in Brazil and, particularly in the state of Pará, since it is mostly grown for exportation and its price has a remarkable variation in the international market. However, one factor which seriously affects its production is the occurrence of fusarium, caused by the fungi *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, which occurs at epidemic levels in crop areas. This paper aimed to find possible differences among the cultivars of black pepper *in vitro* when submitted to filtrates obtained from the culture of *F. solani* f. sp. *piperis*, as well as to check the magnitude of the changes in growth, morphophysiology and biochemical features of *P. nigrum*. In order to do so, black pepper fruits, from Guajarina, Kottanadan, Balankotta and Singapore cultivars were collected and at Western Amazon Embrapa- Belém/Pará laboratory, seeds were inserted *in vitro* to grow the plants. At first, the mellow fruits with yellow and red colors, were collected and submitted to pre-sterilization, which comprised: seeds pulping, washing in running water and immersion in sodium hypochlorite (NaClO) at 1.5% during the night in a greenhouse at 37°C. The seeds were grown *in vitro* in medium with MS (½ MS), with 3% of saccharose, vitamins, 0.17 g.L⁻¹ NaH₂PO₄ (monobasic sodium phosphate), 0.2% of phytigel. The plants which showed better formation were selected and multiplied by five sub-crops in basic medium of MS culture containing 3% of saccharose, 0.2% of vitamins and 0.2% of phytigel and supplemented with 0.5% mg.L⁻¹ of 6-benzilaminopurina and 0.2 mg.L⁻¹ of indoleacetic acid. The medium pH was adjusted to 5.8 and submitted to autoclaving for 20 minutes under a pressure of 1.5 atm and at 120 °C. The sprouts multiplied after five sub-crops were fixed onto a medium with ½ MS, 0.2% of vitamins, 3% of saccharose and 0.2% of phytigel and supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ of Naphthaleneacetic acid, and kept under such conditions for four weeks. Plants from the Guajarina cultivar were used for an initial experiment, since this cultivar is the one most grown in the state, and fungal filtrate in doses 0, 20, 30, 40 and 50% (v/v). The pH of the medium was adjusted to 5.8 and submitted to autoclaving for 20 min under pressure of 1.5 atm and 120 °C. After 45 days from the beginning of the procedure, the morphophysiological aspects were then assessed. Morphological changes and growth decrease were observed on the Guajarina cultivar from the dose with 20% of fungal filtrate. The alterations observed were in the root length, number of roots, numbers of leaves and leaf area, proportionally reduced as long as the concentration of fungal filtrate increased. Thus, the fungal filtrate in medium in any concentration causes alteration on the *in vitro* growth of plants from the Guajarina cultivar. Doses with 30% or more were considered efficient to be used in other experiment. Another experiment with black pepper from four cultivars of *P. nigrum* (Singapore, Balankotta, Kottanadan and Guajarina), cultivated *in vitro* and submitted to a filtrate obtained from a culture of *F. solani* f. sp. *piperis* was done. Plants rooted onto a medium with MS (½ MS), 0.2% if vitamins, 3% of saccharose and 0.2% of phytigel and supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ Naphthaleneacetic acid for four weeks were transferred to test tubes containing medium of ½ MS and fungal filtrate in doses 0% and 35% (v/v), kept in growth rooms under controlled conditions with photoperiod of 16 hours with luminous intensity of 3000 lux and temperature of 25 ± 2°C, and evaluated after this period in relation to alterations in growth, biochemical and morphological features. Growth decrease and morphological changes were observed on the cultivars when submitted to the action of the fungal filtrate. The filtrate of fungal culture caused morphophysiological changes mainly in the root systems of the cultivars of black peppers *in vitro*. The fungal filtrate caused decreases in the total biomass production and in the relative growth rate of *P. nigrum* plants, except the cultivar Kottanadan. We also observed that the fungal filtrate decreases the concentration of proteins in the black pepper cultivars. Changes in the contents of glucose, fructose and starch were also noticed on the cultivars of Guajarina and Kottanadan. Therefore, the cultivars of *P. nigrum* present distinct morphophysiological, biochemical and growth-related responses once under action of the fungal filtrate, so that the Singapore cultivar is the most susceptible to the fungal filtrate and the least susceptible is the Kottanadan cultivar.

Keywords: Black pepper plant – cultivation. Black pepper – morphophysiology. Fungal filtrate. *Piper nigrum*.

CAPÍTULO I

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a mais importante especiaria comercializada mundialmente. É utilizada em larga escala como condimento, em forma de grãos inteiros ou moídos e misturados a outros condimentos; e geralmente usada como aditivo para aumentar o sabor dos alimentos em diferentes preparações (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005). Possui um óleo volátil, de sabor picante, e o alcalóide piperina é responsável pelo seu aroma intenso (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005) e por uma variedade de atividades farmacológicas (BAJAD, SINGLA; BEDI, 2002). O óleo de pimenta desempenha um papel importante na fabricação de produtos de perfumaria, confeitoraria e os óleos voláteis, além dos extratos possuírem atividade antioxidante e antifúngica (SINGH et al., 2004).

O Brasil é um dos maiores produtores de pimenta-do-reino e ocupa a 4º posição na produção mundial desta especiaria (FAO, 2012). Em 2015 a área plantada foi de 30.683 ha e a produção foi de 49. 570 t (IBGE, 2015). Os principais estados produtores no Brasil, além do Pará, são o Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Paraíba e Maranhão (IBGE, 2015).

O Pará é o maior produtor, responsável por 90% da produção nacional. Embora tenha a maior área colhida, sua produtividade atual é baixa (2,15 t/ha) (IBGE, 2015). Vários fatores têm contribuído para a baixa produtividade e queda de produção e, dentre eles, está a fusariose ou podridão-das-raízes (KANNO, 2005). A pimenteira-do-reino apresenta grande variação de preço no mercado internacional, o que vem estimulando ou desestimulando seu cultivo. A fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, tem diminuído significativamente a produtividade dos pimentais limitando a expansão desta cultura (HOMMA et al., 2004), pois diminui drasticamente o ciclo produtivo da planta, tornando-o mais curto, com média de cinco a seis anos de sobrevivência em área de ocorrência da doença (LEMOS, 2003) e aumentando os custos de produção, comprometendo a perspectiva de investimento na cultura. (HOMMA et al., 2004).

O gênero *Fusarium* é habitante dos solos, apresentando espécies saprofíticas e outras patogênicas (que também podem sobreviver saprofiticamente em restos culturais) que, geralmente, podem afetar o sistema radicular de várias espécies vegetais (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). O *F. solani* é a espécie mais importante envolvida com podridão de raízes e, em alguns casos, com a podridão do colo da planta (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

O controle dessa doença vem sendo investigado desde os anos 60. Medidas baseadas em controle cultural (aumento de matéria orgânica no solo), químico (uso de agrotóxicos), biológico (uso de microrganismos) e genético (por meio de melhoramento clássico e técnicas biotecnológicas) têm sido empregadas para auxiliar no combate ou minimizar os danos causados por esta doença (BENCHIMOL et al., 2000).

Neste contexto, a seleção *in vitro*, utilizando fitotoxinas presentes no filtrado do fungo é uma técnica biotecnológica que pode ser utilizada como ferramenta para auxiliar programas de melhoramento genético (MATSUMOTO et al., 1999). No caso da pimenteira-do-reino a obtenção de materiais que apresentem produtividade e resistência a doenças é um aspecto importante para o melhoramento genético da cultura.

As fitotoxinas ou micotoxinas são metabolitos biologicamente ativos de baixo peso molecular, produzidas por patógenos que causam danos aos tecidos vegetais e que estão envolvidas no desenvolvimento da doença, sendo importantes no estabelecimento do patógeno no interior do hospedeiro e na manifestação dos sintomas (PASCHOLATI et al., 2008). Estas fitotoxinas provocam distúrbios no metabolismo celular dos vegetais prejudicando o processo fisiológico, agindo diretamente sobre o protoplasto matando as células vegetais. As fitotoxinas em apresentam diferentes famílias, podem afetar inúmeras espécies e possuem múltiplas formas e potenciais diferenciados. As fitotoxinas são eficientes quanto à toxicidade em baixas concentrações e seu modo de ação afetam a permeabilidade da membrana celular, inativação e/ou inibição a ação enzimática (AGRIOS, 2005).

As fitotoxinas podem afetar várias espécies de vegetais, sendo denominadas de não-específicas ou não-seletivas, independentes das espécies afetadas serem ou não hospedeiras do referido patógeno. Outras chamadas de específicas possuem a exclusividade dos efeitos tóxicos a determinados hospedeiros. Em geral causam manchas, amarelecimentos, necroses e queimas foliares. As específicas estão relacionadas à patogenicidade dos microrganismos, enquanto as não-específicas estão relacionadas a agressividade do patógeno, como é o caso do ácido fusárico produzido por *Fusarium oxysporum* (BLUM et al., 2006).

Espécies de *Fusarium* produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos em cultura (LEMOS, 2003). Na literatura são relatados alguns trabalhos utilizando filtrado de cultura de *Fusarium* em diversos cultivos como bananeira (MATSUMOTO et al., 1999), pimenteira-do-reino (LEMOS, 2003), maracujazeiro (FLORES et al., 2012) entre outros.

Embora *F. solani* não seja considerado um patógeno vascular, este fungo pode invadir o xilema do caule de sistemas vasculares inoculados produzindo substâncias tóxicas a plantas chamadas naftazarinas (fusarubinas), que se deslocam para folhas no fluxo de água podendo

comprometer a fotossíntese, pois causam sintomas característicos como clorose e necrose foliar, murcha de folhas e entupimento de vasos (NEMEC et al., 1995).

Portanto, este estudo teve por finalidade averiguar diferenças entre cultivares de pimenteira-do-reino quanto à alterações morfofisiológicas e bioquímicas sob pressão de seleção *in vitro* por filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, sob os aspectos de crescimento e alocação de biomassa; concentrações de carboidratos, aminoácidos, proteínas e pigmentos cloroplastídicos.

2. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5 ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 922p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4^a ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 704p.:il, 2011.
- BAJAD S, SINGLA A. K.; BEDI K. L. Lipid chromatographic method for determination of piperine in rat plasma: application to pharmacokinetics. **J Chromatogr B**, v. 776, p. 245–249, 2002.
- BENCHIMOL, R. L.; YING CHU, E.; YUITIMOTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino: Sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesq. Agrop. bras.**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, jul. 2000.
- BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. 1 ed. Brasília, 2006, 256p.
- DUARTE M. L. R.; ALBUQUERQUE F. C. **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: 28/12/2013.
- FAO-ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA-FAO. Disponível em:<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 12/01/2014.
- FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to Fusarium vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 108, p. 37–45, 2012.
- HOMMA, A. K. O, FERREIRA, C. A. P. and DUARTE, M. L. R de. Mercado e Comercialização. In: DUARTE, M. L. R de (Ed) **Sistema de Produção de Pimenteira-do-reino**. p. 145-155; 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Agricultura. Produção, área comprimento, área, rendimento, importações e exportações**. Brasil-2002 a 2013. Lavouras permanentes/pimenta-do-reino Disponível em:<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=26&i=P>> Acesso em : 03/10/2015.
- KANNO, M. **Embrapa repassa tecnologia para produtores de pimenta-do-reino do Pará**. Portal Japão, 2005. Disponível em:<<http://www.portaljapao.org.br/modules/news/article>> Acesso em: 15/01/2011.
- LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2003.

MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUZA, L. A. C.; TEIXEIRA, J. B. *In vitro* selection for Fusarium wilt resistance in banana II. Resistance to culture filtrate of race 1 Fosarium oxysporum f. sp. cubense. *Fruits*, v. 54, p. 151–157, 1999.

NEMEC, S. Stress-related compounds in xylem fluid of blight-diseased citrus containing Fusarium solani naphthazarin toxins and their effects on the host. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 6, 1995.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiros. v.13. 627 p. 2008.

SINGH,G.; MARIMUTHU, P.; CATALAN, C.; DELAMPASONA, M. P. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agricultura*, v. 84, p. 1878–1884, 2004.

CAPÍTULO 2

COMPORTAMENTO MORFOLÓGICO DE PLANTAS DE PIMENTA PRETA SUJEITAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FILTRADO DE *Fusarium solani* f. sp *piperis*

RESUMO

A pimenta-do-reino é a mais importante especiaria comercializada mundialmente e de grande importância econômica para o Brasil e para o estado do Pará. No entanto, a produtividade do Estado sofre muitas oscilações provocadas por vários fatores, com destaque para os problemas fitossanitários. O filtrado do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* tem sido usado para avaliar a sensibilidade de plantas *in vitro*. A doença fusariose provoca vários sintomas até a morte da planta. Neste trabalho, objetivou-se determinar a partir das alterações na morfologia e no crescimento, a magnitude destas alterações em plantas da cultivar Guajarina *in vitro* sob o efeito do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em meio de cultura. Para tal, sementes foram germinadas *in vitro* e as plantas obtidas usadas como fontes de explantes para o processo de micropropagação. Os brotos multiplicados após cinco subcultivos foram enraizadas em meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS, 0,2% de vitaminas, 3% de sacarose e 0,2% de phytagel e suplementado com $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de Ácido Naftalenoacético. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e submetido à autoclavagem por 20 min sob pressão de 1,5 atm e 120 °C, mantidos nestas condições por 4 semanas. As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidade de luminosa. Após este período foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS e filtrado fúngico nas doses 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v). As plantas foram mantidas em sala de crescimento por 45 dias, e avaliadas quanto as alterações na morfologia (número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz) e crescimento (massa fresca e seca de raízes e folhas). Foram observadas alterações morfológicas e redução no crescimento da cultivar Guajarina a partir da dose 20% de filtrado fúngico. As alterações provocadas foram no comprimento radicular, número de raízes, número de folhas e área foliar, proporcionalmente reduzidos à medida que aumentou-se a concentração de filtrado fúngico. Assim, o filtrado fúngico em meio de cultura em quaisquer concentração provoca alterações no crescimento *in vitro* de plantas da cultivar Guajarina de pimenteira-do-reino. Redução no crescimento é significativo a partir da dose 30%. O nitrogênio total no caule e folhas das plantas de *P. nigrum* na presença do filtrado fúngico foi reduzido, provavelmente devido a clorose e senescência foliar. O carbono total nas partes das plantas de *P. nigrum* na presença de filtrado fúngico foi aumentado. Dose igual ou superior a 30% foi considerada eficiente para utilização em outro experimento.

Palavras chave: Crescimento. Fitotoxina. Morfologia. *Piper nigrum* L.

CHAPTER 2

MORPHOLOGICAL BEHAVIOR OF BLACK PEPPER PLANTS SUBMITTED TO DIFFERENT CONCENTRATIONS OF *Fusarium solani* f. sp *piperis* FILTRATE

ABSTRACT

Black pepper is the most important spice in nowadays world trade and has a great economical importance for Brazil and for the state of Pará. However. The state productivity has a remarkable oscillation due to many factors, mainly the phytosanitary ones. The filtrate of the fungi *Fusarium solani* f. sp. *piperis* has been used to evaluate the sensibility of plants *in vitro*. The Fusarium disease causes several symptoms, even the plant death. This paper aimed to determine, from the changes in morphophysiology and in growth, the magnitude of such changes in plants of Guajarina cultivar *in vitro* under effect of a filtrate of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* in medium. In order to do this, the seeds were grown *in vitro* and the resulting plants were used as sources of explants for the micropropagation process. The sprouts multiplied after five sub-crops were fixed in a medium with $\frac{1}{2}$ MS, 0.2% of vitamins, 3% of saccharose and 0.2% of phytagel and supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ of Naphthaleneacetic acid. The medium pH was adjusted to 5.8 and submitted to autoclaving for 20 minutes under pressure of 1.5 atm at 120°C, and kept under such condition for four weeks. The plants were kept in growth-room under controlled temperature, photoperiod and luminous intensity conditions. After this period, they were transferred to test tubes containing medium with $\frac{1}{2}$ MS and fungal filtrate in doses 0, 20, 30, 40 and 50% (v/v). The plants were kept in growth-room for 45 days and then had their changes in morphology (number of leaves, number of roots and roots length) and growth (fresh and dry mass of roots and leaves) assessed. Morphological changes on plants from the cultivar Guajarina were noticed from doses with 20% of fungal filtrate. The changes noticed were in the root length, number of roots, number of leaves and leaf area, proportionally reduced as long as the concentration of fungal filtrate increased. Thus, the fungal filtrate in medium at any concentration causes changes on *in vitro* growth of plants from black pepper Guajarina cultivar. Reductions on growth are remarkable from doses with 30%. Total nitrogen in the stalk and leaves of *P. nigrum* was reduced once in the presence of the fungal filtrate, probably due to chlorosis and to leaf senescence. Total carbon in the plants parts with presence of fungal filtrate also increased. Doses equal or above 30% were considered efficient to be used in another experiment.

Keywords: Growth. Phytotoxin. Morphology. *Piper nigrum*

2.1. INTRODUÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), pertencente à família *Piperaceae*, é uma trepadeira perene que cresce aderida a tutores, constituída em sua parte aérea por três tipos de ramos: ortotrópico (ramo de crescimento que se desenvolve junto ao tutor), plagiortrópico (ramo produtivo que se desenvolve lateralmente) e ladrão (que se desenvolve a partir da base da planta ou da extremidade dos ramos ortotrópicos) (DIAS, 2006). Suas folhas são pequenas ou grandes, codiformes ou lanceoladas, dependendo da cultivar. O sistema radicular na sua maioria apresenta raízes adventícias, algumas do tipo pivotante. A inflorescência é composta por flores aperiantadas, podendo ser masculinas, femininas ou bissexuais. Os frutos ocorrem em espigas (amentilhos) agrupados em grãos, do tipo baga (fruto pequeno e globoso com uma só semente), e quando maduros são de coloração amarela a vermelha (DIAS, 2006).

Originária da Índia foi introduzida no Brasil pelo estado da Bahia no século XVII (BARBOSA, 2002), sendo posteriormente introduzida nos estados da Paraíba, Maranhão e Pará, nos quais a produção era insignificante e restrita (ALBUQUERQUE; CONDURÚ, 1971). No Pará, os imigrantes japoneses, no ano de 1933, trouxeram estacas da cultivar Kuching, que no Brasil recebeu a denominação de Cingapura. Estas estacas foram introduzidas no município de Tomé-Açu, onde foi iniciada a produção comercial paraense (ANDO et al., 1997; ALBUQUERQUE, DUARTE, 1991).

A pimenteira-do-reino é a especiaria mais consumida no mundo e também o mais importante produto agrícola de exportação do Pará (MENEZES, 2011). No entanto, apesar da importância econômica da cultura para o Brasil, a produtividade sofre muitas oscilações provocadas por vários fatores, dentre os quais, mais intensamente, problemas fitossanitários (BASTOS et al., 2008).

As doenças, em sua maioria de etiologia fúngica, como a fusariose, a murcha amarela, a queima do fio e antracnose estão entre as principais causas da diminuição de produção e produtividade dos pimentais no Pará (TREMACOLDI, 2010). Até o momento não há controle eficiente da fusariose, devido a estreita variabilidade genética entre as cultivares (CARNAÚBA et al., 2007). Os sintomas típicos são apodrecimento das raízes e do colo, que impedem a circulação da seiva. Na parte aérea, as folhas amarelecem e murcham, caindo prematuramente, os internódios amarelecem e caem, levando ao secamento da planta, com o progresso da perda de turgor, culminando com a morte. A infecção normalmente tem início pelas raízes, contudo pode começar também pelos ramos (KIMATI, et al., 2005).

A Embrapa Amazônia Oriental vem realizando estudos de micropropagação, envolvendo cultura de embrião e regeneração *in vitro* de pimenteira-do-reino, desde 1997, e a

partir de 1999 adotando métodos para auxiliar no melhoramento da pimenteira-do-reino, onde se incluem técnicas como a cultura de tecido, a germinação *in vitro*, clonagem e manutenção de plantas *in vitro*, que são utilizadas em alguma etapa do melhoramento genético (BARBOSA, 2002).

Uma das estratégias utilizadas para tentar controlar a fusariose foi a busca por materiais resistentes, mas devido à estreita base genética do material disponível no Brasil e ao fato do patógeno não existir no país de origem da espécie (POLTRONIERI et al., 2000), não foram encontradas plantas de pimenteira-do-reino resistentes à fusariose (SILVA; SOUZA, 2009). Estudos com piperáceas da Amazônia identificaram algumas espécies com resistência à infecção pelo patógeno, entre elas *Piper tuberculatum* Jacq. (ALBUQUERQUE et al., 2001). Contudo, os processos celulares e moleculares envolvidos neste mecanismo de resistência ainda são desconhecidos (SILVA; SOUZA, 2009).

A seleção *in vitro* de plantas utilizando toxinas fúngicas têm sido realizada com êxito para detecção de resistência a várias espécies de *Fusarium* (SVABOVÁ, LEBEDA, 2005). Desta forma, a seleção *in vitro* de cultivares de pimenteira-do-reino utilizando toxinas fúngicas de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* como agente seletivo pode ser uma ferramenta biotecnológica para auxiliar os programas de melhoramento genético.

Neste sentido, plantas de pimenteira-do-reino da cultivar Guajarina foram cultivadas *in vitro* e submetidas à doses distintas de filtrado de cultura obtido a partir de *F. solani* f. sp. *piperis* para averiguar o comportamento de resposta das plantas de *P. nigrum* quando na presença da toxina fúngica. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com intuito de avaliar as diferenças relacionadas a morfologia e ao crescimento das plantas de pimenteira-do-reino quando submetidas ação da toxina fúngica bem como definir uma dose eficiente que poderá ser utilizada nos experimentos subsequentes.

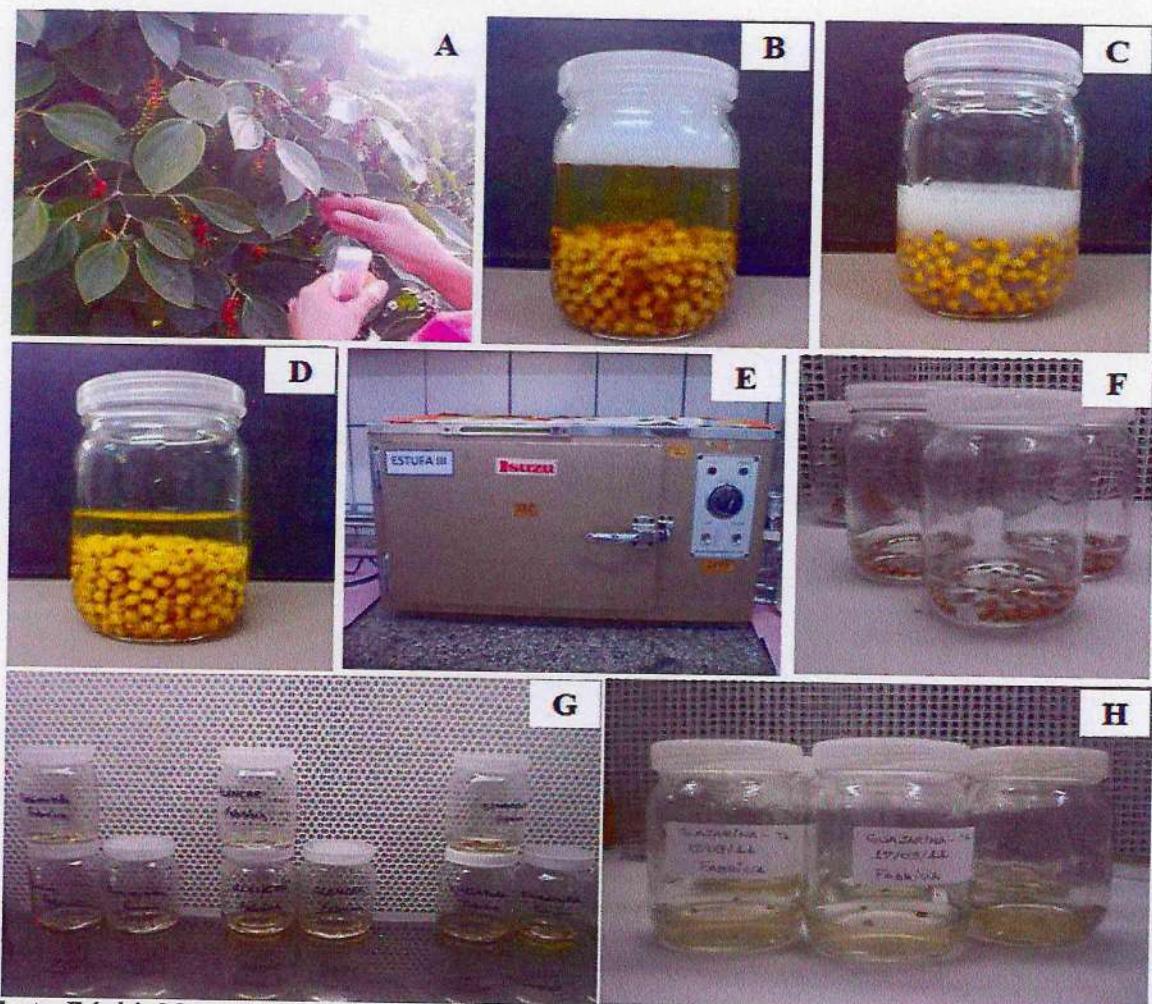
2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos referentes às técnicas de cultura *in vitro* foram instalados no laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará. O cultivo do fungo e a obtenção do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Proteção de Plantas – LPP pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias - ICA, da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém-PA.

2.2.1. Coleta dos frutos, Assepsia das sementes e Germinação *in vitro*

Frutos de pimenteira-do-reino, provenientes da cultivar Guajarina, foram coletadas de matrizes no município de Tomé-Açu, PA, em setembro de 2011 e levadas ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental para serem introduzidas *in vitro*. Inicialmente os frutos no estádio maduro, cuja coloração varia de amarelo à vermelha, foram submetidos à pré-assepsia após despolpamento dos frutos, por meio de lavagem em água corrente com Tween (20%), seguido de imersão em solução de fungicida Carbendazim a 0,2% por 20 minutos e imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por cerca de 12 horas em estufa a 37 °C. Na sequência, as sementes foram retiradas da estufa e sob câmara de fluxo laminar asséptica, submetidas à solução de álcool etílico a 70% (v/v) por 5 minutos e novamente imersas em solução de NaClO por mais 15 minutos, seguido de lavagens por cinco vezes em água destilada autoclavada, para retirar o excesso de solução. As sementes foram transferidas pra frascos esterilizados e em seguida inoculadas em frascos contendo 40 mL de meio de cultura constituído da metade da concentração dos sais de MS ($\frac{1}{2}$ MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% de sacarose, vitaminas, $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (Fosfato de sódio monobásico), 0,2% de phytigel para gelificação do meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 min sob pressão de 1,5 atm e a incubação foi realizada a 25 ± 3 °C, fotoperíodo de 16 h de luz, com intensidade de luz de cerca de 3.000 lux proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w (Figura 1).

Figura 1 - Etapas da coleta e assepsia de sementes de *P. nigrum*. (A) Coleta de frutos maduros de pimenteira-do-reino; (B) Lavagem com Tween; (C) Imersão em solução de fungicida carbendazim; (D) Imersão em hipoclorito de sódio (NaClO); (E) Sementes mantidas em solução de NaClO em estufa a 37°C por cerca de 12 horas; (F) Em câmara de fluxo laminar sementes foram submetidas à álcool 70%; (G) Imersão em NaClO; H: Inoculação das sementes em meio de cultura



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

2.2.2. Propagação *in vitro* e multiplicação dos brotos doadores de explantes de *Piper nigrum*

As plantas resultantes da propagação *in vitro* via semente, que apresentaram melhor formação, foram selecionadas e utilizadas neste ensaio. Quando as plantas germinadas estavam com 120 dias de cultivo, em câmara de fluxo laminar, com auxílio de bisturi e pinça foram obtidos explantes (segmentos nodais e apicais). Os ápices caulinares e segmentos nodais axilares, com aproximadamente 1,5 cm foram inoculados verticalmente em frasco cilíndricos com capacidade de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura. Os explantes foram introduzidos em meio básico de cultura de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

contendo 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas e 0,2% de phytigel e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,2 mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e submetido à autoclavagem por 20 min sob pressão de 1,5 atm e 120 °C (LEMOS, 2003).

Os frascos contendo de seis a oito explantes foram vedados com filme de PVC e mantidos durante oito semanas em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h de luz e intensidade luminosa de 3.000 lux, proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w e temperatura de 25 ± 3 °C.

Foram realizados cinco subcultivos com intuito de obter número de brotos suficientes para a montagem dos experimentos e condução de ensaios posteriores, nas mesmas condições de cultivo supracitadas.

2.2.3. Enraizamento dos brotos

Após o quinto subcultivo de multiplicação, os brotos contendo 1 ou 2 gemas e 1 ou 2 folhas foram introduzidos em frascos contendo 40 mL de meio básico de cultura contendo metade dos sais de MS (½ MS), 0,2% de vitaminas, 3% de sacarose e 0,2% de phytigel e suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de Ácido Naftalenoacético (ANA) para o enraizamento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e submetido à autoclavagem por 20 min sob pressão de 1,5 atm e 120 °C. Os frascos contendo cinco explantes da cultura foram vedados com filme de PVC e mantidos durante quatro semanas em sala de crescimento, em ambiente sob fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 3.000 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w e temperatura de 25 ± 3 °C.

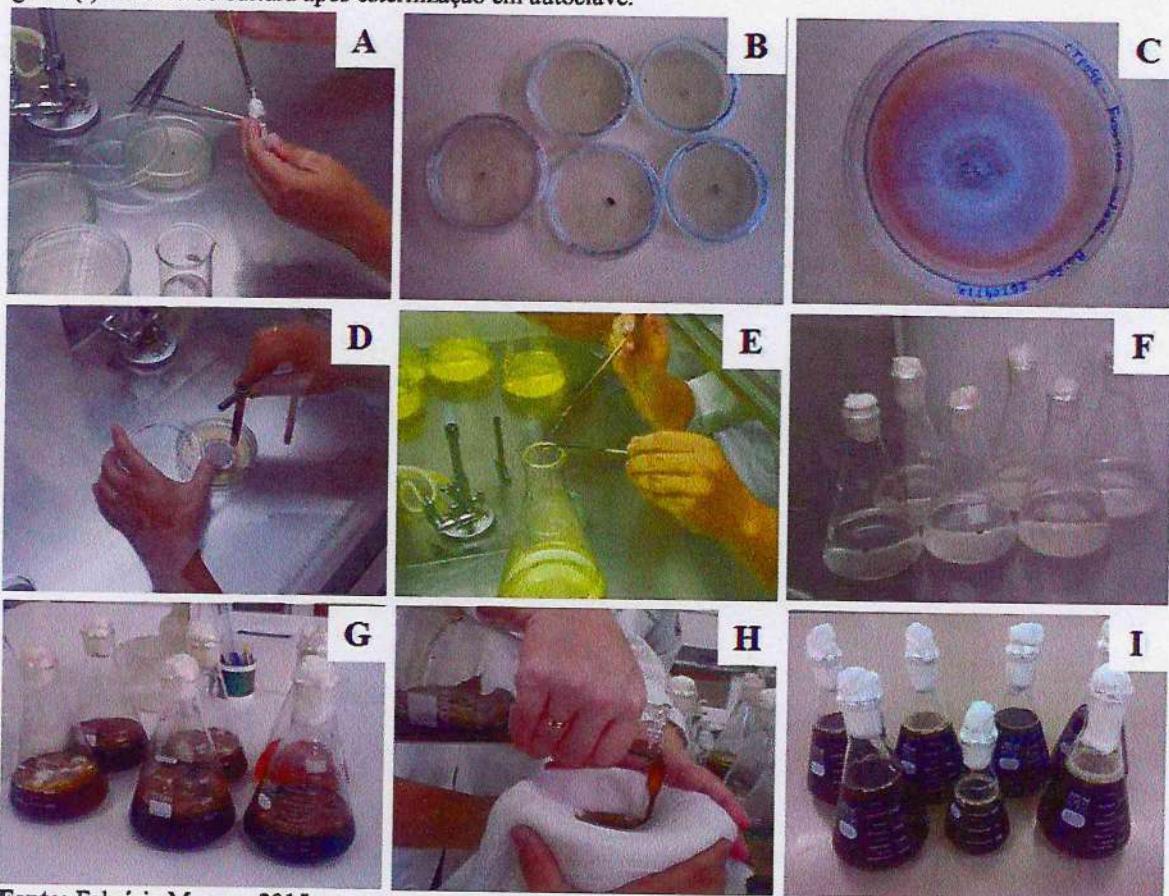
2.2.4. Cultivo e Obtenção do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

O cultivo do isolado de *F. solani* f. sp. *piperis* foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental. Este isolado foi cedido pela Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Bioma Amazônia desta instituição, proveniente de pimenteira-do-reino do município de Baião, Pará, com sintomatologia de fusariose. O fungo coletado foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) por uma semana, a 25 °C ± 2 e fotoperíodo 12 h.

Para obtenção do filtrado, foram transferidos 2 discos de 0,7 cm de meio BDA contendo micélio do fungo para erlenmeyers com capacidade de 1000 mL contendo 400 mL de meio Czapek-Dox. As culturas foram mantidas no escuro por 28 dias a 25 °C ± 2. Após esse período, as culturas foram filtradas em gaze dupla esterilizada, o micélio foi descartado e o

filtrado de cultura obtido foi esterilizado em autoclave por 20 min a 120 °C e 1,5 atm (LEMOS, 2003). Após a esterilização, o filtrado de cultura foi armazenado em temperatura ambiente até o momento da sua utilização (Figura 2).

Figura 2 - Cultivo do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e obtenção do filtrado de cultura fúngica. (A) Retirada do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* da coleção da Embrapa Amazônia Oriental. (B) Isolado inoculado em meio BDA. (C) Colônia após 7 dias. (D) Retirada dos discos com micélio e conídios do fungo. (E) Transferência dos discos de cultura para o meio Czapek-Dox. (F) Erlenmeyers contendo solução de Czapek-Dox e inoculados. (G) Filtrado obtido após 28 dias de crescimento do fungo. (H) Filtragem do meio de cultura em gaze. (I) Filtrado de cultura após esterilização em autoclave.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

2.2.5. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas *in vitro*

Para testar a fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* e definir a concentração única a ser utilizada nos próximo ensaio, baseado nos trabalhos de Lemos et al. (2010), um experimento com o filtrado de 28 dias, esterilizado, foi instalado, usando diferentes concentrações do filtrado (0, 20, 30, 40 e 50% v/v) em meio de cultura básico com a metade da concentração dos sais de MS ($\frac{1}{2}$ MS). Para cada tratamento foram utilizadas 5

repetições, sendo cada repetição representada por uma planta com uma folha definitiva por tubo, com capacidade de 56 mL, contendo 15 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com o filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* (Figura 3).

Os tubos contendo as plantas foram vedados com filme de PVC e mantidos durante 45 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 3.000 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w, a 25 ± 3 °C.

As avaliações foram realizadas no dia 0 e aos 45 dias de cultivo, onde dados morfológicos (número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz) e de crescimento (massa seca e massa fresca de folhas e raízes) foram coletados.

Figura 3 - Experimento com filtrado de diferentes concentrações 0, 20, 30, 40 e 50% (v/v) em meio de cultura básico com a metade da concentração de saí de MS(1/2 MS).



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

2.2.6. Análises morfológicas e de crescimento

Para a determinação das variáveis morfológicas e de crescimento foram utilizados procedimentos descritos por (Flores et al., 2012). As variáveis morfológicas analisadas foram número de folhas, número de raízes e comprimento da maior raiz. A quantificação das folhas foi realizada a partir da contagem direta das folhas e levando-se em consideração apenas aquelas completamente expandidas. Para a quantificação das raízes, levou-se em consideração apenas as emitidas durante o período de avaliação. O comprimento da maior raiz foi medido na região compreendida entre o coleto da planta e o ápice radicular. As medições foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital.

Coletados os dados morfológicos, as plantas foram seccionadas e separadas em raiz e folhas para as respectivas pesagens de massa fresca (MF) e massa seca (MS). Com o software Quant v. 1.0.2 (VALE et al., 2003) as folhas foram digitalizadas para obtenção da área foliar

total. Foi calculada, ainda, a área foliar específica, por meio do quociente entre área foliar total e massa seca da folha. Após a pesagem o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel Kraft e levado para estufa de ventilação forçada a 65 °C, até atingirem massa constante.

2.2.7. Quantificação de Carbono e Nitrogênio orgânico total

Para quantificar o carbono e o nitrogênio orgânico total, amostras de raiz, caule e folha de plantas de pimenteira-do-reino da cultivar Guajarina submetidas à seleção *in vitro* por filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* nas concentração de 0% e 50% v/v foram analisadas em Analisador Elementar LECO- CNS 2000.

2.2.8. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2, com cinco doses de filtrado de cultura (0, 20, 30, 40 e 50%) e duas partes da planta (raiz e folha). Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta por tubo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ($P < 0,05$) foi realizada a análise da regressão com o auxílio do programa estatístico SAS versão 6.12, e quando necessário os dados morfológicos e de crescimento foram transformados para raiz ($x+1$).

3. RESULTADOS

3.1. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas *in vitro*

Visualmente foi possível notar a redução do sistema radicular e o gradativo amarelecimento das folhas, conforme foi aumentado a concentração do filtrado adicionado ao meio de cultura (Figura 4).

Figura 4 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) de filtrado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre as plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro*.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

3.2. Análises Morfológicas

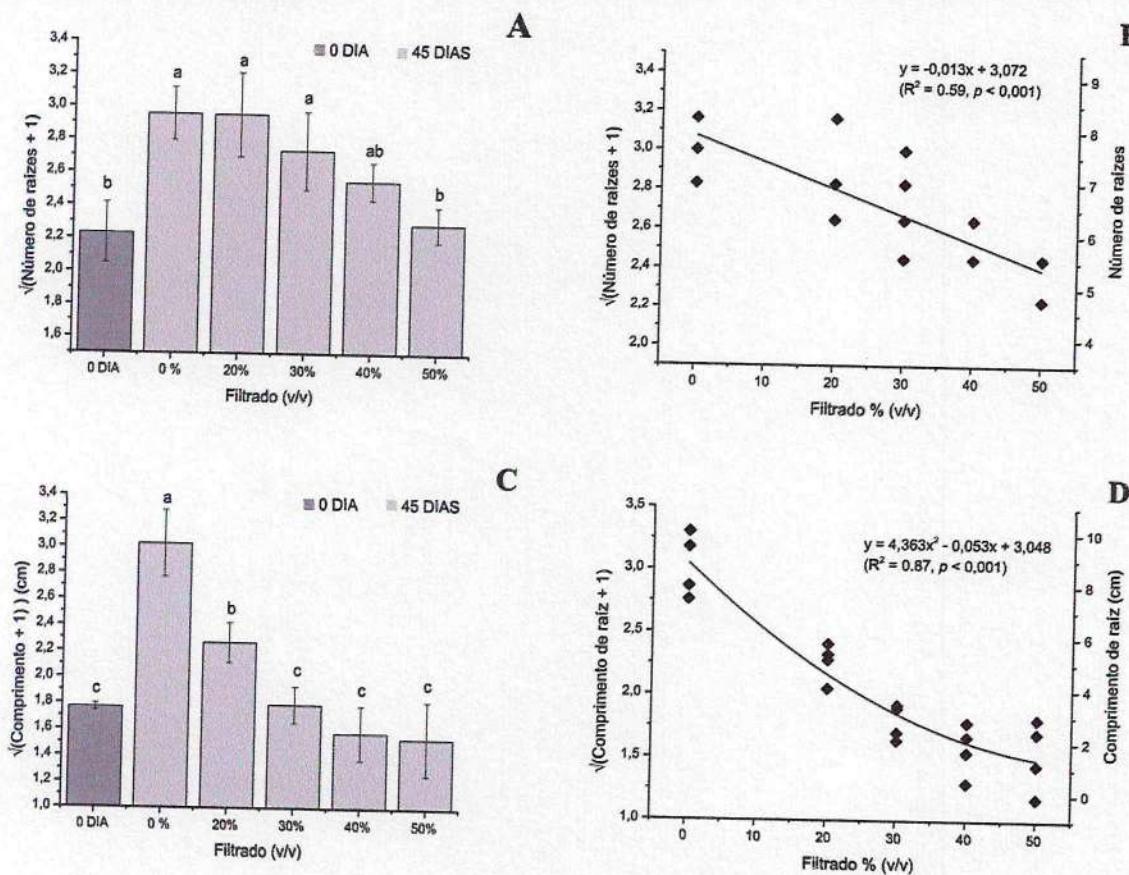
A fitotoxicidade do filtrado fúngico sobre a morfologia e crescimento das raízes da cultivar Guajarina foi avaliada mediante o número, comprimento, massa seca e massa fresca das raízes, após 45 dias em meio de cultivo. A dose 50 % apresentou número de raízes médio (2,29) e comprimento médio de raízes (1,54 cm) significativamente menores que o tratamento sem filtrado (0 %). Do mesmo modo, o acúmulo médio de massa fresca (13,64 mg) e massa seca (5,08 mg) foram significativamente menores para as raízes submetidas a dose 50 %.

O comportamento decrescente dos dados de forma linear ($R^2=0,59$) após 45 dias em meio de cultura permitiu evidenciar que os maiores valores encontrados para o número e comprimento de raízes foram para os meios de cultura sem a adição de filtrado fúngico (0 %). Contudo, os valores diminuíram a medida que a concentração de filtrado no meio aumentou (Figura 5A e 5B).

A menor média de número de raízes ocorreu na concentração de 50 % (2,29), intermediário a 40% (2,55) e maiores médias a 0, 20 e 30 %, sendo que a maior média foi registrada em 0 % (2,96), seguida das concentrações de 20 (2,95) e 30% (2,73), sendo que não houve diferença estatística entre as concentrações 0, 20 e 30 % (Figura 5B).

Para o comprimento das raízes, foi verificado comportamento decrescente a medida que aumentou a concentração do filtrado fúngico no meio de cultura (Figura 5D). O maior comprimento foi observado na concentração de 0% (3,03 cm), seguido do valor registrado na concentração de 20% (2,27 cm), após os 45 dias de cultivo. Os menores valores de comprimento de raízes foram observados nas concentrações de 50, 40 e 30% (1,54, 1,58 e 1,79 cm), respectivamente cujas médias não diferiram estatisticamente entre si (Figura 5C).

Figura 5 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40, 50%) do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre as plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro* após 45 dias da inoculação. (A e B) Número de raízes. (C e D) Comprimento das raízes. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as médias (Teste de Tukey $p < 0,05$).

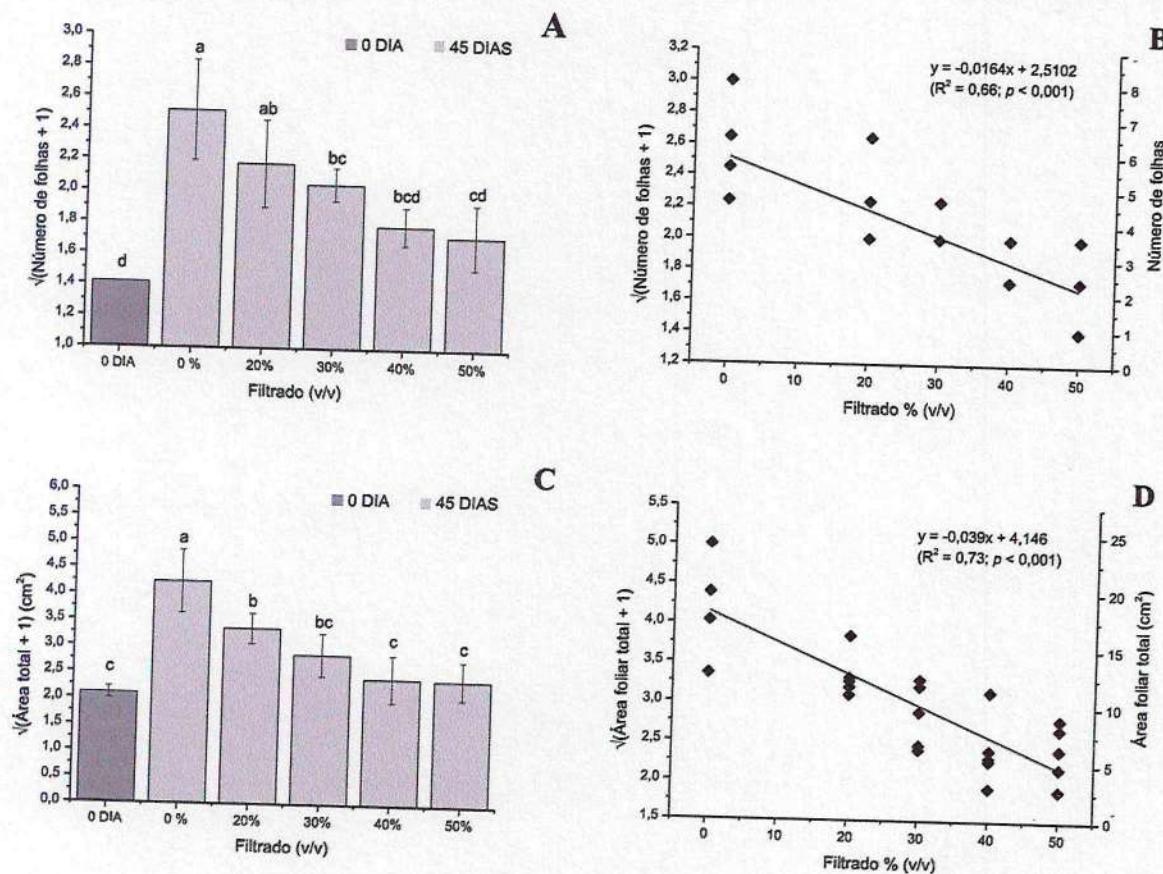


Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Menores números de folhas foi evidenciado nas concentrações de 30, 40 e 50 %, cujas médias não diferiram estatisticamente (Figura 6A). Foi evidenciado um comportamento decrescente para o número de folhas, conforme foi aumentado as concentrações de filtrado fúngico (Figura 6B). Maior média para o surgimento número de folhas foi observada em 0% de filtrado (2,51), porém foi estatisticamente igual a concentração de 20% de filtrado (2,18) (Figura 6B).

Também foi verificado um decréscimo na área foliar com o aumento de volume de filtrado fúngico acrescentado ao meio de cultura. (Figura 6D). O maior valor médio foi observado para 0% do filtrado ($4,24 \text{ cm}^2$) e menores valores foram verificados para as concentrações de 40 e 50% de filtrado ($2,42$ e $2,40 \text{ cm}^2$ respectivamente), cujas médias não diferiram estatisticamente. O tratamento de 30% ($2,86 \text{ cm}^2$) apresentou valor intermediário não diferindo estatisticamente da concentração de 20 ($3,35 \text{ cm}^2$) e das concentrações de 40 e 50% ($2,42$ e $2,40 \text{ cm}^2$ respectivamente) (Figura 6C).

Figura 6 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre as plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro* após 45 dias de inoculação. (A e B) Número de folhas. (C e D) Área foliar total. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as médias (Teste de Tukey $p < 0,05$).

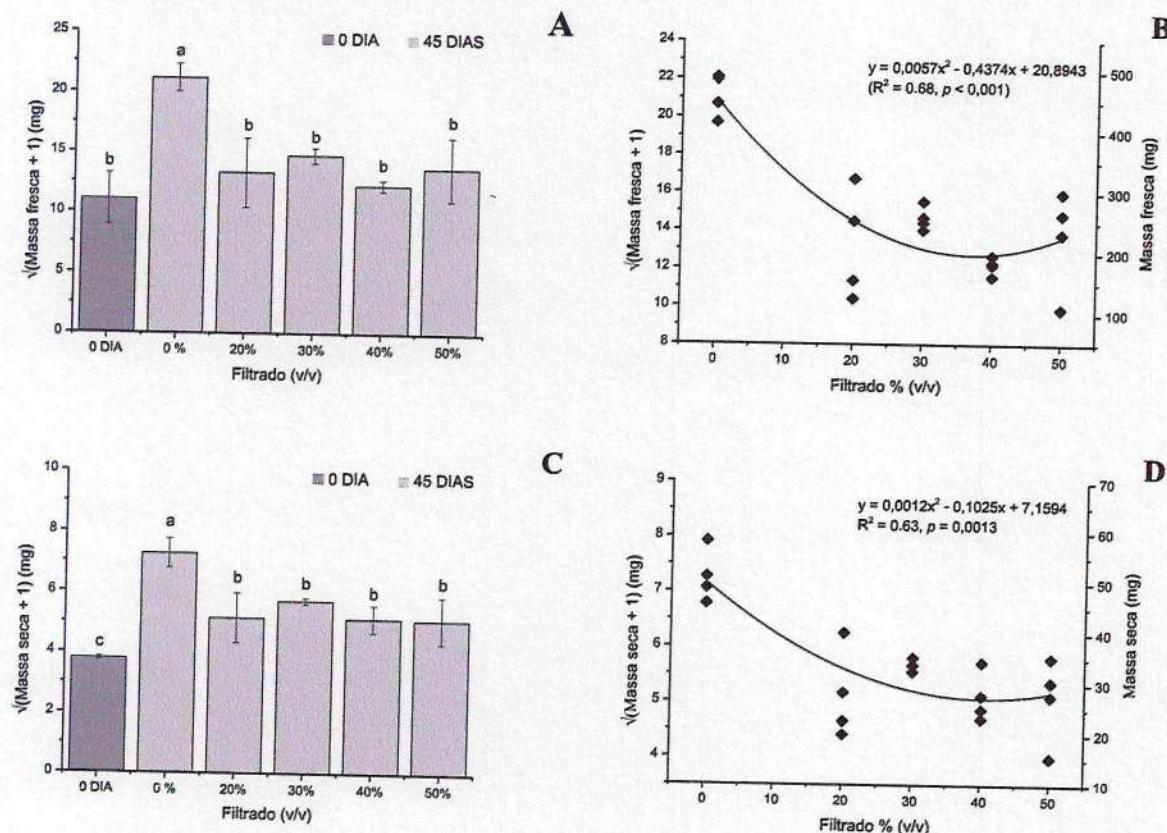


3.3. Análises de Crescimento

Houve acréscimo pouco expressivo na massa fresca das raízes com o aumento da concentração de filtrado fúngico (Figura 7A). Ao compararmos as concentrações de filtrado fúngico verificou-se que menores valores de massa fresca foram observados para as concentrações de 40, 20, 50 e 30% (12,20; 13,24; 13,64 e 14,67 mg respectivamente), porém as médias não diferiram estatisticamente, sendo que o maior valor de massa fresca foi observado na concentração 0% (21,11 mg) (Figura 7C).

Também ao avaliamos a massa seca de raízes das plantas verificou-se que não houve redução na massa seca das plantas com o aumento do volume de filtrado fúngico no meio de cultura (Figura 7B). Valores intermediários foram obtidos para 20, 30, 40 e 50% (5,13; 5,68; 5,11 e 5,08 mg respectivamente), cujas médias não diferiram estatisticamente, sendo o maior valor observado para a concentração de 0% (7,26 mg) que diferiu estatisticamente dos demais (Figura 7D).

Figura 7 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50%) do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre as plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro* após 45 dias de inoculação. (A e B) Massa fresca de raízes. (C e D) Massa seca de raízes. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as médias (Teste de Tukey $p < 0,05$).

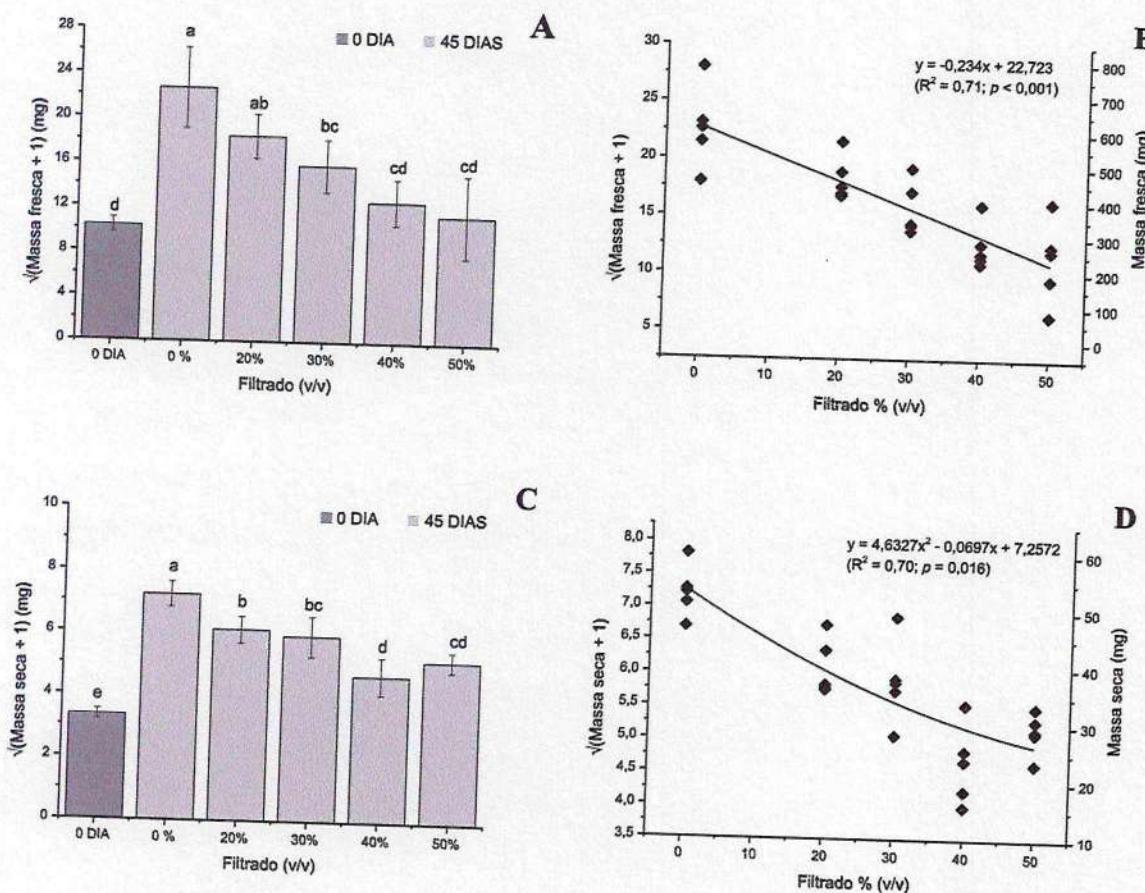


Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Observou-se decréscimo da massa fresca de folhas com o aumento da concentração de filtrado fúngico (Figura 8A). De todas as concentrações de filtrado avaliadas, a concentração de 0% (22,64 mg) apresentou a maior média, mas não diferiu estatisticamente da concentração de 20% (18,36 mg). As concentrações de 30, 40 e 50% apresentaram menores médias, sendo os menores valores observados para as concentrações de 40 e 50% (12,62 e 11,41 mg, respectivamente), cujas médias não diferiram estatisticamente (Figura 8C).

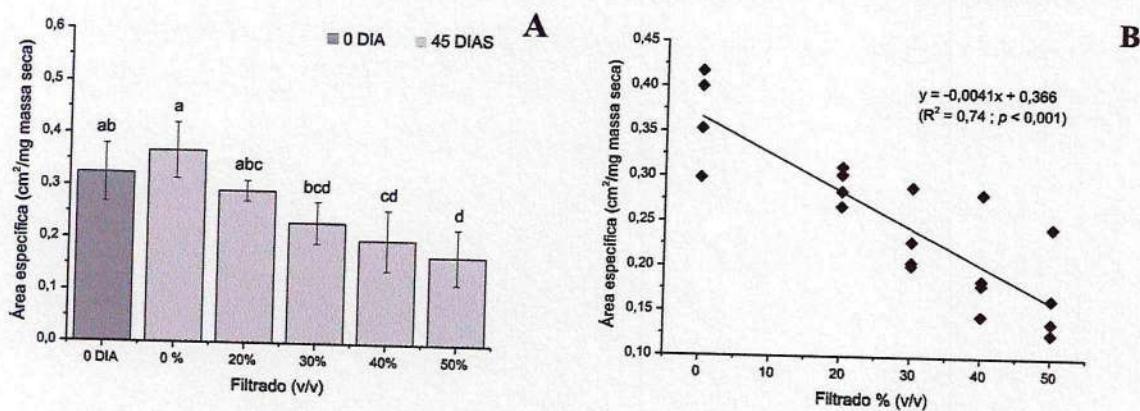
Entre todos os tratamentos avaliados para a massa seca de folhas, a concentração de 40% (4,67 mg) e apresentou o menor valor numérico, mas foi estatisticamente igual a concentração de 50% (5,15 mg) (Figura 8B). A concentração de 0% (7,21 mg) foi a que apresentou maior média de massa seca, seguida da concentração de 20% (6,09 mg). As concentrações 20 e 30% (6,09 e 5,89 mg, respectivamente) (Figura 8B e 8D) foram estatisticamente iguais para a massa seca de folha.

Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50 %) do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre as plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro* após 45 dias de inoculação. (A e B) Massa fresca de folhas. (C e D) Massa seca de folhas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as médias (Teste de Tukey $p < 0,05$).



Ao compararmos os tratamentos de filtrado verificou-se um decréscimo da área foliar específica à medida que foi aumentada a concentração de filtrado fúngico (Figura 9A). Entre todas as concentrações analisadas foi observado menor valor médio de área foliar específica para a concentração de 50% ($0,169\text{cm}^2/\text{mg}$) e maior média para a concentração 0% ($0,324\text{cm}^2/\text{mg}$). Valores intermediários foram observados em 20, 30 e 40% ($0,291$; $0,232$ e $0,199\text{cm}^2/\text{mg}$, respectivamente) cujas médias não diferiram estatisticamente entre si (Figura 9B).

Figura 9 - Efeito das diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50 %) do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre a área foliar específica de plantas de *P. nigrum* da cultivar Guajarina cultivadas *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as médias (Teste de Tukey $p<0,05$).



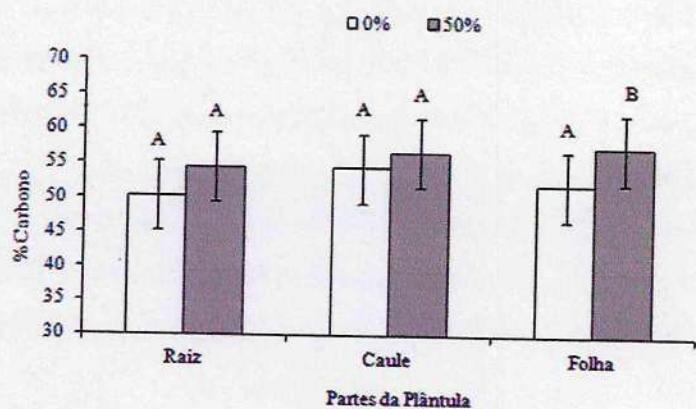
Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

3.4. Quantificação de Carbono e Nitrogênio orgânico total

Foi realizada quantificação de carbono e nitrogênio total para as partes das plantas após 45 dias da imposição dos tratamentos somente para as doses 0 e 50% de filtrado fúngico. Verificou-se que o percentual médio de carbono total das partes componentes das plantas provenientes do cultivo em meio de cultura com a adição de 50% do filtrado fúngico foi maior para todas as partes analisadas (Figura 10). As plantas mantidas na presença de filtrado fúngico incorporaram carbono total em maior quantidade que as plantas sem a presença de filtrado fúngico, comportamento este verificado tanto nas raízes, caule e folhas (Figura 10).

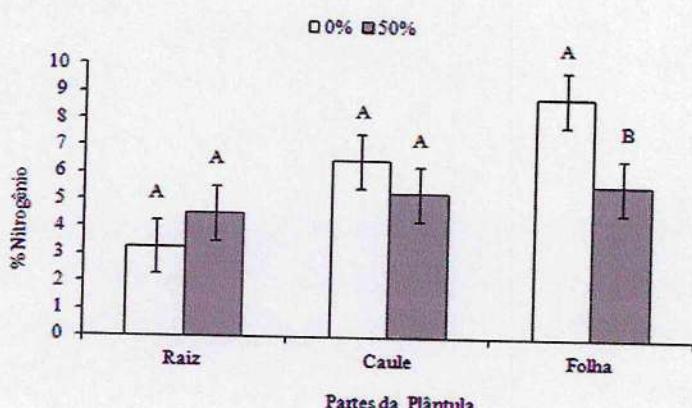
Para o nitrogênio total foi verificado que as plantas submetidas a dose 50% de filtrado fúngico apresentaram o percentual médio menor para o caule e folhas (Figura 10). Já para as raízes das plantas em contato com o filtrado de cultura fúngica, foi observado um comportamento oposto, onde os valores médios de nitrogênio total foi aumentado na presença deste agente seletivo (Figura 11).

Figura 10 - Acúmulo de carbono total (CT) nas partes das plantas de *P. nigrum* cultivadas *in vitro* após 45 dias da imposição dos tratamentos. Os dados de % de CT são representativos de cinco repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre médias pelo teste de Tukey a probabilidade de 5%.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Figura 11 - Acúmulo de nitrogênio total (NT) nas partes das plantas de *P. nigrum* cultivadas *in vitro* após 45 dias da imposição dos tratamentos. Os dados de % de NT são representativos de cinco repetições. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre médias pelo teste de Tukey a probabilidade de 5%.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4. DISCUSSÃO

O cultivo *in vitro* e seleção de células e tecidos de plantas têm sido usados efetivamente como instrumento para o desenvolvimento de novos genótipos de resistência a doenças, bem como, em estudos das interações entre plantas e patógenos (TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010). Assim, o uso de toxinas fúngicas tem sido utilizado com sucesso como ferramenta biotecnológica, na seleção *in vitro* de várias espécies vegetais, visando a resistência de plantas à espécies de *Fusarium*, tornando-o assim uma alternativa para auxiliar programas de melhoramento genético (SVABOVÁ; LEBEDA, 2005).

Neste trabalho, pôde-se observar que houve um efeito fitotóxico da cultura fúngica de forma significativa com o aumento do volume de filtrado adicionado ao meio de cultura. Após 45 dias da inoculação das plantas em meio de cultura contendo filtrado fúngico, foi observado a diminuição no desenvolvimento do sistema radicular e amarelecimento gradativo nas folhas de pimenteira-do-reino (Figura 5).

Resultados semelhantes foram obtidos por Flores et al. (2012) utilizando diferentes concentrações de dois filtrados de cultura de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em plantas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Os pesquisadores descreveram que sintomas de amarelecimento das folhas e redução do desenvolvimento radicular foram observados, conforme o volume de filtrado fúngico adicionado ao meio de cultura foi aumentado.

Durante o cultivo *in vitro* o processo de infecção, modificações fisiológicas e bioquímicas ocorrem, algumas de forma permanente. Em seguida surgem mudanças morfológicas visíveis (sintomas). As alterações fisiológicas provocadas por fitopatógenos podem acarretar alterações na permeabilidade da membrana plasmática, nas relações hídricas, no equilíbrio hormonal e no metabolismo de carboidratos. Concomitantemente, compostos ligados ao mecanismo de defesa da planta são produzidos (PASCHOLATI et al., 2008).

Como esperado, foi observado a redução ou inibição na produção de raízes, quando as concentrações de filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis* foram aumentadas, indicando que houve efeito das fitotoxinas sobre o número de raízes (Figura 5A e 5B). Comportamento semelhante foi observado para o comprimento de raízes, pois ao aumentarmos as concentrações de filtrado fúngico, o comprimento das raízes foi diminuído (Figura 5C e 5D).

Em milho, cultivado *in vitro*, o crescimento de raízes foi inibido com a utilização de ácido fusárico, fitotoxina produzida por patógenos do gênero *Fusarium*, em decorrência à diminuição da atividade respiratória da mitocôndria imprescindível para o fornecimento de

ATP das raízes, ocorrendo assim, a diminuição do crescimento dessas raízes (TELLES-PUPULLIN et al., 1996)

No trabalho atual, a diminuição da massa fresca de raízes foi influenciada pelo aumento da concentração de filtrado fúngico ao meio de cultura, já que poucas plantas emitiram raízes após 45 dias de experimento, o que resultou em uma parte considerável das plantas tiveram ganho de massa fresca igual à zero (Figura 7A e 7B). Provavelmente, as plantas que não formaram raízes também não conseguiram absorver nutrientes do substrato, utilizando-se de reservas celulares para realizarem as reações metabólicas necessárias.

Neste experimento, a massa seca de raiz sofreu redução quando as plantas de *P. nigrum* L. foram colocadas em meio de cultura contendo filtrado fúngico (Figura 7C e 7D). Esse declínio pode ser justificado em parte pela diminuição do número e comprimento das raízes, haja vista que, houve diminuição no número e no crescimento das raízes submetidas às concentrações de filtrado de cultura.

Estes resultados estão de acordo com os observados por Haikal (2008), que embora tenha trabalhado com filtrados fúngicos esterilizados e não esterilizados de *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorium*, *Penicillium* sp. e *Rhizoctonia solani* na germinação de soja, demonstrou que os parâmetros, comprimento da planta, comprimento de raiz, massa seca da parte aérea e massa seca de raiz foram reduzidos quando comparados com o controle (sem filtrado), e que esta redução aumenta conforme aumenta a idade da cultura, constatando ainda que os filtrados fúngicos não perderam sua toxicidade após sua esterilização. Porém, esses efeitos podem ser resultado de uma complexa interação com outras toxinas.

O aumento das concentrações de filtrado fúngico afetou o crescimento da parte aérea das plantas de *P. nigrum* L., promovendo alterações na massa fresca, massa seca (Figura 8) e expansão da área foliar (Figura 6).

O decréscimo na área foliar total observada nas plantas de *P. nigrum* pode ser justificado em parte pela clorose e senescência das folhas, uma vez que a capacidade fotossintética da planta é afetada, devido a destruição do tecido verde, ou seja, pela destruição de moléculas de clorofila (sintomas de clorose) (Figura 6C e 6D).

Os resultados sugerem também que a área foliar específica (AFE) sofreu decréscimo devido a diminuição do número de folhas e da área foliar, que também sofreram decréscimo com o aumento do volume de filtrado fúngico acrescentado ao meio de cultura (Figura 9).

Agrios (2005) afirmou que patógenos que causam redução ou destruição de parte da área foliar das plantas, resultam em plantas com fotossíntese significativamente reduzida, refletindo em um menor crescimento das plantas. De forma análoga, patógenos que causam

destruição de parte do sistema radicular ou entupimento dos vasos do xilema ou elementos do floema, interferem drasticamente na translocação de água e nutrientes orgânicos e inorgânicos nas plantas, reduzindo o tamanho e o rendimento destas, podendo em alguns casos leva-las à morte.

Em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) o efeito do filtrado de cultura de *F. oxysporum* *in vitro*, resultou no aumento de senescência foliar quando comparadas com o tratamento testemunha, sem filtrado (FLORES et al., 2012).

Frequentemente a infecção de plantas por patógenos, conduz ao desenvolvimento de cloroses nas folhas, justamente pela degradação das clorofitas, redução na síntese de clorofila ou combinação de ambos os processos (PASCHOLATI et al., 2008). Isto se deve ao fato de que, as toxinas produzidas por fungos e bactérias, inibem algumas enzimas que estão envolvidas direta ou indiretamente na fotossíntese (AGRIOS, 2005).

Alteração no metabolismo dos carboidratos pode ser provocada pela ação de fitotoxinas produzidas por patógenos. Nesse trabalho, a presença do filtrado fúngico no meio de cultura incorpora carbono total em maior quantidade em todas as partes da planta promovendo seu crescimento (Figura 10).

A translocação é responsável pela distribuição equilibrada de substâncias aos diferentes níveis de organização vegetal. O equilíbrio entre a área de produção e consumo de carboidratos poder ser afetada pela ação de um patógeno. No geral, observa-se um aumento do afluxo de grandes concentrações de materiais (especialmente carboidratos) para áreas infectadas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

O destino do carbono nos tecidos fotossintéticos depende, portanto, do estágio de desenvolvimento foliar. Folhas imaturas retêm grande parte dos fotoassimilados para síntese de seus constituintes celulares (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, celulose, aminoácidos etc.), podendo inclusive importar fotoassimilados de outras partes da planta (Figura 9). Em folhas maduras (fonte), ao contrário, grande parte dos fotoassimilados é exportada através do floema para outras regiões da planta (KERBAUY, 2008).

O filtrado fúngico contém metabólitos que agem como fitotoxinas que tem papel crucial no desenvolvimento de doenças com interferência no acúmulo de nitrogênio na planta (AGRIOS, 2005). Então, há destruição do tecido verde das plantas cultivadas *in vitro* sob a ação de 50% do filtrado fúngico, o que reflete na diminuição do acúmulo de nitrogênio total nas folhas de *P. nigrum* (Figura 11).

As toxinas podem induzir nas plantas muitos dos sintomas comumente observados nas doenças, quando na presença de patógenos como clorose, necrose, murcha, encharcamento e alterações no crescimento (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Os fungos *Fusarium solani* são produtores de toxinas do tipo naftazarinas que podem ser translocadas na planta causando necrose foliar (PASCHOLATI et al., 2008). Em *Citrus* foi verificado que as folhas tratadas com solução contendo dihidrofusarubina (naftazarina), apresentavam sintomas de clorose similar as plantas doentes em campo (ACHOR et al., 1993). Estes autores concluíram que a clorose era causada devido à disfunção nos cloroplastos, levando a degradação e/ou redução da síntese de clorofilas, causada pela fitotoxina, acarretando diminuição do nitrogênio total, como observado nas plantas de *P. nigrum* deste experimento.

5. CONCLUSÕES

O filtrado fúngico em meio de cultura em qualquer concentração provoca alterações no crescimento *in vitro* de plantas da cultivar Guajarina de pimenteira-do-reino;

À medida que a concentração aumenta no meio de cultura há redução no número e comprimento de raízes, e número de folhas e área foliar;

As alterações no crescimento são significativas a partir da concentração de 30% de filtrado fúngico, sendo sugerida para avaliar a sensibilidade de plantas de pimenteira-do-reino às toxinas do *Fusarium solani f. sp. piperis*. O uso de filtrado do fungo *F. solani f. sp. piperis* é uma alternativa como agente seletivo *in vitro* para "screening" de genótipos de plantas de pimenteira-do-reino sensíveis ao fungo a partir das alterações no crescimento e morfologia.

A dose igual ou superior a 30% é indicada para avaliar a sensibilidade de plantas *in vitro* de pimenteira-do-reino a partir das alterações na morfologia e crescimento das plantas que provocam.

O percentual médio de nitrogênio total no caule e folhas das plantas de *P. nigrum* na presença do filtrado fúngico é reduzido, provavelmente devido a clorose e senescência foliar.

Há aumento na concentração de carbono total nas partes das plantas de *P. nigrum* na presença de filtrado fúngico.

6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 5 ed. Elsevier Academic Press, 2005. 948p.
- ALBUQUERQUE, F. C. de.; CONDURÚ, J. M. P. **Cultura da pimenta do reino na região Amazônica.** Belém: IPEAN, 149p. 1971.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R. **Comportamento de cultivares, de pimenta-do-reino, em área de ocorrência de fusariose no Estado do Pará.** Belém, PA. Embrapa-CPATU, 40p. 1991.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de Piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica**, v. 31, p. 341-348, 2001.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia.** 4^a ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 704p.: il, 2011.
- ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F. C. de.; POLTRONIERI, M. C.; TULMANN-NETO, A. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) através da irradiação gama. In: **Seminário internacional sobre pimenta-do-reino e cupuaçu**, 1., Belém, 1996. Anais. Belém, Embrapa Amazônia Oriental, JICA, p. 237-243, 1997.
- BARBOSA, F. B. C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 429-449, set./dez. 2002.
- BASTOS, T. X.; PACHÉCO, N. A.; MONTEIRO, D. C. A. **Zoneamento agroclimático para a pimenteira-do-reino no Estado do Pará.** Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 23p. 2008.
- CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P. R.; SILVA, I. O. Ocorrência de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em *Piper nigrum* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 96-97, 2007.
- DIAS, A. G. **O cultivo da Pimenteira-do-reino.** Vitória-ES, S. V. L. 2006. 300p.: il.
- FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to Fusarium vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 108, p. 37-45, 2012.
- HAIKAL, N. Z. Effects of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. **Journal of Applied science Research**, v. 4, n. 1, p. 48-52, 2008.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas.** 4. ed. v. 2 Piracicaba, 2005. 663p.

LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).** 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.

MENEZES, I. C. **Caracterização genética de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) utilizando marcadores moleculares.** 2011. 144 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) -Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiros. v.13. 627 p. 2008.

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

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

SVABOVÁ, L.; LEBEDA, A. *In Vitro* Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. **J. Phytopathology**, v. 153, p. 52–64, 2005.

TELLES-PUPULIN, A. R.; DINIZ, S. P. S. S.; BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. Effects of fusárico acid on respiration in maize root mitochondria. **Biologia Plantarum**, v. 38, n. 3, p.421-429, 1996.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle.** Belém, PA - Embrapa Amazônia Oriental, 21 ed., 23 pag. Agosto, 2010.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 576p.: il.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. **QUANT.A software plant disease severity assessment.** 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, 2003.p.105.

CAPÍTULO 3

VARIACÕES MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E DE CRESCIMENTO EM QUATRO CULTIVARES DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.) SUBMETIDAS AO CULTIVO *IN VITRO* EM FILTRADO DE CULTURA DE *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb.

RESUMO

É grande a expressão econômica e social da cultura da pimenteira-do-reino para o Brasil e particularmente para o Estado do Pará. Os problemas fitossanitários estão entre os fatores que afetam a produtividade do Estado. Destaca-se a doença fusariose, que provoca a morte da planta. O filtrado do agente causal dessa doença, o fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, tem sido usado para avaliar a suscetibilidade de plantas *in vitro*. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a sensibilidade de quatro cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) ao filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* cultivadas *in vitro* por meio da magnitude das alterações morfofisiológicas relacionadas ao desenvolvimento das plantas visando testar a hipótese de que há comportamento diferente dentre os materiais genéticos quanto às respostas às toxinas presentes no filtrado fúngico sob os parâmetros morfofisiológicos e de crescimento. Para tal, sementes foram germinadas *in vitro* em meio de cultivo MS (½ MS), com 3% de sacarose, vitaminas, 0,17 g.L⁻¹ NaH₂PO₄ (Fosfato de sódio monobásico), 0,2% de phytigel, pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos e condições de cultivo, temperatura 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 h de luz. As plantas foram usadas como fontes de explantes (ápices caulinares e segmentos nodais) para o processo de micropropagação. Durante os cinco subcultivos os brotos foram multiplicados em meio básico de cultura de MS contendo 3% de sacarose, vitaminas e 0,2% de phytigel, suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,2 mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA) e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos. Os brotos multiplicados após cinco subcultivos foram enraizadas em meio de cultivo MS (½ MS), vitaminas, 3% de sacarose e 0,2% de phytigel, suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de Ácido Naftalenoacético (ANA) por 4 semanas, e transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultivo ½ MS e filtrado fúngico nas doses 0 e 35% (v/v). As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob condições controladas, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 3000 lux e temperatura de 25 ± 3°C, que foram avaliadas quanto as alterações na morfologia e crescimento. Ocorreram alterações morfológicas e redução no crescimento das cultivares quando submetidas à ação do filtrado fúngico, principalmente no sistema radicular. O filtrado fúngico acarretou diminuição na produção de biomassa total e na taxa de crescimento relativo das plantas de *P. nigrum*, com exceção da cultivar Kottanadan, e também redução na concentração de proteínas, além de alterações nos conteúdos de glicose, frutose e amido para as cultivares Guajarina e Kottanadan. Desta forma, as cultivares de *P. nigrum* apresentam respostas morfofisiológicas, bioquímicas e de crescimento distintas quando sob a ação do filtrado fúngico, sendo a cultivar Cingapura a mais suscetível ao filtrado fúngico e a a cultivar Kottanadan menos suscetível.

Palavras-chave: Amido. Frutose. Glicose. Seleção *in vitro*. Fusariose em Pimenteira-do-Reino

CHAPTER 3

MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND GROWTH-RELATED CHANGES IN FOUR CULTIVARS OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) SUBMITTED TO *IN VITRO* GROWTH IN *Fusarium solani* f. sp. *piperis* Alb CULTURE FILTRATE

ABSTRACT

Remarkable is the economical and social expression of the black pepper cultivation in Brazil and particularly in the state of Pará. The phytosanitary problems are among the main jeopardizing factors for the state productivity. The fusarium disease stands out, since it may bring the plant to death. The filtrate of the causative agent of this disease, the fungi *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, has been used to evaluate the susceptibility of *in vitro* plants. This paper aimed to assess the sensibility of four cultivars of *nigrum* (Singapore, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) grown *in vitro* to *F. solani* f. sp. *piperis* culture filtrates by evaluating the magnitude of morphophysiological changes related to the plants development aiming to test the hypothesis that there are different behaviors among the genetic material comprising responses to the toxins from the fungal filtrate over the physiological and growth-related parameters. To do this, seeds were grown *in vitro* in medium with MS (½ MS), with 3% of saccharose, vitamins, 0.17 g.L⁻¹ NaH₂PO₄ (monobasic sodium phosphate), 0.2% of phytagel, pH adjusted to 5.8 before autoclaving at 121°C for 20 minutes and cultivation conditions as 25 ± 3 °C and photoperiod of 16 h of light. The plants were used as sources of explants (stalk apex and nodal segments) for micropropagation. During the five sub-cultivations, the sprouts were multiplied in a basic medium with MS culture containing 3% of saccharose, vitamins and 0.2% of phytagel and supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ of 6-benzilaminopurina and 0.2 mg.L⁻¹ of indoleacetic acid and had the pH adjusted to 5.8 before being autoclaved for 20 minutes. The sprouts multiplied after the five sub-cultivations were fixed in a medium with ½ MS, 0.2% of vitamins, 3% of saccharose and 0.2% of phytagel and supplemented with 0.05 mg.L⁻¹ of Naphthaleneacetic acid for four weeks and then transferred to test tubes containing medium with ½ MS and fungal filtrate in doses of 0 and 35% (v/v). The plants were kept in growth-room under controlled conditions, photoperiod of 16 hours and luminous intensity of 3000 lux and temperature of 25 ± 3°C, and then evaluated in relation to changes in morphology and growth. Morphological changes and growth decreases were noticed on the cultivars once submitted to the action of the fugal filtrate, mainly on their root systems. The fugal filtrate caused decreases on the total biomass production and on the relative growth rate of *P. nigrum* plants, except the cultivar Kottanadan, and also caused decrease on the proteins concentration, besides changes on the glucose, fructose and starch contents of the cultivars Guajarina e Kottanadan. Therefore, the cultivars of *P. nigrum* show different morphophysiological, biochemical and growth-related responses when under action of the fungal filtrate, so that the Singapore cultivar was the most susceptible to the filtrate and the Kottanadan was the least susceptible one.

Keywords: Starch. Fructose. Glucose. Selection *in vitro*. Fusarium in black pepper.

3.1. INTRODUÇÃO

A pimenta preta (*Piper nigrum* L.; Piperaceae) é a mais importante especiaria consumida mundialmente (MENEZES et al., 2009) devido aos seus usos culinários e como conservante alimentar (SILVA et al., 2014). Embora seja originária da Índia (LEMOS, 2010), a espécie se adaptou muito bem às condições edafoclimáticas do norte do Brasil, em especial do Estado do Pará, por ser o maior produtor nacional de frutos de pimenta preta (HOMMA, 2004). No entanto, vários fatores têm contribuído para a baixa produtividade e queda de produção nos pimentais do Pará, principalmente a ocorrência de doenças fúngicas durante o período mais chuvoso do ano como a fusariose, murcha amarela, queima do fio e antracnose (TREMACOLDI, 2010).

Dos vários fungos que acometem a cultura, o *Fusarium solani* (Mart.) f. sp. *piperis* Albuq. é um fitopatógeno de solo que penetra na planta via sistema radicular, causando a podridão das raízes e em alguns casos a podridão do colo da planta. Em fase mais avançada de infecção, o mesmo provoca a obstrução dos vasos condutores e impede a circulação de água e seiva na planta, o que leva ao amarelecimento e murcha das folhas e, em última análise, pode resultar na morte das plantas (DUARTE et al., 2002). Estes sintomas se desenvolvem lentamente, permitindo que a planta coexista por um determinado tempo com o fungo. Nesse caso, a produtividade da cultura é consideravelmente reduzida ao longo dos anos e o ciclo médio produtivo da cultura, que normalmente é superior a 12 anos em plantas saudáveis, é reduzido para 5 a 6 anos nas plantas infectadas (TREMACOLDI, 2010; LEMOS et al., 2011).

A utilização de fungicidas não se mostra como eficiente no controle do fungo (TREMACOLDI, 2011), e em partes devido à facilidade de disseminação do patógeno, quer seja através da utilização de material vegetal contaminado na produção de mudas quer seja pela disseminação de esporos pelo homem, por animais e por ferramentas agrícolas contaminadas usadas no manejo da cultura em campo (LEMOS et al., 2011).

Embora haja pouca variabilidade genética dentre as populações de pimenta preta, é possível identificar indivíduos com maior capacidade de tolerância ao patógeno, de forma que os mesmos possam ser posteriormente utilizados em programas de melhoramento genético da cultura (LEMOS et al., 2011). Para isso, experimentos *in vitro* tem sido realizados no sentido de verificar os efeitos de filtrados fúngicos no crescimento e desenvolvimento de plantas, admitindo-se que nesse filtrado encontram-se os compostos tóxicos produzidos pelo fungo, quando este hospeda as plantas, como em soja (HAIKAL, 2008), banana (MATSUMOTO et al., 2010) e maracujazeiro-amarelo (FLORES et al., 2012), por exemplo.

A cultura de tecidos de plantas tratadas com toxinas de organismos patogênicos tem sido utilizada para estudos de interação planta-patógeno, assim como para melhorar a resistência a doenças de plantas de culturas (JAN et al., 1993). A seleção *in vitro* de plantas utilizando toxinas fúngicas tem sido realizada com êxito para detecção de resistência a várias espécies de *Fusarium* (SVABOVÁ, LEBEDA, 2005). Espécies de *Fusarium* produzem uma variedade de metabólitos biologicamente ativos em cultura (LEMOS et al., 2010). Desta forma, a seleção *in vitro* para cultivares de pimenteira-do-reino utilizando toxinas fúngicas de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, como agente seletivo, pode ser uma ferramenta biotecnológica viável para auxiliar os programas de melhoramento genético da pimenta-do-reino para resistentes/tolerantes a fusariose.

Neste trabalho, plantas de quatro cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) foram cultivadas *in vitro* e com filtrado obtido a partir da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* para testar a hipótese de que esses diferentes materiais genéticos apresentam distintas capacidades de resposta às toxinas presentes no filtrado sob os parâmetros morfológicos, bioquímicos e de crescimento. Portanto, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de avaliar a magnitude das alterações bioquímicas relacionadas ao desenvolvimento das plantas de pimenteira-do-reino submetidas a um meio de cultura contendo filtrado fúngico.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

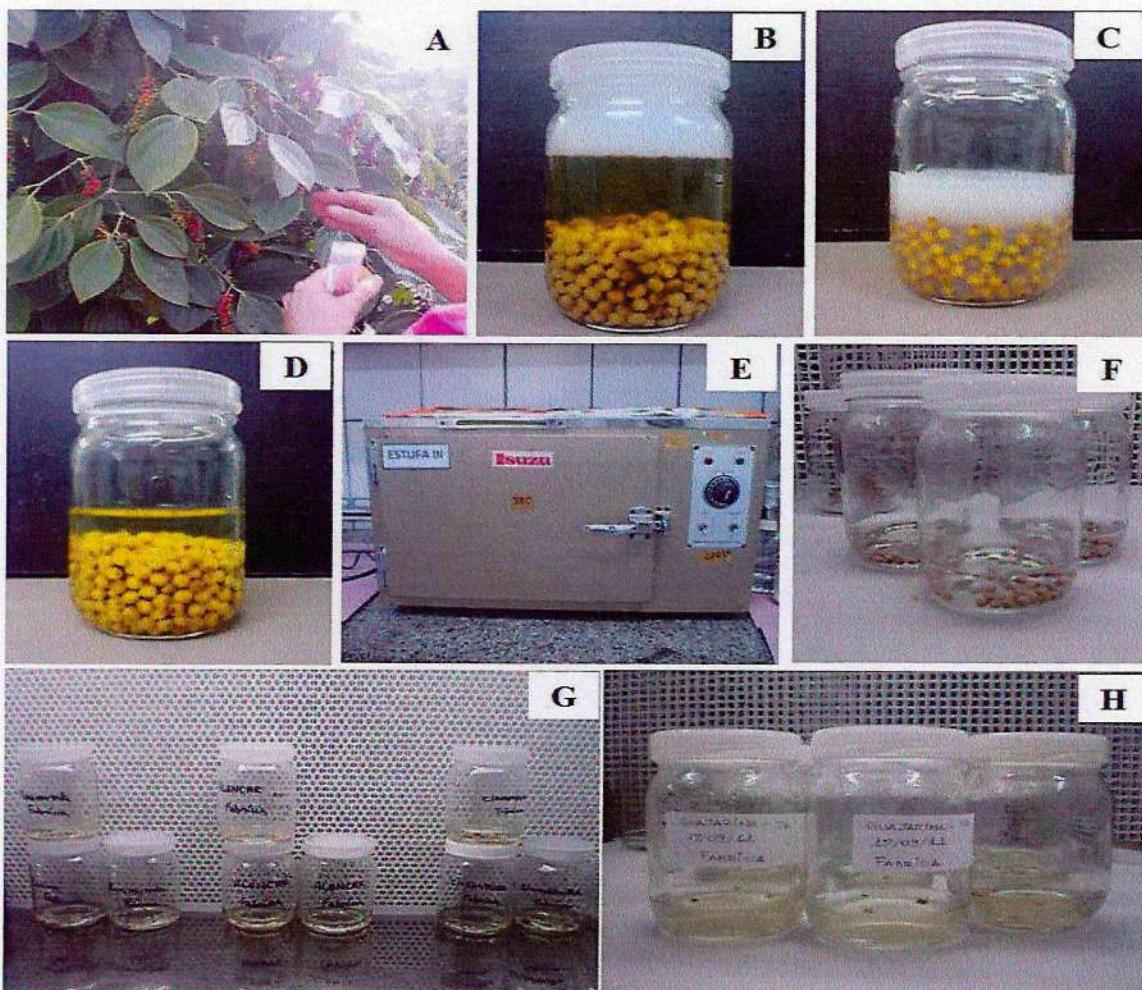
Os experimentos referentes à cultura *in vitro* foram instalados no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará. O material vegetal utilizado foi oriundo de sementes do município de Tomé-açu, as quais foram micropagadas e enraizadas *in vitro*. O cultivo do fungo e preparo do filtrado foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará.

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Proteção de Plantas - LPP, pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias - ICA da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA.

3.2.1. Coleta dos frutos e Assepsia das sementes

Frutos maduros de pimenteira-do-reino das cultivares Cingapura, Balankotta, Guajarina e Kottanadan (*Piper nigrum* L.) foram coletados de matrizes no município de Tomé-Açu, PA e levadas ao Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental para serem introduzidas *in vitro*. Os frutos no estádio maduro de coloração amarela à vermelha foram, submetidos à pré-assepsia, que constou de: despolpamento dos frutos embebidos em água para retirada da mucilagem, lavagem em água corrente com detergente líquido, imersão em solução de fungicida Carbendazim a 0,2%, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% por cerca de 12 horas em estufa a 37°C. Em seguida as sementes foram retiradas da estufa e, sob câmara de fluxo laminar asséptica, submetidas à solução de álcool etílico a 70% (v/v) por 5 minutos e novamente imersas em solução de hipoclorito de sódio por mais 15 minutos, seguido de por cinco lavagens em água destilada autoclavada para retirar o excesso da solução. As sementes foram então transferidas para frascos esterilizados e em seguida inoculadas em frascos contendo meio de cultura constituído da metade da concentração dos sais de MS ($\frac{1}{2}$ MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% de sacarose, vitaminas, $0,17 \text{ g.L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (Fosfato de sódio monobásico) e 0,2% de phytagel para gelificação do meio de cultura e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. A incubação foi realizada nas condições de $25 \pm 3^\circ \text{C}$ de temperatura, sob fotoperíodo de $16 \text{ h.luz.dia}^{-1}$, com intensidade de luz de cerca de 3.000 lux proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w (Figura 12).

Figura 12 - Etapas da coleta e assepsia de sementes de *P. nigurm*. (A) Coleta de frutos maduros de pimenteira-do-reino; (B) Lavagem com Tween; (C) Imersão em solução de fungicida carbendazim; (D) Imersão em hipoclorito de sódio (NaClO); (E) Sementes mantidas em solução de NaClO em estufa a 37°C por cerca de 12 horas; (F) Em câmara de fluxo laminar sementes foram submetidas à álcool 70%; (G) Imersão em NaClO; H: Inoculação das sementes em meio de cultura.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

3.2.2. Obtenção e Multiplicação dos brotos doadores de explantes de *Piper nigrum* L.

O material vegetal foi obtido das plantas oriundas de sementes coletadas no município de Tomé-Açu, PA. A micropropagação *in vitro* dos brotos das cultivares Balankotta, Cingapura, Guajarina e Kottanadan ocorreu com seis semanas no quinto subcultivo.

Em câmara de fluxo laminar, as plantas foram seccionadas para a obtenção de explantes de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, contendo uma gema axilar ou caulinar. Os explantes foram inoculados em frascos cilíndricos com capacidade de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado para o processo de multiplicação foi o MS constituído de 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas, 0,2% de phytigel e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,2 mg. L⁻¹ de AIA (ácido indolacético) (LEMOS, 2003). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e submetido à autoclavagem por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 120°C.

Os frascos contendo de cinco a seis explantes de cada cultivar foram vedados com filme de PVC e mantidos durante oito semanas em sala de crescimento, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 3.000 lux, proporcionada por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w e temperatura de 25 ± 3°C.

3.2.3. Enraizamento e alongamento *in vitro* dos brotos

Os brotos resultantes da multiplicação, constituídos de uma ou duas gemas e uma ou duas folhas, foram inoculados em frascos de vidro de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura com a metade das concentrações dos sais minerais MS (½ MS), 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas, 0,2% de phytigel e suplementado com 0,05 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121 °C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm.

Os frascos vedados contendo três a quatro brotos foram mantidos durante quatro semanas em sala de crescimento, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 2°C.

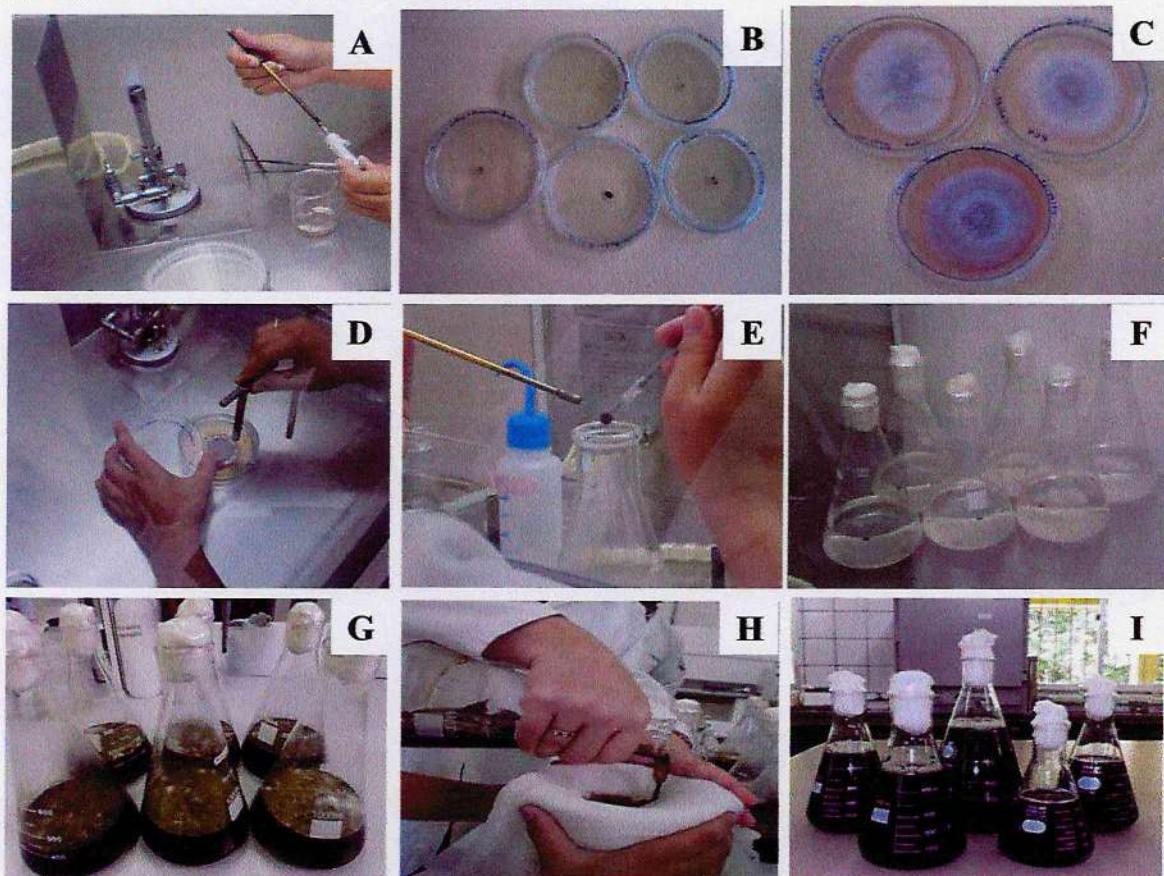
Após o enraizamento *in vitro*, as plantas foram padronizadas com uma ou duas folhas expandidas e quatro ou cinco raízes com o comprimento aproximado de 1 cm. Para induzir o alongamento. Estas plantas foram transferidas para meio de cultura MS, 3% de sacarose, 0,2% de vitaminas, 0,2% de phytigel e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 min a 121°C. As plantas foram mantidas durante uma semana em sala de crescimento nas condições de fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25 ± 2°C.

3.2.4. Cultivo do isolado do fungo e preparo do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

O fungo foi retirado da Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Bioma Amazônia pertencente a Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, Pará; o qual foi coletado de plantas de pimenteira-do-reino proveniente do município de Baião, Pará, com sintomatologia de fusariose, e cultivado em BDA (batata-dextrose-ágar) por sete dias.

Posteriormente, com auxílio de um vazador de 0,7 cm de diâmetro, discos de meio contendo micélios e conídios do fungo foram retirados e transferidos para erlenmeyers com capacidade de 1000 mL, contendo 400 mL de meio de cultura de Czapek-Dox, na proporção de um disco para cada 200 ml de meio. Após 28 dias de crescimento do fungo foi realizada a filtragem com o auxílio de uma dupla gaze esterilizada. O micélio do fungo foi descartado e o filtrado foi autoclavado por 20 min a 121°C e 1,5 atm (LEMOS, 2003). Em seguida o filtrado fúngico foi armazenado em temperatura ambiente até o momento da utilização (Figura 13).

Figura 13 - Cultivo do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e obtenção do filtrado de cultura fúngica. (A) Retirada do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* da coleção da Embrapa Amazônia Oriental. (B) Isolado inoculado em meio BDA. (C) Colônia após 7 dias. (D) Retirada dos discos com micélio e conídios do fungo. (E) Transferência dos discos de cultura para o meio Czapek-Dox. (F) Erlenmeyers contendo solução de Czapek-Dox e inoculados. (G) Filtrado obtido após 28 dias de crescimento do fungo. (H) Filtragem do meio de cultura em gaze. (I) Filtrado de cultura após esterilização em autoclave.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

3.2.5. Fitotoxicidade do filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em gemas de pimenteira-do-reino cultivadas *in vitro*

Para testar a fitotoxicidade do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre a morfofisiologia e bioquímica das plantas, experimento com filtrado de 28 dias, esterilizado,

foi instalado, usando as concentrações 0 e 35 % (v/v) em meio de cultura básico com a metade da concentração dos sais de MS ($\frac{1}{2}$ MS). Para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições, sendo cada repetição representada por uma planta com uma ou duas folhas definitivas e quatro ou cinco raízes por tubo com capacidade de 56 mL, contendo 15 mL de meio $\frac{1}{2}$ MS suplementado com o filtrado da cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*.

Os tubos contendo as plantas foram vedados com filme de PVC e mantidos durante 45 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 3.000 lux, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 w, a 25 ± 3 °C.

As avaliações morfofisiológicas e bioquímicas foram realizadas no dia 0 e aos 45 dias de cultivo, onde dados foram coletados. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

3.2.6. Análises morfológicas das plantas submetidas ao filtrado

Para a determinação das variáveis morfológicas foram utilizados procedimentos descritos por (Flores et al., 2012). As variáveis morfológicas avaliadas foram o número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de gemas (NG), comprimento do caule (CC), número de folhas (NF), área foliar total (AFT) além da massa fresca e massa seca de raízes, caules e folhas. A quantificação das folhas foi realizada a partir da contagem direta das folhas e levando-se em consideração apenas aquelas completamente expandidas. Para a quantificação das raízes, levou-se em consideração apenas as emitidas durante o período de avaliação. O comprimento da maior raiz foi medido na região compreendida entre o coleto da planta e o ápice radicular. As medições foram realizadas com auxílio de um paquímetro digital modelo Kingtools 15BL (0,01 mm de precisão).

3.2.7. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3, com cinco doses de filtrado de cultura (0, 20, 30, 40 e 50%) e duas partes da planta (raiz, caule e folha). Para cada tratamento foram utilizadas dez repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta por tubo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey ($P < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico STATISTICA versão 7, e quando necessário os dados morfológicos e de crescimento foram transformados para raiz ($x+1$).

3.2.8. Análises de crescimento das plantas submetidas ao filtrado

Para a determinação das variáveis de crescimento foram utilizados procedimentos descritos por (Flores et al., 2012). Após a coleta dos dados morfológicos, as plantas foram seccionadas e separadas em raiz, caule e folhas para as respectivas pesagens de massa fresca (MF) e massa seca (MS) de cada secção. Sucessivamente foram realizadas a digitalização e processamento de imagem das folhas, para minimizar eventuais deformações. O processo de digitalização das imagens, consistiu na digitalização das folhas, com scanner modelo Epson, onde as imagens obtidas foram processadas através do software ImageJ 1.48v, salvas no formato TIFF (Tag Image File Format), ambiente usado no processo de binarização e análise das imagens. As folhas foram digitalizadas para obtenção da área foliar total (AFT). Após a pesagem o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel Kraft e levado para estufa de ventilação forçada a 65 °C, até atingirem massa constante.

Foi calculada, ainda, a área foliar específica (AFE), por meio do quociente entre área foliar total (AFT) e massa seca das folhas (MS). Posteriormente, foram determinadas a razão massa foliar (RMF), razão massa raiz (RMR), razão massa caule (RMC), razão de área foliar (RAF), razão raiz/parte aérea, taxa de crescimento relativo (TCR) e a taxa de assimilação líquida (TAL), como base no procedimento descrito por (Cairo; Oliveira; Mesquita, 2008).

A razão de massa foliar (RAF) foi determinada pela fração entre a massa da matéria seca das folhas e a massa seca total acumulada pela planta. A razão de massa caule (RMC) foi calculada por meio da fração entre a massa da matéria seca do caule e a massa seca total acumulada pela planta, bem como a razão de massa raiz (RMR) que foi calculada pela massa da matéria seca da raiz e a massa seca acumulada pela planta.

Para a razão de área foliar (RAF) foi utilizada a fração entre a área foliar total (AFT) das folhas e a massa seca total da planta (MST). Foram determinadas ainda a taxa de crescimento relativo (TCR) que é determinada pela quantidade de material vegetal produzido por determinada quantidade de material existente durante um intervalo de tempo, sendo calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{TCR} = (\ln(\text{MST}_f) - \ln(\text{MST}_i)) / (\text{tf} - \text{ti})$$

A taxa assimilatória líquida (TAL) é representada pelo incremento de matéria seca por cada unidade de área foliar disponível à planta, durante um certo intervalo de tempo, calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{TAL} = (\text{MST}_f - \text{MST}_i) * ((\ln(\text{AFT}_f) - \ln(\text{AFT}_i)) / ((\text{AFT}_f - \text{AFT}_i) * (\text{tf} - \text{ti}))$$

3.2.9. Determinações Bioquímicas de plantas submetidas ao filtrado

Para averiguar se as cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) cultivadas *in vitro* apresentariam diferenças quanto às alterações bioquímicas quando submetidas às toxinas presentes no filtrado fúngico de *F. solani* f. sp. *piperis*, os níveis de glicose, sacarose, frutose, aminoácidos, amido, clorofitas e proteínas, foram determinados em plantas inoculadas no meio contendo o filtrado de cultura fúngica.

3.2.9.1. Pigmentos cloroplastídicos

A coleta das amostras para a análise de pigmentos foi realizada imediatamente após a tomada dos dados morfológicos e pesagem da massa fresca (MF). As folhas foram destacadas e acondicionadas em envelopes de papel alumínio e congeladas para posterior análise. Foram determinadas as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *a + b* e razão clorofila *a* e clorofila *b* segundo a metodologia descrita por Geigenberger et al (1996).

Para a extração dos pigmentos cloroplastídicos, cada amostra de massa fresca foi pesada em micro tubos de 1,5 mL (10 a 20 mg), onde foram maceradas em 250 µL de álcool etílico (EtOH) 98% e homogeneizadas em vórtex. O homogenato foi levado ao banho-maria à 80 °C por 20 minutos, retiradas do aquecimento e colocadas no gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 13.400 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a extração foi repetida por mais duas vezes, sendo que as concentrações de EtOH utilizadas foram 80% e 50%, respectivamente. Os sobrenadantes resultantes foram combinados. Todas essas etapas foram realizadas sob banho de gelo e na completa ausência de luz.

O teor de clorofila foi determinado conforme descrito por Porra (1989). Uma alíquota de 50 µL do extrato etílico de cada amostra foi adicionado em meio de reação que continha 120 µL de EtOH 98% e 10 µL do mix etílico (volume final de 180 µL por poço/amostra). As absorbâncias (*ABS*) das amostras foram registradas em leitor de microplaca (Thermo Scientific Multiskan FC) 645 e 665 nm. Em seguida, foi possível estimar as concentrações de clorofila *a* e *b*, clorofila *a + b* e razão clorofila *a*/clorofila *b* através das formulas 1 e 2, posteriormente normalizado pelo peso fresco de cada amostra.

$$(1) \text{Clorofila } a = 5,48 * \text{Abs } 665 - 2,16 * \text{Abs } 645 (\mu\text{g/ poço})$$

$$(2) \text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs } 645 - 2,74 * \text{Abs } 665 (\mu\text{g/ poço})$$

3.2.9.2. Determinação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose)

Utilizando o sobrenadante do passo anterior foi possível realizar a estimativa do teor de glicose, frutose e sacarose como descrito por Fernie et al. (2001), onde para cada amostra foi preparado meio de reação (mix I) composto por 150 µL da solução tampão 0,1 M [HEPES / KOH 1 M pH 7,0; MgCl₂ 30 mM]; 5µL de ATP 109 mM (adenosina 5-trifosfato); 5µL de ADP 80 mM (adenosina 5-difosfato) e 0,32 U da enzima G6PDH (glicose 6-fosfato desidrogenase SIGMA). Adicionou-se 40 µL do extrato vegetal etílico (anteriormente obtido) e mais 10 µL do mix etílico (diluição da amostra). Em seguida, para a quantificação, as amostra foram submetidas a detecção da absorbância a 340 nm. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (Thermo Scientific Multiskan FC) em intervalos de 1 minuto. Após o estabelecimento da linha de base (densidade ótica-DO) foi adicionado 5 µL da enzima hexoquinase (1,5 U 5 µL⁻¹) e a densidade ótica foi obtida conforme o passo anterior. No término desta reação a glicose foi exaurida e ocorreu a formação de uma nova linha de base. Logo depois, adicionou-se 5 µL da enzima fosfoglicose isomerase (PGI 0,7 U 5 µL⁻¹) e a densidade ótica foi obtida. Ao final da reação ocorreu a exaustão da frutose e houve a formação de uma nova linha de base. Finalmente, foi empregado 10 µL da enzima invertase (5 U 10 µL⁻¹) para quantificar o teor de sacarose durante o intervalo de 60 minutos. Para determinar a concentração dos respectivos açúcares foi utilizada a equação A abaixo. Após calculada a concentração de cada metabólito, os valores foram normalizados por meio do peso fresco de cada amostra.

$$(A) \mu\text{mol de NADPH} = \Delta OD / (2,85 * 6,22)$$

3.2.9.3. Determinação de Amido

O amido foi determinado conforme descrito por Fernie et al. (2001), com o precipitado residual (*pellet* residual) da extração etanólica dos açúcares solúveis. Primeiramente o precipitado (*pellet* residual) foi lavado com EtOH 98%, agitado em vórtex e centrifugado por 5 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento foi repetido por 3 vezes até que o *pellet* residual ficasse completamente livre de pigmento. Em seguida, adicionou-se 400 µL de NaOH (0,1 M). As amostras foram incubadas em banho-maria a 95 °C por 60 minutos e resfriadas em banho de gelo, logo que retiradas da incubação. Centrifugadas à 4 °C por 5 minutos a 13.400 rpm. Foi retirado 50 µL deste sobrenadante para a quantificação do teor de proteínas. Aos 350 µL de sobrenadante restante de cada amostra, adicionou-se 61,25 µL de ácido acético glacial a 1 M para a neutralização do extrato. Imediatamente, após a

adição do ácido, os micro tubos foram agitados em vórtex e, e em seguida centrifugados a 4 °C por 5 minutos a 13.400 rpm.

Para a degradação do amido foi preparado um meio de reação (mix I) contendo 144 µL de enzima amiloglucosidase, 1,5 µL de α -amilase, 7,2 mL de tampão acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$) a 0,5 M e pH 4,9. Em novos micro tubos, foram adicionados 60 µL do mix I e mais 50 µL da amostra neutralizada. Incubados a 56° C durante 60 minutos. Após incubação, os micros tubos foram colocados em banho de gelo. Em seguida, foram centrifugados por 10 segundos a 13.400 rpm.

Para a cinética enzimática foi preparado um meio de reação (mix II) contendo 150 µL da solução tampão 0,1 M [HEPES / KOH 1 M pH 7,0; $MgCl_2$ 30 mM]; 5 µL de ATP 109 mM (adenosina 5-trifosfato); 5 µL de ADP 85 mM (adenosina 5-difosfato) e 0,32 U da enzima G6PDH (glicose 6-fosfato desidrogenase Sigma). Em seguida, a micro placa contendo 160 µL do mix II e 50 µL da amostra por poço foi preparada para leitura à 340 nm. As leituras foram realizadas em Leitor de micro placa (Thermo Scientific Multiskan FC) em intervalos de um minuto. Após a estabilização da linha de base (densidade ótica-DO) foi adicionado 5 µL da enzima hexoquinase (2 U 5 µL⁻¹) e a densidade ótica foi obtida em um intervalo de 90 minutos. Ao término desta reação a glicose proveniente da degradação do amido foi exaurida. O conteúdo de amido foi determinado por meio de uma estimativa indireta do teor de glicose (HENDRIKS et al., 2003), onde a equação *A* foi utilizada. Depois de calculada a concentração do metabólito, os valores obtidos foram normalizados pelo peso fresco de cada amostra.

$$(A) \mu\text{mol de NADPH} = \Delta OD / (2,85 * 6,22)$$

3.2.9.4. Determinação de Aminoácidos Totais

Para a quantificação dos aminoácidos totais utilizou-se o protocolo proposto por Gibon et al (2004), onde para cada amostra foi preparado o meio de reação (mix de reação) contendo 50 µL de tampão citrato de sódio (Na-citrato 1M e pH 5,2), 100 µL de ninidrina a 1% (m/v em etanol 70%), 10 µL do extrato vegetal etílico (obtido na extração dos pigmentos cloroplastídicos) e 50 µL de EtOH 70% (diluição da amostra). Os micro tubos foram incubados a 95 °C por 20 minutos, em seguida retirados e colocados em banho de gelo. Centrifugados a 10 °C por 2 minutos em 13.400 rpm. Foram transferidos 200 µL de cada amostra para cada poço da micro placa e a leitura foi realizada a 570 nm.

Para a determinação dos aminoácidos totais nas amostras, foi utilizada uma curva padrão de leucina com intervalos de concentração: de 0 a 0,25 µM. Com a estimativa da

concentração de aminoácidos obtidos em cada poço, utilizou-se a massa fresca da amostra para a normalização dos valores.

3.2.9.5. Determinação do Teor de Proteínas

Utilizou-se a técnica de Bradford (1976) com algumas modificações. Foi adicionado 400 µL de NaOH 0,1 M aos precipitados resultantes da extração etanólica. Em seguida, foram incubadas a 95 °C por 60 minutos e resfriadas em banho de gelo, logo que retiradas da incubação. Centrifugadas a 4 °C por 5 minutos a 13.400 rpm. Retirou-se 50 µL deste sobrenadante para a quantificação do teor de proteínas.

Para quantificar as proteínas 180 µL do reagente de Bradford (1:10) foi adicionado a cada poço da micro placa juntamente com uma alíquota de 3 µL do sobrenadante de cada amostra, e incubada por 15 minutos protegida da luz. Em seguida, foi realizada a leitura em leitor de micro placa (Thermo Scientific Multiskan FC) a 595 nm.

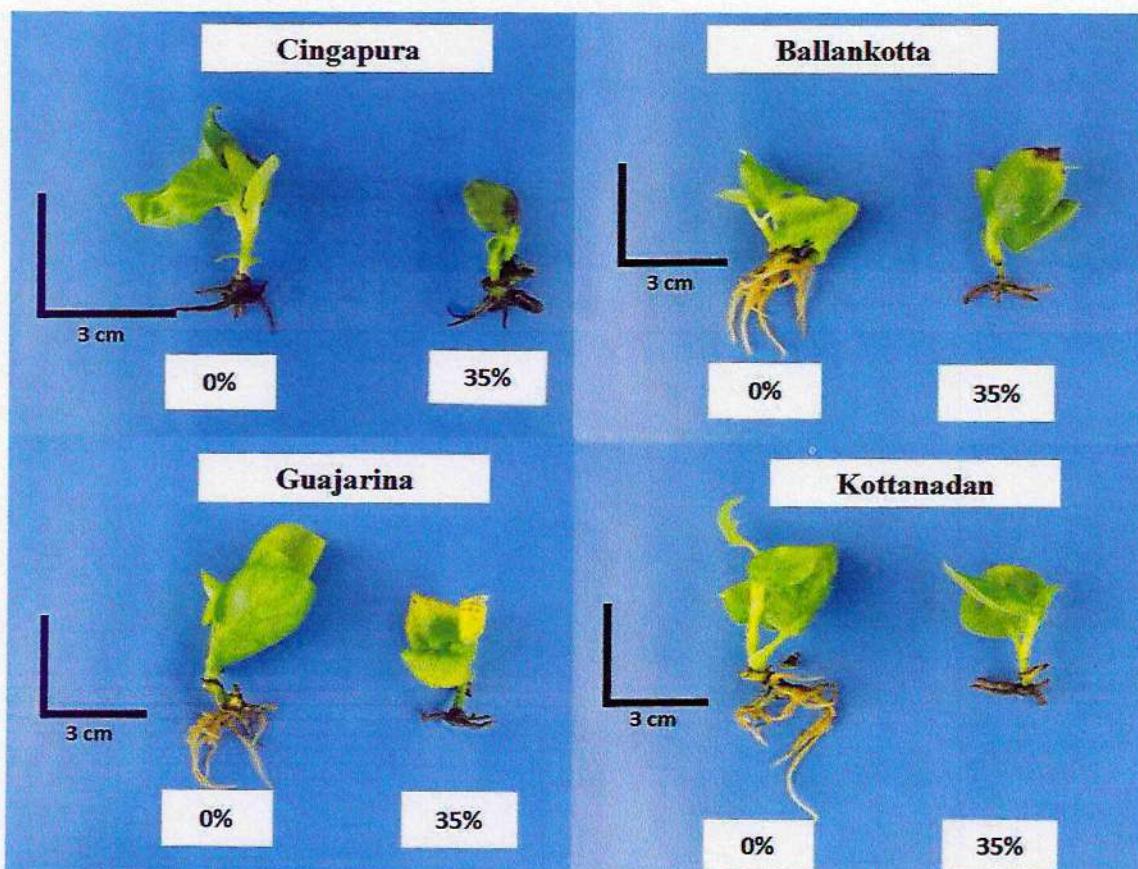
Para determinação do teor de proteínas foi utilizada uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração (NaOH) com intervalo de concentração: de 0 a 0,80 mg mL⁻¹. A normalização dos teores de proteína foi realizada por meio da massa fresca de cada amostra.

4. RESULTADOS

4.1. Análises morfológicas e de crescimento

As plantas das cultivares Cingapura, Balankotta, Guajarina e Kottanadan submetidas ao filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis*, visualmente, apresentaram efeitos fitotóxicos após 45 dias da inoculação. As plantas apresentaram redução do sistema radicular e amarelecimento das folhas quando cultivadas com o filtrado fúngico (Figura 14).

Figura 14 - Efeito das doses 0 e 35% de filtrados de cultura do isolado de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre as diferentes cultivares de *Piper nigrum* *in vitro*.



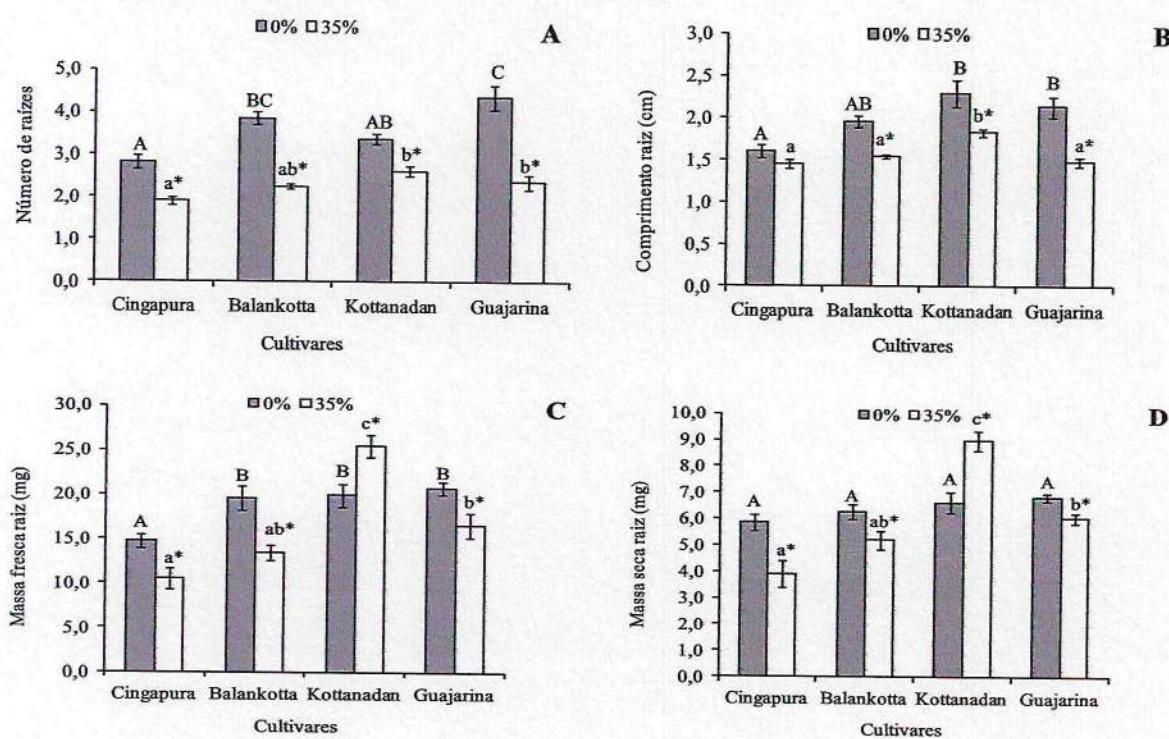
Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

A fitotoxicidade do filtrado da cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* na morfologia e no crescimento do sistema radicular nas plantas de *Piper nigrum* L. foi avaliado por meio do número (NR), comprimento (CMR), massa fresca (MFR) e seca (MSR) das raízes. A dose do filtrado testada (35%) resultou na redução do número de raízes, devido a ação fitotóxica do filtrado de cultura com que as cultivares Cingapura (1,90), Balankotta (2,25), Kottanadan (2,62) e Guajarina (2,36) apresentaram diferença entre os tratamentos mostrou-se significativa para todas cultivares estudadas (Figura 15A).

Observou-se redução para o comprimento de raízes das plantas cultivadas com a dose 35% de solução fúngica, sendo o menor valor encontrado para cultivar Cingapura (1,45 cm), seguida das cultivares Guajarina (1,49 cm) e Ballankotta (1,55 cm); maior valor foi observado para a cultivar Kottanadan (1,83 cm) (Figura 15B). O crescimento em peso de massa fresca e peso de massa seca das raízes tratadas com o filtrado diminuiu significativamente para as cultivares Cingapura, Balankotta e Guajarina, o mesmo não foi observado para cultivar Kottanadan que teve aumento significativo em relação ao tratamento controle (Figura 15C e 15D).

O efeito fitotóxico do filtrado fúngico utilizado para comparar a suscetibilidade do sistema radicular das cultivares de pimenteira-do-reino testadas demonstrou que a cultivar Cingapura apresentou as menores médias e a cultivar Kottanadan as maiores médias para o número de raízes, comprimento de raiz, massa fresca e massa seca das raízes avaliadas. Assim, maior pressão fitotóxica do filtrado fúngico foi verificada no sistema radicular da cultivar Cingapura (Figura 15).

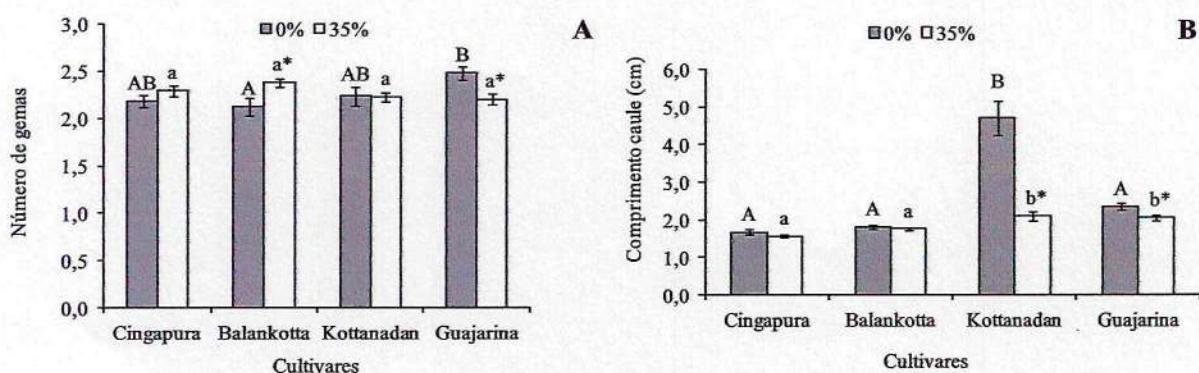
Figura 15 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* sobre o número de raízes, comprimento de raízes, massa fresca e massa seca de raízes de plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.) *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.

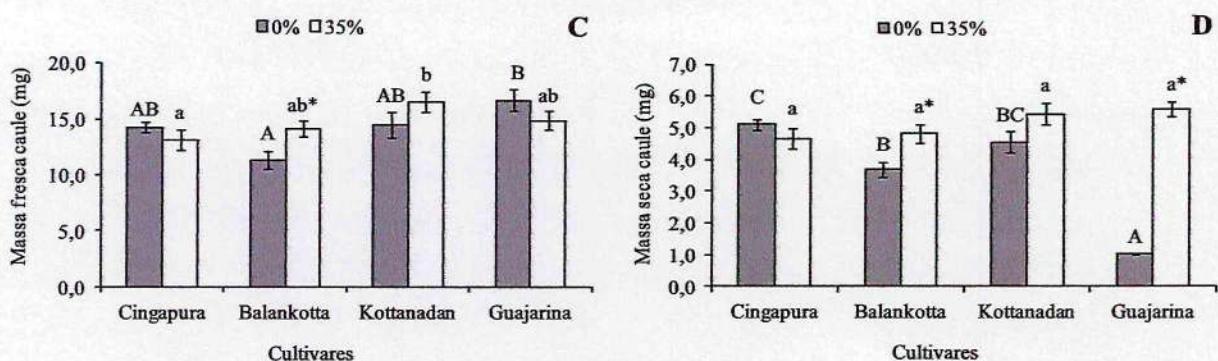


Alterações na morfologia do caule das cultivares de pimenteira-do-reino estudadas foram averiguadas por meio do número de gemas e do comprimento do caule. Para a variável número de gemas foi observado que as cultivares Cingapura e Balankotta apresentaram aumento no número de gemas quando na presença do filtrado fúngico, sendo significativo somente para cultivar Ballankotta. No entanto, comportamento contrário foi observado para cultivar Guajarina, onde houve a diminuição significativa no número de gemas quando em contato com o filtrado fúngico. Enquanto que não houve mudança para cultivar Kottanadan (Figura 16A). O comprimento do caule diminuiu para todas as cultivares, no entanto, essa diminuição foi significativa somente para as cultivares Kottanadan e Guajarina (Figura 16B).

Houve redução na massa fresca do caule das cultivares Cingapura e Guajarina quando cultivadas na presença da dose 35% do filtrado, enquanto que para as cultivares Balankotta e Kottanadan um aumento foi verificado, sendo que foi significativo somente para cultivar Balankotta (Figura 16C). Já para a massa seca do caule um aumento significativo foi percebido para as cultivares Balankotta e Guajarina, com exceção da cultivar Cingapura que teve sua massa seca reduzida (Figura 16D).

Figura 16 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre o número de gemas, comprimento do caule, massa fresca e massa seca do caule de plantas de *P. nigrum* *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.





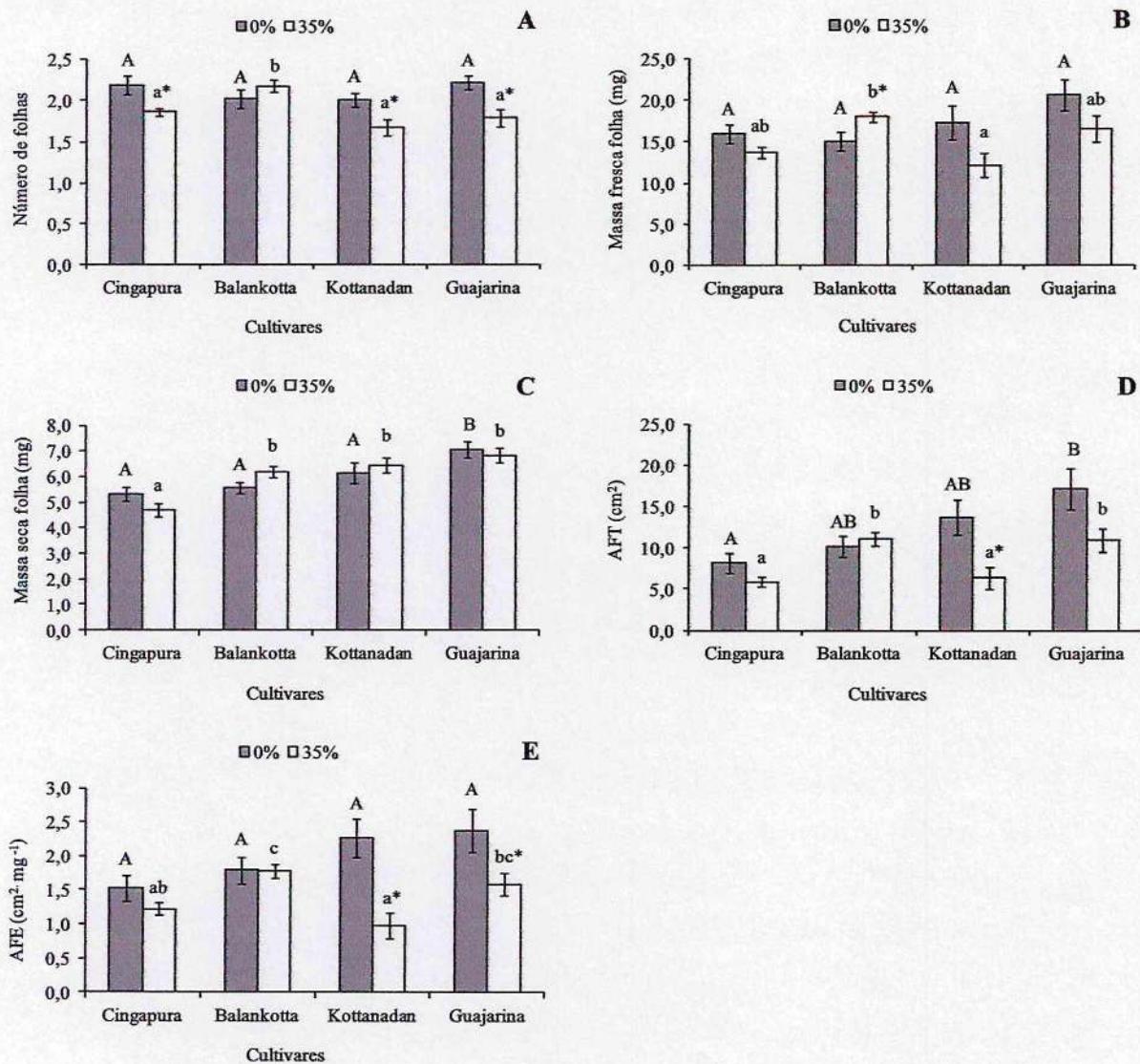
Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Alterações na morfologia das folhas das cultivares de pimenteira-do-reino submetidas a ação do filtrado fúngico, foram avaliadas com base no número de folhas, massa fresca e massa seca das folhas, área foliar total (AFT) e área foliar específica (AFE). Verificou-se que o número de folhas reduziu significativamente nas cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina. No entanto, para cultivar Balankotta este comportamento não foi verificado, havendo aumento no número de folhas nas plantas tratadas com o filtrado (Figura 17A). Comportamento semelhante foi observado para a variável massa fresca de folhas onde houve redução nas cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina, porém sem significância e aumento somente para cultivar Balankotta (Figura 17B).

Ao ser analisado a variável massa seca das folhas para Balankotta, Kottanadan e Guajarina, verificou-se que a fitotoxicidade do filtrado fúngico provocou acréscimo em massa nas folhas das cultivares, exceto para cultivar Cingapura, que apresentou decréscimo em massa nas folhas após o tratamento fúngico (Figura 17C).

A toxicidade do filtrado fúngico induziu um comportamento decrescente para as variáveis área foliar total e área foliar específica as cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina. Contudo, a cultivar Balankotta apresentou acréscimo em sua área foliar total e sua área foliar específica manteve-se praticamente inalterada após o ensaio de fitotoxicidade (Figura 17D e 17E).

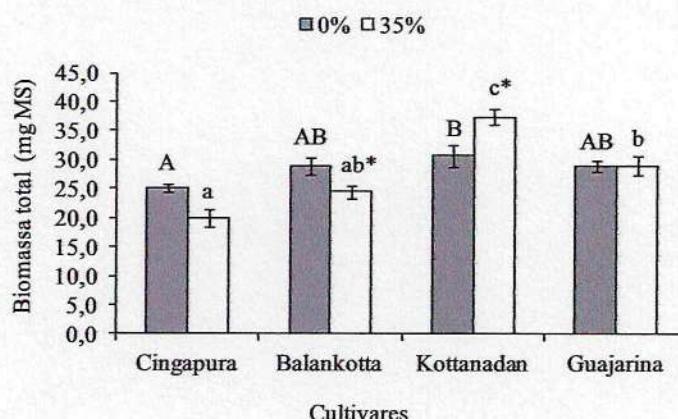
Figura 17 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre o número de folhas, massa fresca, massa seca, área foliar total e área foliar específica de plantas de *P. nigrum* *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Ao fim dos 45 dias do cultivo, foi observado que toxicidade do filtrado fúngico acarretou diminuição nos valores médios da biomassa total das plantas para as cultivares Cingapura e Balankotta, sendo significativo para Balankotta. Aumento significativo na produção de biomassa seca foi observada somente para cultivar Kottanadan, e valor médio de biomassa total intermediário foi registrado para cultivar Guajarina (Figura 18).

Figura 18 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre Biomassa total de plantas de *P. nigrum* *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



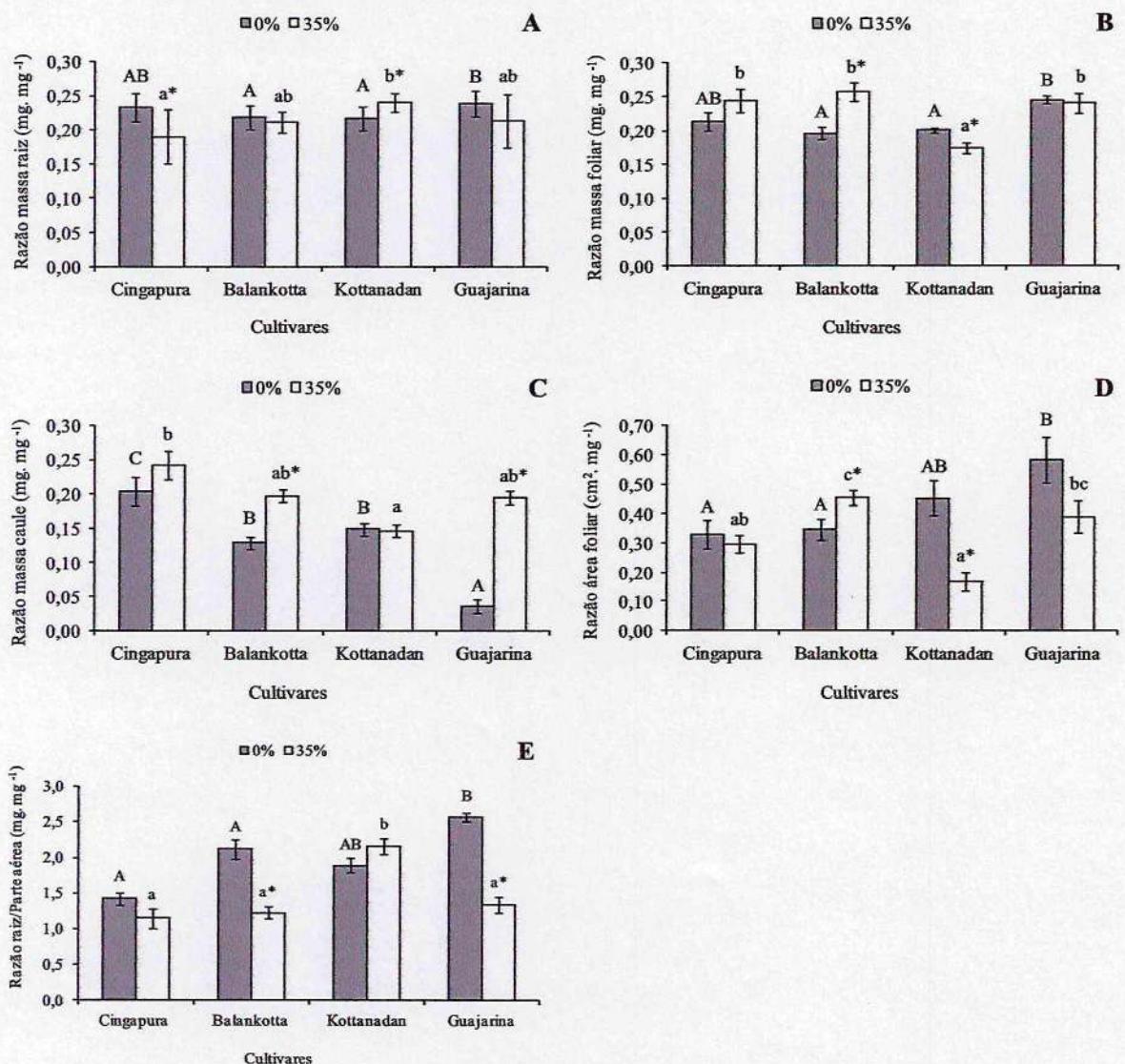
Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Ao avaliarmos o efeito fitotóxico do filtrado fúngico no crescimento das plantas de *P. nigrum* *in vitro* observou-se que houve acréscimo significativo na massa raiz (RMR) das plantas da cultivar Kottanadan, porém, para Cingapura, Balankotta e Guajarina foi observada queda na razão massa raiz (Figura 19A). Para a razão de massa foliar (RMF) houve acréscimo nas médias para Cingapura e Balankotta, sendo significativo somente para esta última. Para Kottanadan e Guajarina houve decréscimo nas médias para razão massa folha (RMF), sendo significativa somente para Kottanadan (Figura 19B). No entanto, acréscimos para a razão massa caule (RMC) foram notados para as cultivares testadas, embora em nível estatisticamente significativo para Balankotta e Guajarina (Figura 19C).

Observou-se que a razão de área foliar (RAF) decresceu em Cingapura, Kottanadan e Guajarina quando as plantas estavam em presença do filtrado fúngico, o que não foi verificado para Balankotta onde a razão de área foliar (RAF) sofreu acréscimo (Figura 19D). O mesmo comportamento foi observado para a razão raiz/parte aérea, onde um decréscimo nos valores médios foi averiguado em Cingapura, Balankotta e Guajarina, sendo o decréscimo

significativo somente pra as duas últimas cultivares citadas anteriormente, no entanto para Kottanadan comportamento oposto foi observado (Figura 19E).

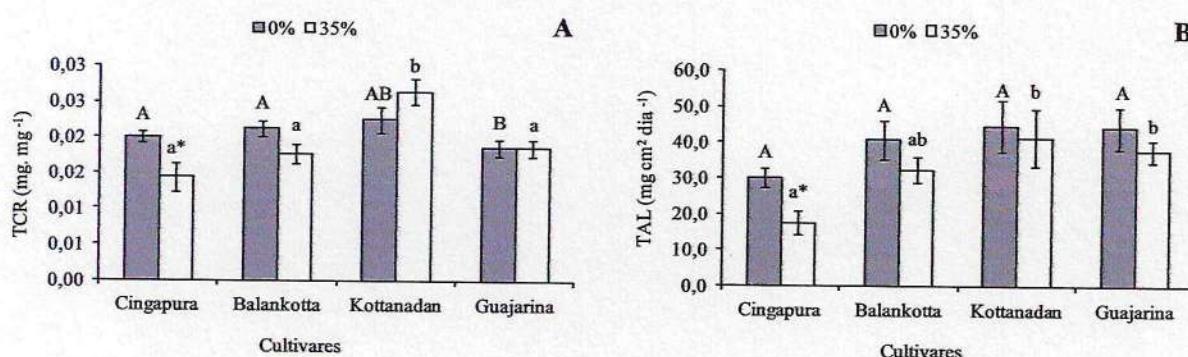
Figura 19 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre a Razão de massa raiz, Razão de massa foliar, Razão de massa caule, Razão de área foliar e Razão raiz/parte aérea de plantas de *P. nigrum* *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

Com relação à taxa de crescimento relativo (TCR) observou-se diminuição para as cultivares Cingapura e Balankotta cultivadas com filtrado fúngico, sendo que esta diminuição foi significativa somente pra a cultivar Cingapura (Figura 20A). Após a determinação da taxa assimilatória líquida (TAL) observou-se que somente a cultivar Cingapura foi afetada pela ação do filtrado fúngico (Figura 20B).

Figura 20 - Efeito do filtrado de cultura de isolados de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre a Taxa de crescimento relativo e a Taxa assimilatória líquida de plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum* L.) *in vitro* após 45 dias de inoculação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4.2. Determinações Bioquímicas

4.2.1. Pigmentos cloroplastídicos

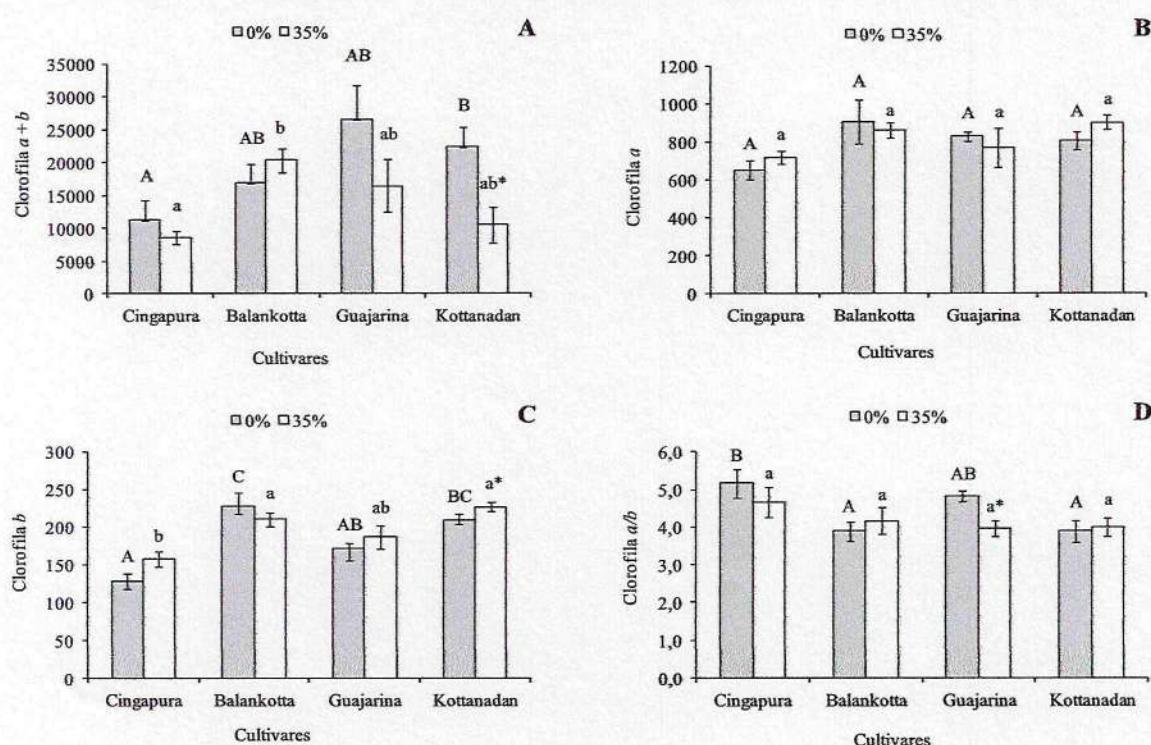
As plantas das cultivares de *P. nigrum* L. submetidas ao agente seletivo após 45 dias da inoculação em meio de cultivo, apresentaram visualmente amarelecimentos da folhas. As médias de clorofila total para cultivar Kottanadan diferiram significativamente, mostrando grande diferença entre as plantas controle e plantas submetidas ao filtrado. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observadas para as cultivares Cingapura, Balankotta e Guajarina (Figura 21A).

Valores médios maiores de clorofila *a* foram observados nas plantas tratadas com filtrado fúngico para as cultivares Kottanadan ($902,34 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) e Balankotta ($860,07 \mu\text{g g}^{-1}$ MF), no entanto, não houve diferença significativa nos níveis de clorofila *a* entre os tratamentos para as cultivares de pimenteira-do-reino (Figura 21B).

Para clorofila *b*, as plantas das cultivares Balankotta ($210,35 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) e Kottanadan ($227,24 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) tratadas com filtrado fúngico apresentaram maiores valores médios. Incremento significativo foi observado nos níveis de clorofila *b* nas plantas da cultivar Kottanadan após cultivo em meio de cultura controle e cultivada com filtrado fúngico (Figura 21C).

Nas plantas tratadas com filtrado fúngico, maiores médias da razão clorofila *a/b* foram observadas para as cultivares Cingapura ($4,66 \mu\text{g g}^{-1}$ MF) e Balankotta ($4,17 \mu\text{g g}^{-1}$ MF). Somente as plantas da cultivar Guajarina apresentaram diferença significativa entre as médias dos tratamentos (0% e 35%) (Figura 21D).

Figura 21 - Conteúdo de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila *a/b* das plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



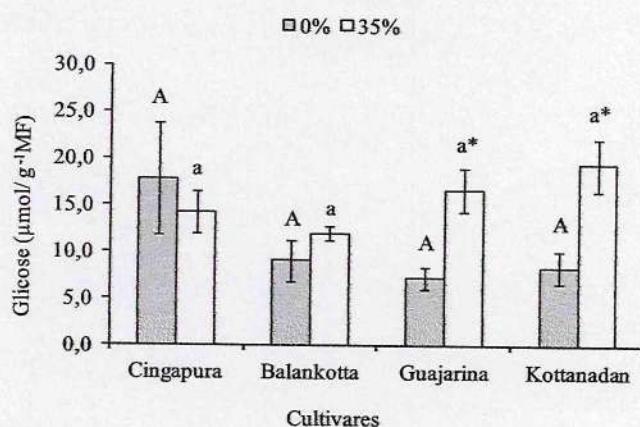
Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4.2.2. Determinação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose)

4.2.2.1. Glicose

As concentrações de glicose apresentaram maiores médias para as plantas sob ação do filtrado fúngico das cultivares Balankotta ($11,915 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), Guajarina ($16,610 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e Kottanadan ($19,280 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos (0 e 35%) para as cultivares Guajarina e Kottanadan (Figura 22).

Figura 22 - Conteúdos foliares de Glicose em plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.

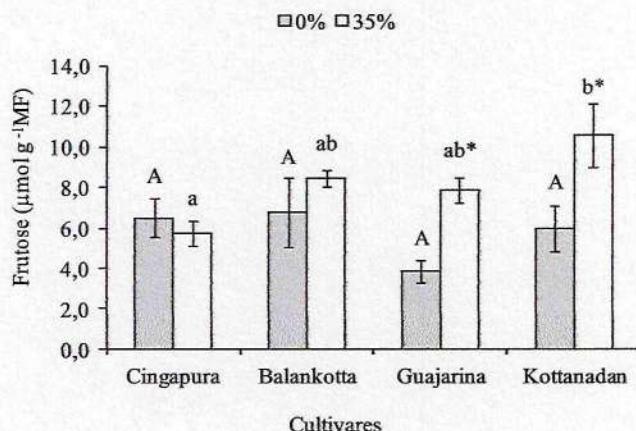


Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4.2.2.2. Frutose

Maiores médias de concentrações de frutose 6 fosfato foram observadas para as plantas das cultivares Balankotta ($8,444 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), Guajarina ($7,880 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e Kottanadan ($10,550 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) tratadas com filtrado fúngico. Os níveis de frutose 6 fosfato aumentaram significativamente para as plantas das cultivares Guajarina e Kottanadan tratadas com o filtrado fúngico (Figura 23).

Figura 23 - Conteúdos foliares de Frutose em plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

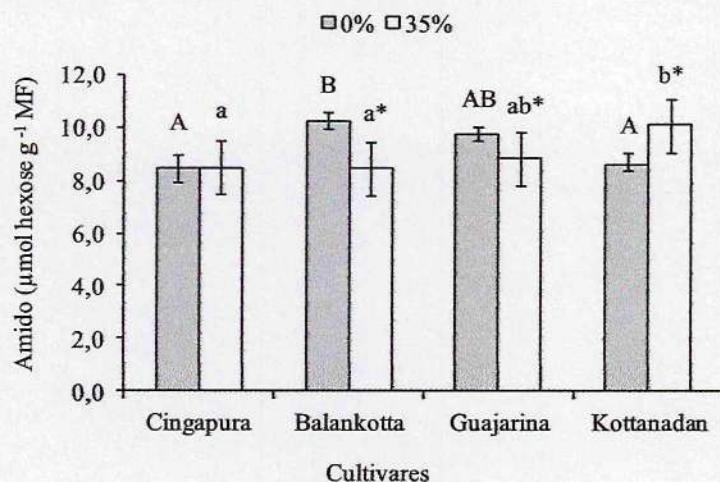
4.2.2.3. Sacarose

Nas determinações dos conteúdos de sacarose para as plantas de *P. nigrum L.* tratadas sem filtrado fúngico (0%) e com filtrado fúngico (35%) observou-se que não houve detecção de sacarose nas amostras foliares das plantas das cultivares Cingapura, Balankotta, Guajarina e Kottanadan em questão.

4.2.3. Determinação de Amido

O conteúdo médio de amido foi maior para as plantas da cultivar Kottanadan (10,093 $\mu\text{mol hexose g}^{-1}$ MF) tratadas com filtrado fúngico. Valores intermediários foram observados para as cultivares Guajarina (8,845 $\mu\text{mol hexose g}^{-1}$ MF) e Cingapura (8,494 $\mu\text{mol hexose g}^{-1}$ MF), e o menor valor foi identificado para a cultivar Balankotta (8,471 $\mu\text{mol hexose g}^{-1}$ MF). Os conteúdos de amido foram significativos para as cultivares Balankotta, Guajarina e Kottanadan, indicando que houve diferença entre os tratamentos ao comparar o tratamento controle (0%) e o tratamento com filtrado (35%) (Figura 24).

Figura 24 - Conteúdos foliares de Amido em plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.

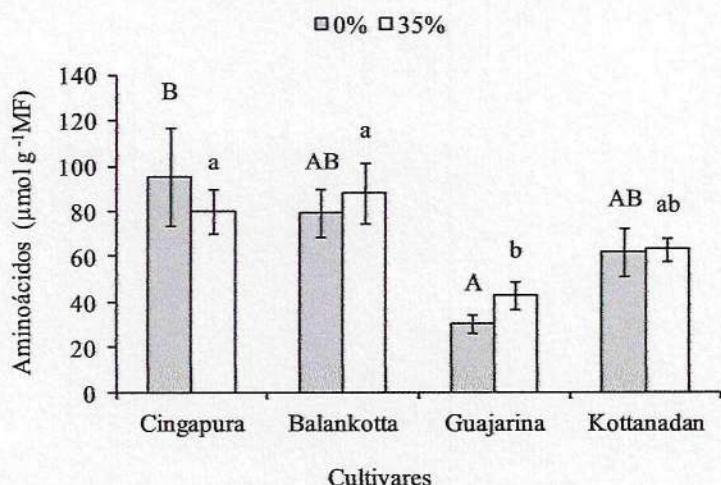


Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4.2.4. Determinação de Aminoácidos Solúveis Totais

Nas plantas de *P. nigrum* tratadas com filtrado fúngico maior valor médio de aminoácidos totais foram observados para cultivar Balankotta ($13,296 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF), média intermediária foi obtida para Cingapura ($9,880 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e menores médias para as cultivares Guajarina ($6,106 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF) e Kottanadan ($5,042 \mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Contudo, não houve significativa alteração entre os tratamentos para as cultivares avaliadas (Figura 25).

Figura 25 - Conteúdos foliares de aminoácidos totais em plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.

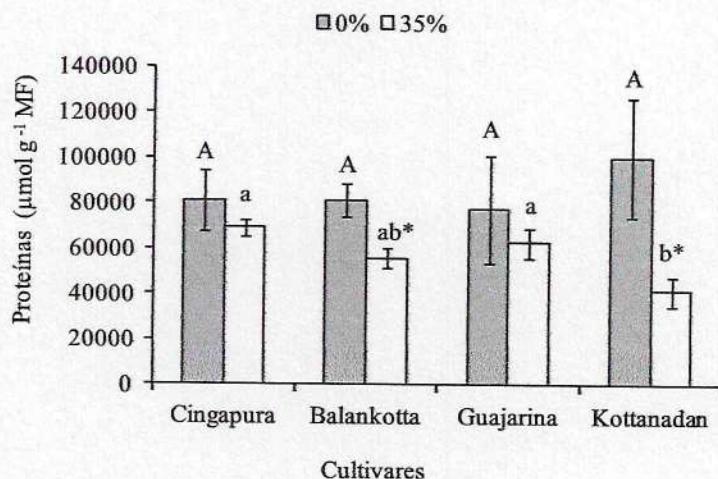


Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

4.2.5. Determinação do Teor de Proteínas Solúveis Totais

O conteúdo médio de proteínas nas plantas tratadas com o filtrado fúngico apresentou um perfil decrescente quando comparadas com as plantas controle, onde os maiores valores foram observados para as cultivares Cingapura ($68994,14 \text{ }\mu\text{mol. g}^{-1}$ MF) e Guajarina ($62584,97 \text{ }\mu\text{mol. g}^{-1}$ MF), valor intermediário foi observado para cultivar Balankotta ($55737,81 \text{ }\mu\text{mol. g}^{-1}$ MF) e o menor valor foi encontrado para cultivar Kottanadan ($41355,04 \text{ }\mu\text{mol. g}^{-1}$ MF) nas plantas sob ação do agente seletivo. Os conteúdos médios foliares de proteínas foram significativos para as cultivares Balankotta e Kottanadan, indicando que houve diferença entre os tratamentos controle (0%) e usando o filtrado fúngico (35%) (Figura 26).

Figura 26 - Conteúdos foliares de proteínas em plantas de pimenteira-do-reino (*P. nigrum L.*) *in vitro* após 45 dias de inoculação em filtrado de cultura de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento Controle (0%) entre as cultivares. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a probabilidade de 5% para o tratamento com filtrado (35%) entre as cultivares. Médias marcadas com (*) indicam diferença entre o tratamento controle (0%) e tratamento com filtrado (35%) para cada cultivar.



Fonte: Fabrícia Moraes, 2015.

5. DISCUSSÃO

5.1. Análises morfológicas e de crescimento

Até o momento não existem cultivares de *Piper nigrum* resistentes ao *Fusarium solani* f. sp. *piperis* e os níveis de tolerância a este patógeno ainda não foram mensuradas. Assim, este estudo relata as variações genotípicas de cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) quanto a suscetibilidade à ação do filtrado de cultura de *F. solani* f. sp. *piperis* sobre os parâmetros morfológicos e de crescimento dessas cultivares.

Foi possível verificar que as plantas de *P. nigrum*, apresentaram variações no nível de susceptibilidade às toxinas presentes no filtrado fúngico cultivados *in vitro*. Independentemente do genótipo, foi observado que as plantas *in vitro* apresentaram sintomas semelhantes às respostas observadas após o ataque do patógeno em condições de campo.

As espécies de *Fusarium* são as mais assiduamente estudadas em relação a produção de substâncias tóxicas, tanto em células vegetais como em animais e no homem (ZEMANKOVÁ, LEBEDA, 2001), no entanto, são escassos os estudos envolvendo alterações de características morfológicas de plantas de *P. nigrum* em resposta à inoculação por toxinas ou fitotoxinas fúngicas. Essas toxinas fúngicas não seletivas, caracterizam-se por não apresentarem especificidade, ou seja, são tóxicas a várias espécies de plantas, independentemente de serem ou não hospedeira dos fungos e são tidas como não essenciais pois contribuem para a severidade da doença (PASCHOLATI et al., 2008).

O crescimento pode ser descrito como a capacidade da planta em sintetizar fotoassimilados nas folhas e alocar matéria seca nos diversos órgãos. Assim, a análise de crescimento expressa às condições morfofisiológicas da planta, durante certo período de tempo (FONTES et al., 2005; MARENCO; LOPES, 2007).

As alterações morfológicas no sistema radicular das plantas das cultivares testadas submetidas à ação do filtrado de cultura fúngica foram avaliadas através do número e comprimento das raízes. Observou-se que o sistema radicular das cultivares de *P. nigrum* foram afetadas negativamente, pois tiveram o comprimento de suas raízes e a formação de novas raízes comprometidos, sendo possível verificar diferentes respostas para cada cultivar (Figura 15A e 15B), comprovado por meio da diminuição do acúmulo de massa fresca e massa seca redução no crescimento do sistema radicular foi observado através da diminuição do acúmulo de massa fresca e massa seca. No entanto, essa redução não foi percebida para cultivar Kottanadan, sendo considerada a menos vulnerável ao filtrado de cultura de *F. solani*

f. sp. piperis, levando-se em consideração a comparação entre as massas frescas e seca das raízes das plantas controle e das plantas tratadas com filtrado fúngico (Figura 15C e 15D).

Resultado semelhante foi verificado em plantas de maracujazeiro-amarelo sensíveis e insensíveis ao *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, onde os autores ao adicionarem filtrado fúngico ao meio básico de cultura, constataram redução no número de comprimento de raízes para o genótipo insensível, bem como nas massas fresca e seca das raízes, inibindo o crescimento de raízes (FLORES et al., 2012).

Para este experimento, o comprimento do caule diminuiu para todas as cultivares cultivadas com filtrado fúngico, sendo que o número de gemas também foi reduzido para a cultivar Guajarina. Entretanto, o acúmulo de massa fresca foi aumentada para as cultivares Balankotta e Kottanadan, provavelmente influenciada pela diminuição do comprimento do caule e aumento do número de gemas, tendo como consequência um encurtamento do entrenó e adensamento das gemas (Figura 16).

Em experimento com plantas de soja (*Glycine max*) sob o efeito de filtrado esterilizado e não-esterilizado de *Fusarium culmorim* foi verificada redução no comprimento do caulículo bem como na massa seca da parte aérea. Constatou-se ainda que, as reduções observadas foram aumentadas conforme a idade da cultura e que a fitotoxicidade do filtrado fúngico não havia sido afetada mesmo após sua esterilização, o que poderia ser resultado de sua interação com outras toxinas (HAIKAL, 2008).

No trabalho atual, o número de folhas e a massa fresca das folhas foram menores para as plantas submetidas ao filtrado de cultura fúngica das cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina, o que refletiu diretamente na área foliar total (AFT) e na área foliar específica (AFE) destas cultivares, que também apresentaram diminuição (Figura 17D e 17E). Entretanto, a cultivar Balankotta teve o crescimento da parte aérea considerada menos vulnerável a ação do filtrado fúngico. Estes resultados indicam que a cultivar Balankotta apresentou maior área foliar total, devido apresentar maior número de folhas na condição de estresse. A diminuição na AFE pode significar que houve um aumento no conteúdo das folhas, podendo ser pela diminuição do limbo foliar, visto que a AFE relaciona-se inversamente com a densidade das folhas (17E). Nesse sentido, presumi-se que a capacidade fotossintética da cultivar Balankotta foi menos influenciada quando comparada as outras cultivares, resultando em maior assimilação de carbono, e, portanto, maior crescimento foliar nessas plantas (Figura 17).

As folhas são os principais órgãos vegetais encarregados pela interceptação e captação de energia luminosa e capacidade fotossintética (LARCHER, 2000; SEVERINO et. al., 2004).

É o principal órgão no processo de respiração, sendo responsável pelas trocas gasosas entre a planta e o meio que a circunda (TAIZ; ZEIGER, 2013) e pela produção de matéria orgânica mediante o processo fotossintético, assim, a determinação da área foliar é extremamente importante para avaliar o crescimento vegetal (SOUZA NETO, 2009).

Redução no número de folhas também foi observada em plantas de maracujazeiro-amarelo sensíveis e insensíveis inoculadas em meio de cultura contendo filtrado de *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, demonstrando maior senescência foliar nas plantas quando comparadas com as plantas testemunhas (FLORES, 2008).

De modo geral a análise do crescimento vegetal tem como base essencial o fato de que aproximadamente, em média, 90% da matéria seca acumulada pela planta durante o seu crescimento é resultante da atividade fotossintética e o restante é resultante da absorção mineral do solo. Apesar de exigido em menor quantidade, os minerais são essenciais ao crescimento e desenvolvimento do vegetal (BENINCASA, 2003). De forma igual, a cultura de tecidos necessita incluir tais elementos no meio de nutritivo, para que haja a conversão dos explantes em plantas e das plantas em mudas (CID, 2010)

O crescimento das culturas de células e tecidos vegetais *in vitro* é consequência em parte da otimização da concentração de três classes de componentes do meio de cultura, são elas: os fitoreguladores, as substâncias orgânicas e os nutrientes minerais (RUSSOWSKI; NICOLOSO, 2003).

Ao analisarmos o crescimento vegetal estamos caracterizando o rendimento vegetal por meio de métodos fisiológicos, assim, estas informações podem ser utilizadas para se conhecer as adaptações ecofisiológicas das plantas a novos ambientes, a competição interespecífica e a capacidade produtiva de diferentes genótipos (TERRA, 2011). Dentre os índices fisiológicos utilizados no estudo do crescimento vegetal, a biomassa total da planta é considerado o melhor índice, pois está relacionado diretamente com a fotossíntese líquida (FERREIRA, 2003).

Para as cultivares de *Piper nigrum* utilizadas neste estudo, somente a cultivar Kottanadan apresentou acréscimo na biomassa total das plantas, sob a ação do filtrado de cultura fúngica, tendo em vista que esse ganho de massa seca é resultante do acúmulo de massa em todas as partes da planta, como foi observado para a massa seca de raiz, caule e folha desta cultivar. No entanto, para cultivar Balankotta a biomassa total das plantas submetidas ao filtrado decresceu, independentemente do ganho de massa seca de caule e folhas. Tal comportamento pode ser explicado em parte pela diminuição no número e massa seca de raízes. Provavelmente a alocação do carbono assimilado pela cultivar Balankotta pode

ter sido utilizada para manutenção da biomassa foliar e metabolismo na folha, uma vez que o número de folhas e a área foliar sofreram aumento mesmo na presença do filtrado fúngico (Figura 18).

A razão de área foliar (RAF) expressa a área foliar útil de uma planta sendo uma componente morfofisiológica, indicando a área foliar que está sendo usada pela planta para produzir um grama de matéria seca (BENINCASA, 2003). Esse valor representa a área foliar disponível para ocorrer a fotossíntese. Logo, para as cultivares de pimenteira-do-reino, valores de razão área foliar (RAF) observados foram significativos para as cultivares Balankotta e Kottanadan, porém Balankotta apresentou acréscimo na RAF, comportamento contrário foi observado para Kottanadan (Figura 19D).

Segundo Paiva e Oliveira (2006) a razão de área foliar expressa a dimensão relativa do aparelho fotossintético e serve como um parâmetro apropriado para as avaliações dos efeitos genotípicos, climáticos e do manejo vegetal. Apesar da MS das folhas ter aumentado para ambas as cultivares, a RAF para cultivar Balankotta apresentou-se maior, podendo talvez esta ser uma estratégia desta cultivar, convertendo parte dos seus assimilados em folhas, resultado este que coincide com a RMF (Figura 19D).

Considerando que as folhas são os centros de produção de matéria seca através do processo fotossintético, e que o restante da planta depende da exportação de material da folha, a razão massa foliar (RMF) expressa o quanto a planta investiu da sua produção via fotossíntese para as folhas, ou seja, representa a fração de massa seca não exportada. Valores significativos foram observados para as cultivares Balankotta e Kottanadan quando comparadas as plantas controle com as plantas tratadas com filtrado fúngico (Figura 19B). Assim, verifica-se que as plantas da cultivar Kottanadan retém menos material nas folhas, ou seja, maior é exportação de fitomassa (Figura 19B). De forma análoga, a razão massa caule (RMC) e a razão massa raiz (RMR) expressam a quantidade de matéria seca realizada que a planta investiu da sua produção, respectivamente. Valores significativos para razão massa caule foram verificados para as cultivares Balankotta, Guajarina e Kottanadan (Figura 19C) e para a razão massa raiz os valores foram significativos para as cultivares Balankotta e Guajarina (Figura 19A).

A taxa de crescimento relativo que traduz o aumento de biomassa por unidade de biomassa pré-existente em um dado intervalo de tempo, representa a eficiência da planta como produtora de novo material (PAIVA; OLIVEIRA, 2006). Sendo assim, a cultivar Cingapura apresentou decréscimo significativo quando na presença do filtrado fúngico, ou seja, essa cultivar teve sua eficiência na produção de matéria seca comprometida (Figura

20A). Essa taxa apresentou valores médios inferiores para as plantas tratadas com filtrado, embora não significativos, para as cultivares Balankotta e Guajarina, podendo ser consequência de um balanço de carbono desfavorável entre os ganhos fotossintéticos e as perdas respiratórias, ou por causa da senescência e perda foliar nas plantas tratadas com filtrado fúngico (Figura 20A). A cultivar Kottanadan apresentou acréscimo para a taxa de crescimento relativo em presença do filtrado, embora não significativos (Figura 20A).

A taxa de assimilação líquida expressa quanto a planta acumula massa seca por unidade de área e por unidade de tempo, refletindo a dimensão do sistema assimilador que está envolvido da produção de massa seca, e é uma estimativa de fotossíntese líquida da planta (PAIVA; OLIVEIRA, 2006). Para as cultivares de *P. nigrum* quando comparamos os tratamentos verificamos que há uma diminuição nos valores médios da TAL, mesmo que não significativos, com exceção da cultivar Cingapura que apresentou os valores médios de TAL significativos (Figura 20B).

5.2. Determinações Bioquímicas

Parâmetros bioquímicos foram avaliados para averiguar possíveis diferenças em plantas *in vitro* das cultivares de *P. nigrum* (Cingapura, Balankotta, Kottanadan e Guajarina) submetidas à ação de toxinas fúngicas presentes no filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis*.

Os fitopatógenos produzem uma gama de compostos secundários em meio de cultivo, que geralmente apresentam atividade fitotóxica, no entanto, só uma parte muito pequena dessas substâncias realiza algum papel nas doenças (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011). Essas toxinas fúngicas podem induzir em plantas uma variedade de sintomas que frequentemente são observados quando doentes, como: clorose, necrose, murcha, encharcamento e alterações no crescimento (PASCHOLATI et al., 2008).

Uma das mudanças visuais mais comuns em plantas doentes é a clorose, considerada como indicativo da redução do teor de clorofila em tecidos vegetais. A coloração verde das folhas está diretamente relacionada com os teores de clorofila, em especial a clorofila *a* (TAIZ; ZEIGHER, 2013).

De modo geral, neste trabalho os teores de clorofila para as cultivares de *P. nigrum*, por si só não foram bons indicadores na averiguação das possíveis diferenças entre os tratamentos, isto talvez se deva ao fato de que as variações nas concentrações tenham ocorrido de forma sutil, visto que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos. O teor de clorofila *a+b* foi significativo para cultivar Kottanadan (Figura 21A), como consequência

da análise do teor de clorofila *b*, que também foi significativo para a mesma cultivar (Figura 21C).

As clorofilas são pigmentos responsáveis pela captação da energia luminosa e conversão desta em energia química, para ser utilizada no processo fotossintético, sendo a clorofila *a* o pigmento mais importante, haja vista que é encontrada em maior quantidade e são os principais componentes do fotossistemas I e II (KERBAUY, 2008, CRUZ et al., 2004).

Assim, como verificado para cultivar Kottanadan, em experimento com *Musa spp.* sob a ação de filtrado de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* para identificação de resistência ou susceptibilidade das cultivares de bananeira, foi demonstrado decréscimo no teor de clorofila *b* nas folhas em que foram dos genótipos suscetíveis cultivados com filtrado de cultura fúngica (COMPANIONI et al., 2006).

Embora não tenham sido avaliados neste experimento, as concentrações de carotenóides nos tecidos foliares devem fornecer melhores subsídios para a distinção entre esses tratamentos para as cultivares de *P. nigrum*.

A composição dos meios nutritivos é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da cultura de tecidos vegetais. Diversos são os meios de cultura que podem ser empregados neste processo, entre eles está o MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962), que é o meio de cultura padrão mais utilizado, composto de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, Fe-EDTA, sacarose e agente gelificante (SU; SCHNITZER; FARIA, 2012).

A sacarose utilizada no meio de cultura é um dos carboidratos mais utilizados na preparação dos meios nutritivos (CID, 2010), atua como uma fonte de energia e fornece carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Pode ainda ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas (HAZARIKA, 2003).

Nas plantas os polissacarídeos podem desempenhar múltiplos papéis no crescimento, desenvolvimento e nas resposta de defesa, não só como carbono e recursos energéticos, mas também podem contribuir para a resistência da parede celular e nas propriedades de troca iônica da parede celular (MARRY et al., 2006).

Detectou-se que as concentrações de glicose em *P. nigrum* foram significativamente maiores para as cultivares Guajarina e Kottanadan tratadas com filtrado fúngico, e numericamente maior para cultivar Balankotta, porém não significativa, o que pode ser explicado em parte pelo processo de translocação de carboidratos (Figura 22). Segundo

Pascholati, *et al.* (2008) a translocação dos fotossintetizados é influenciada pela infecção, onde esses produtos fotossintetizados são translocados de folhas ou tecidos sadios para os infectados.

Em plantas de *P. nigrum* as concentrações de frutose foram numericamente maiores para as cultivares Balankotta, Guajarina e Kottanadan, quando comparadas as plantas controle com as plantas cultivadas com filtrado fúngico, sendo significativamente maiores para Guajarina e Kottanadan (Figura 23).

Algumas pesquisas com patógenos sugerem que aumentos nos teores de carboidratos podem ser explicados pelo fato de que provavelmente, os patógenos inibam o transporte dos açúcares no floema para o sistema radicular, ocasionando assim o acúmulo destes carboidratos nas folhas das plantas infectadas pelo agente patogênico, resultados estes verificados em plantas de *L. gracilis* (FERNANDES, 2014), *Cocos nucifera* (MAUST *et al.*, 2003), *Helianthus annuus* (ARIAS; LENARDON; TALEISNIK, 2003) e *Phaseolus vulgaris* (LOBATO *et al.*, 2009). No entanto, Beltrame (2010), estudando a interação do fungo *Phytophthora nicotianae* em *Citrumelo swingle* observou que o patógeno não causou alterações no teor de açúcares nas folhas dessa espécie (Figura 22 e 23).

O acúmulo de glicose e frutose é observado em plantas atacadas por patógenos, em razão da inibição da taxa fotossintética, resultante da perda de atividade e/ou quantidade de enzimas do ciclo de Calvin, como por exemplo, a frutose-1,6-bifosfatase e a ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxidase (Rubisco EC 4.1.1.39), e em paralelo há um incremento na atividade da invertase. Consequentemente, acúmulo de glicose e frutose vai acarretar uma retroinibição do ciclo de Calvin (PASCHOLATI *et al.*, 2008).

Na micropropagação a fonte de carbono é essencial para o crescimento das plantas (CID, 2010) e geralmente a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada no meio de cultura. A sacarose condicionada ao meio de cultura é um componente importante, considerando que a fotossíntese em plantas *in vitro* geralmente é insuficiente, devido a baixa concentração de CO₂ e troca gasosa nos frascos (MILLS, 2009).

Neste experimento a sacarose não foi detectada nos tecidos foliares para as cultivares de *P. nigrum* cultivadas *in vitro* na condição controle (0%) e tratadas com filtrado fúngico (35%), podendo ser explicado principalmente devido a fotossíntese da planta ou do explante *in vitro* ser limitada, e também pelo fato da sacarose exógena utilizada na preparação dos meios nutritivos ser praticamente hidrolisada em glicose e em frutose na sua passagem pela autoclave (CID, 2010).

As plantas *in vitro* geralmente possuem baixa atividade ou inatividade das enzimas responsáveis pela fotossíntese, como a ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/oxidase (Rubisco EC 4.1.1.39). Essa baixa atividade pode estar relacionada com a presença de açúcar no meio de cultivo durante o desenvolvimento foliar (HAZARIKA, 2003). Além disso, maior parte dos carboidratos em plantas cultivadas *in vitro* é consumida para que ocorra o processo de respiração ou usada como fontes de energia até que as plantas desenvolvam sua competência fotossintética, como verificado em *Rehmannia glutinosa*, onde plantas em cultivo fotoautotrófico possuíam um maior conteúdo de sacarose, glicose e frutose após 15 dias de aclimatização, do que as cultivadas em condições *in vitro* (SEON et al., 2000).

Para averiguar o papel de metabólitos primários e secundários nos mecanismos de defesa das plantas, algumas pesquisas tem sido conduzidas. Em clones de *Theobroma cacao* com diferentes níveis de susceptibilidade ao patógeno *Phytophthora megakaraya* foram investigados, e alterações nos teores de carboidratos, aminoácidos e fenóis foram constatados, os autores concluíram que tais alterações foram genótipos-dependentes (NDOUMOU; NDZOMO; DJOCGOUE, 1996).

Em plantas de *Zea mays* suscetíveis e resistentes à fitoplasma, foi verificado alterações nos teores de carboidratos, proteínas, compostos fenólicos e clorofila total após 10 dias da inoculação do patógeno. Houve acréscimo nos teores de carboidratos, proteínas, compostos fenólicos das plantas suscetíveis ao fitoplasma, no entanto, o teor de clorofila total nas plantas suscetíveis foi reduzido (JUNQUEIRA, 2003).

Uma das três rotas metabólicas do carbono fixado pelas folhas é a síntese de compostos de armazenamento na forma de amido, para utilização no processo de respiração noturna e em momentos em que a fotossíntese diminui em função das variações ambientais (TAIZ; ZEIGHER, 2013).

O conteúdo de amido foi alterado significativamente nos tecidos foliares das plantas cultivadas *in vitro* de *P. nigrum* L. tratadas sem filtrado fúngico (0%) e com filtrado fúngico (35%). Sendo que para cultivar Kottanadan houve um acréscimo significativo no teor de amido nos tecidos foliares (Figura 24). Esse acréscimo no teor de amido provavelmente é resultante do acúmulo de sacarose obtida do meio nutritivo, formando as moléculas de amido (Figura 24). Comportamento contrário foi observado para as cultivares Balankotta e (Figura 24). Guajarina, onde os teores de amido nas folhas sofreram decréscimo significativo. Nas enfermidades onde as plantas infectadas sofrem clorose, necrose ou lesões foliares a fotossíntese é reduzida, devido à destruição do tecido verde e consequentemente interceptação da radiação, porém, nem sempre o dano do tecido foliar reflete o efeito do patógeno na

atividade fotossintética da folha (PASCHOLATI et al., 2008) e consequentemente a formação de trioses fosfatadas também é comprometida.

Apesar da determinação do conteúdo de aminoácidos em extratos vegetais ser amplamente utilizada na fisiologia, haja vista que, a reação da planta ou de seus órgãos à ferimentos ou a situações de estresse provoca a síntese de proteínas, que tem nos aminoácidos as suas unidades fundamentais. Neste experimento, contudo, o conteúdo médio de aminoácidos totais não foi significativo entre os tratamentos para as plantas das cultivares de *P. nigrum* cultivadas *in vitro*, talvez pelo intervalo de tempo em que as plantas foram tratadas com o filtrado ou pela concentração de filtrado utilizada não ser suficiente para promover essas alterações bioquímicas nas cultivares (Figura 25).

As proteínas são polímeros constituídos por uma sequência de aminoácidos, onde cada proteína é composta por uma sequência única de aminoácidos, o que determina sua função dentro da célula (NELSON; COX, 2011). A síntese proteica é a função primordial da célula, e em sua ausência, o crescimento e a manutenção dos órgãos vegetais paralisam, tornando-se um fator limitante à taxa de crescimento dos vegetais (PEIXOTO, 2009).

Em relação aos teores de proteínas totais encontrados neste trabalho, somente as cultivares Balankotta e Kottanadan apresentaram redução nos tecidos foliares dos conteúdos médios de proteínas significativos entre os tratamentos, em contato com o filtrado fúngico quando comparadas com as plantas testemunhas, enquanto que as cultivares Cingapura e Guajarina não foram significativas para os teores de proteínas (Figura 26).

Em plantas de *Lippia gracilis* e *Cucumis melo* inoculadas com o fungo *Monosporascus cannonballus*, foi verificado aumento significativo no teor de proteínas totais para as plantas de *L. gracilis* quando comparadas com as plantas sem inoculação do patógeno, porém para a espécie *C. melo* os teores de proteínas não foram significativos (FERNANDES, 2014).

Em geral, plantas infectadas por fitopatógenos sofrem um aumento considerável no conteúdo de proteínas, e este aumento pode ser explicado como sendo proveniente da ação conjunta dos organismos envolvidos, pois a planta de um lado tenta se defender ativando seus mecanismos de defesa e, por outro lado o patógeno tenta anular o efeito inibitório gerado pela planta (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2000). Este acréscimo no teor de proteínas não foi constatado nas plantas de *P. nigrum* cultivadas *in vitro* sob ação do filtrado de *F. solani* f. sp. *piperis*, assim como em tecidos de folhas de tangerina inoculadas com *P. nicotianae* não foi possível observar alterações nas proteínas. (BELTRAME, 2010).

7. CONCLUSÕES GERAIS

As cultivares de *P. nigrum* nas condições deste trabalho não podem ser diferenciadas pelas suas concentrações de pigmentos cloroplastídicos (Cl $a+b$, Clorofila *a*, Clorofila *b* e razão clorofila *a* e clorofila *b*).

O sistema radicular das cultivares de *P. nigrum* é afetado negativamente, sob a ação do filtrado fúngico, onde o número e comprimento das raízes são comprometidos, sendo possível verificar diferentes respostas para cada cultivar.

Há diminuição do comprimento do caule para todas as cultivares e no número de folhas das plantas das cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina, que refletem diretamente na diminuição da área foliar total (AFT) e na área foliar específica (AFE) exceto da cultivar Balankotta considerada menos vulnerável a ação do filtrado fúngico.

No geral, os teores de proteínas sofrem alterações nas plantas tratadas com filtrado fúngico.

Os teores de açúcares (glicose e frutose) podem ser utilizados como indicativo das alterações bioquímicas em plantas de *P. nigrum* sob ação do filtrado fúngico.

Os resultados permitem indicar a cultivar Cingapura como a mais suscetível e a cultivar Kottanadan como a mais tolerante, dentre as cultivares avaliados nas condições deste trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia.** Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4^a Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011. 704p.
- ARIAS, M. C.; LENARDON, S.; TALEISNIK, E. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the Sunflower Chlorotic Mottle Virus. **J. Phytopathol.**, v. 246, n. 151, p. 267-273, 2003.
- BELTRAME, A. B. **Interação *Phytophthora nicotianae* - porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citromelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímicos.** 2010. 137 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas.** Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v.72, p. 248-254, 1976.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa CENARGEN. v. 1, p. 87-132, 1998.
- CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas.** Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2010. 303p.
- COMPANIONI, B.; MORA, N.; DÍAZ, L.; PÉREZ, A.; ARZOLA, M.; ESPINOSA, P.; HERNÁNDEZ, M.; José de la Caridad VENTURA, J. de la C.; PÉREZ, M. C.; SANTOS, R.; LORENZO, J. C. Differentiating resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strain 1 culture filtrates in banana leaves. **Biotecnología aplicada**. v. 23, n. 2, 2006.
- CRUZ, J. A.; AVENSON, T. J., KANAZAWA, A.; TAKIZAWA ,K.; EDWARDS, G. E.; KRAMER, D. M. Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. **Journal of Experimental Botany** ,v. 56, p. 395-406, 2004.
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; CHU, E. Y.; BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L .S. Manejo integrado da fusariose e da murcha amarela da pimenteira-do-reino. 2002. In: POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R. (Ed.). **Manejo integrado das principais doenças e cultivos amazônicos.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, pl-16.
- FERNANDES, L. C. B. **Resposta Biológica em *Lippia gracilis* SCHAUER E *Cucumis melo* L. Induzida pelo fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker.** 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) - Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2014.
- FERNIE, A. R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R. G.; KRUGER, N. J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and

increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta.** v. 212, p. 250-263, 2001.

FERREIRA, M. M. Crescimento, alocação de biomassa e abordagem fitoquímica de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don em função da adubação orgânica e época de colheita. 2003. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

FLORES, P. S. Filtrado de culturas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e ácido fusárico na seleção *in vitro* de maracujazeiro-amarelo. 2008. 88 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

FLORES, P. S.; OTONI, W. C.; DHINGRA, O. D.; DINIZ, S. P. S. S.; SANTOS, T. M., BRUKNER, C. H. In vitro selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to Fusarium vascular wilt. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** v. 108, p. 37-45, 2012.

FONTES, P.C.R.; DIAS, E.N.; SILVA, D.J.H. Dinâmica do crescimento, distribuição de matéria seca na planta e produção de pimentão em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 94-99, 2005.

GEIGENBERGER, P.; LERCHL, J.; STITT, M.; SONNEWALD, U. Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. **Plant Cell Environ.** v. 19, p. 43-55, 1996.

GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HOHNE, M.; HENDRIKS, J. H.; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **Plant Cell.** v. 16, p. 3304-3325, 2004.

HAIKAL, N. Z. Effects of filtrates of pathogenic fungi of soybean on seed germination and seedling parameters. **Journal of Applied science Research**, v.4, n.1, p. 48-52, 2008.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HENDRIKS, J. H.; KOLBE, A.; GIBON, Y.; STITT, M.; GEIGENBERGER, P. ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of *Arabidopsis* and Other Plant Species. **Plant Physiology**. v. 133, p. 838-849, 2003.

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).

JAN, B; KANG, F. Y.; PETER PAUL, S. K. In vitro selection for disease/ toxins resistance. In: DIXON, R. A.; GONZALES, R. A. (eds) **Plant cell cultures: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford, p. 87-94, 1993.

- JUNQUEIRA, A. C. B. Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.
- LEMOS, O. F. de. **Mutagênese in vitro no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 191 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2003.
- LEMOS, O. F.; NETO, A. T.; ALBINO, J. C.; POLTRONIERI, M. C.; ANDO, A. *In vitro* and *in vivo* selection of black pepper (*Piper nigrum*) mutants tolerant to Fusariosis. Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases, IAEA. Vienna, n. 1, p. 267-284, May, 2010.
- LEMOS, O. F.; POLTRONIERI, M. C.; RODRIGUES, S. M.; MENEZES, I. C.; MONDIM, M. **Conservação e melhoramento genético da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) associado às técnicas de biotecnologia**.- Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 45 p.
- LOBATO, A. K. S., GONCALVES-VIDIGAL, M. C.; VIDIGAL FILHO, P. S.; COSTA, R. C. L. CRUZ, F. J. R.; SANTOS, D. G. C.; SILVA, C. R. SILVA, L. I. L. L. SOUZA, L. L. Changes in photosynthetic pigment and carbohydrate content in common bean cultivars infected by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Soil Environ.**, v. 55, n. 2, p. 58-61, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MARENCO, R; LOPES, N. F. A. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, Respiração, Relações Hídricas e Nutrição Mineral**. Viçosa: UFV, p. 469, 2007.
- MARRY, M.; ROBERTS, K.; JOPSON, S. J.; HUXHAM, I. M.; JARVIS, M. C.; CORSAR, J.; ROBERTSON, E.; MCCANN, M. C. Cell-cell adhesion in fresh sugar-beet root parenchyma requires both pectin esters and calcium cross-links. **Physiol. Plant**, v. 126, 243–256, 2006.
- MATSUMOTO, K.; BARBOSA, M. L.; SOUZA, L.A.C.; TEIXEIRA, J.B.; In vitro selection for resistance to Fusarium wilt in Banana. Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases, IAEA, Vienna, n. 1, p. 101-113. May, 2010.
- MAUST, B. E.; ESPADAS, F.; TALAVERA.; AGUILAR, M.; SANTAMARIA, J. M.; OROPEZA, C. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the letal yellowing phytoplasma. **Phytopathologic**, v. 93, n. 8, p. 976-981, 2003.
- MENEZES, I. C.; CIDADE, F. W.; SOUZA, A. P.; SAMPAIO, I. C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the black pepper, *Piper nigrum* L. (piperaceae). **Conservation Genet Resour**, v. 1, p. 209-2012, 2009

MILLS, D. Effect of sucrose application, minerals, and irradiance on the *in vitro* growth of *Cistus incanus* seedlings and plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 53, n. 3, p. 415-421, 2009

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

NDOUMOU, D. O.; NDZOMO, G. T.; DJOCGOUE, P. F. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol contents in Cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. **Annals of Botany, Cameroon**, v. 77, p. 153-158, 1996

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiros. v.13, 627p. 2008.

PAIVA, R.; OLIVEIRA. L. M de. **Fisiologia e produção vegetal**. Lavras, ed. UFLA, 2006, 104p.

PEIXOTO, C. P. Dinâmica do crescimento vegetal: princípios básicos. In: **Tópicos em ciências agrárias**. 2009. 38p.

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochem Biophys Acta**, n. 975, p. 384- 394, 1989.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, jan-fev, 2003.

SEON, J-H; CUI, Y-Y; KOZAI, T.; PAEK, K-Y. Influence of *in vitro* growth conditions on photosynthetic competence and survival rate of *Rehmannia glutinosa* plantlets during acclimatization period. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 61, p. 135-142, 2000.

SEVERINO, L. S.; CARDOSOS, G. D.; VALE, L. S.; SANTOS, J. W. Método para determinação da área foliar da mamoneira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, n. 1, p. 753-762, 2004.

SILVA, J. K. R.; SILVA, J. R. A.; NASCIMENTO, S. B.; LUZ, S. F. M.; MEIRELES, E. N.; ALVES, C. N.; RAMOS, A. R.; MAIA, J. G. S. Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential Oil against Fusarium Infection in Black Pepper. **Molecules**, v. 19, p. 17926-17942, 2014.

SOUZA NETO, A. G. de. **Avaliação da área foliar de cinco espécies florestais ocorrentes no semiárido paraibano**. 2009. 37 f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2009.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilaseoxigenase (rubisco), clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. DE. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, Jaboticabal, v. 40, n. 1, p.28–34, 2012.

SVABOVÁ, L.; LEBEDA, A. In Vitro Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. **J. Phytopathology**, v. 153, p. 52–64, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p

TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. B.; SIEBENEICHLER, S. C.; NETO, J. J. D.; ANJOS, L. M.; CASTRO, D. V. Análise de crescimento em sorgo sob diferentes *stands*. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n. 3, p 45-57, 2011.

TREMACOLDI, C. R. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle**. Belém, PA - Embrapa Amazônia Oriental, 21 ed., 23 pag. Agosto, 2010.

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

ZEMANKOVÁ, M.; LEBEDA, A. Fusarium species: their taxonomy, variability and significance in plant pathology. **Plant Protection Science**, v. 37, p. 25-42, 2001.

ANEXOS

ANEXO A. Composição do meio básico de cultura de Murashige & Skoog (1962).

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

ANEXO B. Composição dos Meios de Czapek-Dox e Batata-Sacarose-Agar (BSA) para cultivo de fungo.

Composto	Czapek-Dox (g L ⁻¹)	BSA (g L ⁻¹)
- NaNO ₃	3,0	
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	
- KH ₂ PO ₄	1,0	
- KCl.2H ₂ O	0,5	
- FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	
- Sacarose	30,0	10,0
- Fe-EDTA	2,5 ml (Fe-EDTA 20x MS)	
- Disco de batata sem pele		200,0
- Ágar		20,0

6. CONCLUSÕES

O filtrado fúngico de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* provoca alterações morfofisiológicas de plantas de pimenteira-do-reino *in vitro*.

Os teores de clorofilas para as cultivares de *P. nigrum*, por si só não são indicadores na averiguação das possíveis diferenças entre si.

O uso de filtrado do fungo *F. solani* f. sp. *piperis* é uma alternativa como agente seletivo *in vitro* para screening de genótipos de plantas de pimenteira-do-reino com base nas alterações morfofisiológicas.

O filtrado de cultura fúngica provoca alterações morfofisiológicas principalmente no sistema radicular das cultivares de pimenteira-do-reino *in vitro*.

O comprimento do caule diminui para todas as cultivares cultivadas com filtrado fúngico.

Há diminuição no número de folhas das plantas submetidas ao filtrado de cultura fúngica das cultivares Cingapura, Kottanadan e Guajarina, refletindo diretamente na área foliar total (AFT) e na área foliar específica (AFE) destas cultivares, com exceção da cultivar Balankotta, considerada menos vulnerável à ação do filtrado fúngico.

O filtrado fúngico acarreta diminuição na produção de biomassa total e na taxa de crescimento relativo das plantas de *P. nigrum*, com exceção da cultivar Kottanadan.

O filtrado fúngico aumenta os teores de glicose e frutose em plantas de *P. nigrum* das cultivares Guajarina e Kottanadan.

O conteúdo de amido aumenta em plantas tratadas com filtrado fúngico nas cultivares Balankotta, Guajarina e Kottanadan.

Não há alteração nos conteúdos de aminoácidos totais nas cultivares de *P. nigrum* tratadas com filtrado fúngico.

Há redução no teor de proteínas totais das cultivares Balankotta e Kottanadan tratadas com filtrado fúngico.

A cultivar Cingapura é a mais suscetível enquanto a cultivar Kottanadan a mais tolerante, nas condições avaliadas.