



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



MEICIANE FERREIRA CAMPELO

**CLONAGEM *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper
nigrum* L.)**

BELÉM
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



MEICIANE FERREIRA CAMPELO

**CLONAGEM *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper
nigrum* L.)**

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro
Co-orientador: Dr. Oriel Filgueira de Lemos

BELÉM
2015

Campelo, Meiciane Ferreira

Clonagem *in vitro* de híbridos de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). / Meiciane Ferreira Campelo. Belém, 2015.

82 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Hugo Alves Pinheiro

1. Pimenta-do-reino – cultivo - método 2. Micropropagação
3. Subcultivos 4. Pimenta-do-reino - cultivo *ex vitro* 5. *Piper nigrum* L. 6. Fitoreguladores I. Pinheiro, Hugo Alves, Orient. II. Título.

CDD – 633.84



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



MEICIANE FERREIRA CAMPELO

CLONAGEM *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE PIMENTEIRA-DO-REINO
(*Piper nigrum* L.)

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal, para obtenção do título de **Mestre em Agronomia**

Aprovado em 30 de janeiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro - Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Dr.ª Elisa Ferreira Moura Cunha - 1º Examinador
Embrapa Amazônia Oriental

Prof.ª Dr.ª Joanne Moraes de Melo Souza - 2º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof.ª Dr.ª Hérica Santos de Oliveira - 3º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

DEDICO

Aos meus pais, que apesar das dificuldades sempre se esforçaram para me oferecer a melhor educação, pelo incentivo em todas as etapas dos meus estudos, por mostrarem que sou capaz de ultrapassar todos os obstáculos podendo assim alcançar meus objetivos.

OFEREÇO

À minha família, meu marido e minha filha, fonte de minhas forças por quem nunca pensei em desistir e sim persistir nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sempre quando o difícil se tornava impossível começava a agir me dando força para a realização de mais um sonho.

Ao meu amado esposo, Edilson Junior da Silva Moura, por todo seu amor, dedicação, apoio, pela compreensão nas ocasiões em que estive distante e pelo incentivo nos momentos difíceis, por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais, pelos quais tenho muito orgulho, pelo apoio e incentivo por todos os conselhos e ensinamentos que contribuíram para a formação do meu caráter.

Aos meus irmãos por todo o amor e companheirismo

Ao meu orientador, Dr. Hugo Alves Pinheiro pela confiança, e pela orientação durante o trabalho.

Ao meu queridíssimo co-orientador, Dr. Oriel Filgueira de Lemos pelo exemplo de pessoa e profissional, pela orientação, amizade, compreensão, confiança, conhecimentos e oportunidades concedidas durante esse tempo.

A Universidade Federal Rural da Amazônia, especialmente ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

A Embrapa Amazônia Oriental, pela oportunidade de desenvolver as atividades do projeto e utilizar suas instalações. Em especial a toda a equipe do Laboratório de biotecnologia e recursos genéticos, pelo apoio.

Aos meus colegas de trabalho Davia, Lana, Jose Carlos, Ruani, Marlon, Marli e Suzana.

Aos meus queridos amigos, Camila, Carina, Fabrícia, Ilmarina, Orlando, Welber e Sérgio Heirtor.

Ao meu grande amigo Gilberto pela lealdade e companheirismo.

Ao Dr. Osmar Lameira pelas conversas e conselhos durante a execução do trabalho.

A amável professora Joanne, pela oportunidade do estágio de docência, amizade e contribuição para minha formação profissional

A querida amiga e Dr^a. Hérica Oliveira pela amizade, ensinamento e contribuição para a minha formação acadêmica.

Por fim, a todos que não foram citados mais que contribuíram para a realização deste trabalho, concretização de um sonho e finalização de mais uma importante etapa da minha vida.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Híbridos provenientes dos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos de pimenteira-do-reino.....	25
Tabela 2. Combinações utilizadas no experimento preliminar para a diferenciação de gemas e brotos de híbridos de pimenteira-do-reino, em meio básico MS com diferentes combinações de BAP e TDZ.....	27
Tabela 3. Combinações de citocininas empregados na etapa de multiplicação <i>in vitro</i> de híbridos de pimenteira-do-reino ao meio de cultura MS suplementado com 30 g.L ⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L ⁻¹ de phytigel.....	28
Tabela 4. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto (cm) do primeiro subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	31
Tabela 5. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação <i>in vitro</i> de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.....	32
Tabela 6. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do segundo subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	33
Tabela 7. Teste de comparação de média do segundo subcultivo quanto a proliferação <i>in vitro</i> de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.....	34
Tabela 8. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto (cm) do terceiro subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo <i>in vitro</i>	35
Tabela 9. Teste de comparação de média do terceiro subcultivo quanto a proliferação <i>in vitro</i> de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.....	36

Tabela 10. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto (cm) do quarto subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.....37

Tabela 11. Teste de comparação de média do quarto subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.....38

Tabela 12. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto (cm) do quinto subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.....39

Tabela 13. Teste de comparação de média do quinto subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.....40

Tabela 14. Híbridos provenientes dos cruzamentos intraespecífico e interespecífico de pimenteira do reino.....61

Tabela 15. Tratamentos empregados na etapa de enraizamento *in vitro* de quatro híbridos de pimenteira-do-reino.....62

Tabela 16. Valores de F segundo análises de variância das médias de número de raiz, comprimento de raiz, e comprimento da plântula de híbridos de pimenta do reino após enraizamento *in vitro* com diferentes concentrações de auxinas adicionada ao meio de cultura MS.....66

Tabela 17. Teste de comparação de média quanto à diferenciação de raízes em meio básico MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIB, AIA e ANA após 28 dias de cultivo.....68

Tabela 18. Teste de comparação de média quanto ao comprimento da plântula em meio básico MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIB, AIA e ANA após 28 dias de cultivo.....69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas desenvolvidas para o estabelecimento das melhores condições de cultivo <i>in vitro</i> de híbridos de pimenteira do reino	24
Figura 2. Broto estabilizado <i>in vitro</i> (a), ápice caulinar com uma folha(b)	26
Figura 3. Explante em meio de multiplicação para o primeiro subcultivo (a), micropropagação de segmentos nodais de híbridos de pimenta do reino (b)	28
Figura 4. Aspectos qualitativos observados durante o cultivo <i>in vitro</i> de brotos de pimenteira-do-reino ao serem submetidos ao meio MS com diferentes combinações de TDZ e BAP	30
Figura 5. Anormalidades em brotos provenientes de meio de cultura com adição de BAP+TDZ, folhas grandes e retorcidas(a), calos na superfície abaxial da folha(b), e entre nó curto(c)	41
Figura 6. Número de gemas por explante de diferentes híbridos de pimenta do reino em meio de cultura com combinações de 0,5mg.L ⁻¹ BAP + 0,25µM TDZ e 0,5mg.L ⁻¹ BAP em cinco subcultivos com intervalos de 42 dias cada. Lote 7- (a); Lote 9 –(b); Lote15 – (c); Lote21- (d)	42
Figura 7. Número de brotos por explante de diferentes híbridos de pimenta do reino em meio de cultura com combinações de 0,5mg.L ⁻¹ BAP + 0,25µM TDZ e 0,5mg.L ⁻¹ BAP em cinco subcultivos com intervalos de 42 dias cada. Lote 7- (a); Lote 9 –(b); Lote15 – (c); Lote21- (d)	43
Figura 8. Etapas desenvolvidas para o estabelecimento das melhores condições de cultivo de híbridos de pimenteira do reino	60
Figura 9. brotos de híbridos de pimenta do reino cultivados em meio MS com adição da auxina AIA	64
Figura 10. Percentual de brotos enraizados de híbridos intra e interespecíficos de pimenta do reino cultivados <i>in vitro</i> por 28 dias em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIB, AIA e ANA	65
Figura 11. brotos de híbridos de pimenta do reino cultivados em meio MS com adição da auxina AIB - a , AIA – b , ANA – c e controle – d	67

Figura 12. Aclimatização de brotos enraizados de híbridos de pimenteira do reino	70
Figura 13. Percentual de taxa de sobrevivência de brotos enraizados de híbridos intra e interespecíficos de pimenta do reino provenientes de meios de enraizamento com diferentes concentrações das auxinas AIB, AIA e ANA, aclimatizados <i>ex vitro</i> por 28 dias em casa de vegetação	71
Figura 14. Formação de mudas de plantas aclimatizadas de híbridos de pimenteira-do-reino	72

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	14
1.1 REFERÊNCIAS	17
2. MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE HÍBRIDOS DE <i>Piper nigrum</i> L. SUBMETIDOS A DIFERENTES FONTES DE CITOCININAS	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Material Vegetal.....	24
2.2.2 Estabilidade fisiológica dos explantes.....	25
2.2.3 Experimento preliminar.....	25
2.2.4 Multiplicação <i>in vitro</i>	27
2.3 Resultados	29
2.3.1 Experimento preliminar.....	29
2.3.2 Multiplicação.....	30
2.4 Discussão	45
2.5 Conclusão	49
2.6 REFERÊNCIAS	50
3. ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE BROTO COM AUXINAS, ACLIATIZAÇÃO E FORMAÇÃO DE MUDAS DE HÍBRIDOS INTRA E INTERESPECÍFICOS DE <i>Piper nigrum</i> L.	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e Métodos.....	60
3.2.1 Enraizamento <i>in vitro</i> de híbridos de <i>Piper nigrum</i> L.....	60
3.2.2 Aclimatização de brotos de híbridos de <i>Piper nigrum</i> L.....	62

3.2.3 Formação de mudas de híbrido de <i>Piper nigrum</i> L.....	63
3.3 Resultados	64
3.3.1 Enraizamento <i>in vitro</i> de híbridos de <i>Piper nigrum</i> L.....	64
3.3.2 Aclimatização de brotos enraizados de híbridos de <i>Piper nigrum</i> L.....	69
3.3.3 Formação de mudas de híbrido de <i>Piper nigrum</i> L.....	72
3.4 Discussão	73
3.5 Conclusões.....	77
3.6 REFERÊNCIAS	78

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O Brasil figura entre os maiores produtores de pimenta-do-reino com uma produção de 41.958 toneladas/ano. No Brasil os principais estados produtores são Pará, Espírito Santo, Bahia e Paraíba (IBGE, 2014). Mais de 70% da pimenta-do-reino brasileira é originária do estado do Pará, que ocupa quase 100% da produção da região norte, o que indica forte participação do estado na movimentação comercial desse produto (LOURINHO, 2014).

Na pipericultura no período referente a 1990-2011, a produção brasileira apresentou queda de 42,92% segundo dados da FAO (2014), um dos fatores que contribuíram foi a ocorrência de doenças como a fusariose, causado pelo fungo

Fusarium solani f. sp. *piperis*, principal doença da cultura; murcha amarela causada pelo *Fusarium oxysporum* e as provocadas pelos vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Piper yellow mottle virus* (PYMoV), que ocorrem em vários acessos e cultivares de pimenteira-do-reino afetando a produção (ALBUQUERQUE *et al.*, 1999) da espécie.

No Brasil a expansão da cultura da pimenteira-do-reino vem sendo limitada, pois, embora haja disponibilidade de materiais de diferentes origens no Banco de Germoplasma de pimenta-do-reino da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, a variabilidade genética entre esses materiais é muito estreita e todos os acessos têm apresentado susceptibilidade à doença fusariose. A dificuldade de introduzir material genético do centro de origem dessa cultura dificulta a obtenção de fontes de resistência, além de ainda não ter sido documentada a doença no centro de origem da cultura (LEMONS 2011).

Considera-se que a solução é a obtenção de novas cultivares que sejam resistentes e/ou tolerantes às doenças, além de serem produtivas, para que o Brasil continue a concorrer no mercado internacional (ALBUQUERQUE E FERRAZ, 1976; ALBUQUERQUE e DUARTE, 1991).

Atualmente, o programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Oriental tem por fim, à obtenção de híbridos intraespecíficos provenientes de polinizações controladas, entre genótipos da espécie *P. nigrum*, para obtenção de combinações que expressem caracteres produtivos superiores aos pais (vigor híbrido) e cultivares resistente a murcha amarela, tolerância à seca e adaptação ao cultivo em tutor vivo. As

cultivares de *P. nigrum* utilizadas nesse processo são Cingapura, Guajarina, Bragantina, Apra, Kuthiravally, Kottanadan e Iaçará (LEMOS, 2011).

Também estão sendo realizados trabalhos visando à obtenção de híbridos interespecíficos, considerando que algumas espécies de *Piper* nativas apresentam resistência ao fungo causador da fusariose (POLTRONIERI et al., 2000). O programa está testando as combinações de cultivares de *Piper nigrum* com espécies de *Piper* sp nativas para avaliar a compatibilidade e a viabilidade de produção de híbridos férteis com características de produção de *P. nigrum* e apresentando resistência ao *Fusarium* como algumas *Piper* sp nativas (LEMOS, 2011).

Para a propagação em escala comercial da cultura é largamente utilizado o método de propagação vegetativa por estacas, no entanto quando não realizado adequadamente favorece a disseminação de doenças, além de estar associada à vulnerabilidade genética, por se tratar de homogeneidade genética a partir de um único clone, e permitir a produção de apenas de 20 a 40 estacas enraizadas por planta/ano (MILANEZ et al., 1987).

É possível também a propagação via sementes, mas esta é adotada basicamente em programas de melhoramento, pois a viabilidade da semente é perdida rapidamente após 40-50 dias de armazenamento (NAMBIAR et al., 1978), além da frutificação ser irregular e tardia (COSTA et al., 2005).

Além desses métodos de propagação, o método via micropropagação é uma alternativa viável, pois permite aperfeiçoar a interação entre fatores nutricionais, luminosos, de temperatura e hormonais, e clonagem rápida de plantas geneticamente superiores selecionadas, com qualidade fitossanitária, sadias, vigorosas e, que podem ser multiplicadas massivamente em diferentes períodos do ano e em curto prazo (ALTMAN, 2007; OLIVEIRA, 2010; DAGLA, 2012).

Em pimenta-do-reino, a micropropagação vem sendo alvo de estudos, na década de 80 a técnica foi aplicada e observou-se que ápices caulinares provenientes de plântulas *in vitro* diferenciarem múltiplas brotações e enraizarem (MATHEWS E RAO, 1984; KHOON E TALIB, 1985).

Philip et al. (1992) trabalhando com propagação *in vitro* de pimenteira do reino estimou uma produção de 15.000 plantas a partir de um explante por ano, uma superprodução quando comparada com a propagação vegetativa via estaca.

De acordo com Lemos (2003), em estudo de mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), o processo de

micropropagação é viável através da obtenção de plantas fornecedoras de explantes, obtidas a partir de estacas em casa-de-vegetação,

Segundo Moura *et al.* (2008) trabalhando com ápices caulinares da pimenteira-do-reino cv. “Bragantina” houve respostas à baixa concentração de BAP, para promover tanto a formação de brotos, quanto na obtenção de explantes no cultivo *in vitro*.

Estudos realizados por Santos (2012) ao avaliar a ontogênese, a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização de cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos, notou que adição de BAP no meio de cultura apresentou respostas eficientes para obtenção de gemas e promoveu o enraizamento *in vitro* com aspectos desejáveis para aclimatização em meio ½ MS.

Entretanto, é possível ocorrer especificidade genotípica no comportamento *in vitro*, daí faz-se necessário determinar as condições ideais de multiplicação para cada genótipo, neste contexto, os reguladores de crescimento são fundamentais para o sucesso da micropropagação.

Variações na taxa de regeneração atribuídas a diferentes genótipos são citadas para várias espécies micropropagadas, como é o caso da bananeira (MENDES *et al.*, 1996). Muitos trabalhos têm sido realizados na etapa de enraizamento *in vitro* mostrando que fatores genéticos estão ligados direta ou indiretamente à capacidade de determinadas espécies formarem ou não raízes adventícias (ASSIS E TEIXEIRA, 1998; SYROS *et al.*, 2004).

De acordo com o exposto, será testada as seguintes hipóteses: 1- Há diferença na taxa de multiplicação *in vitro* de diferentes híbridos de pimenta do reino em resposta ao meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) com adição de diferentes citocininas em cinco subcultivos; 2- Existe influência do tipo e da concentração de auxinas adicionadas em meio contendo a metade da concentração de sais de MS na diferenciação e desenvolvimento de raízes *in vitro* para os híbridos em estudos; 3- A composição do meio de enraizamento e os diversos híbridos interferem na taxa de sobrevivência na etapa de aclimatização e formação de mudas de diferentes híbridos de pimenteira-do-reino em estudo.

O objetivo do trabalho é estudar a micropopagação para promover a regeneração de plantas de diferentes híbridos de pimenteira-do reino.

1.1 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F.C. de; FERRAZ, S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematocoeae* f. sp. piperis e sua patogenicidade a pimenta-do-reino. **Experimentiae**, v.22, p.133-151, 1976.

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-CPATU. **Documentos** 59, p. 40, 1991.

ALBUQUERQUE, F. C.; TRINDADE, D.; R.es; POLTRONIERI, L. S.; DUARTE, M. L. R.; BRIOSO, P. S. T.; REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Evidências preliminares da ocorrência do vírus do mosqueado da pimenteira-do-reino (*Piper yellow mottle virus* - PYMoV) no Brasil. In: **XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Jaboticabal. Summa Phytopathologica**, 25, p. 36-36. 1999.

ALTMAN, A.; TREVOR, THORPE A. **Plant tissue culture and biotechnology: perspectives in the history of IAPTC/IAPTC&B/IAPB**. Fonte: IAPB 2014. Org/About/History, 2007.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.261-96.

COSTA, R. S. C. da.; NASCENTE, A. S.; NUNES, A. M. L.; FERREIRA, M. das G. R.; MEDEIROS, I. M. de. **Cultivo da Pimenta-do-reino em Rondônia**. Embrapa Amazônia Oriental, Sistema de produção 4, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/CultivoPimentadoReinoRO/mudas.htm>>. Acesso em: 22 setembro 2014.

DAGLA, H.R. 2012. Cultura de Tecidos de Plantas. *Ressonância*, 17 (8) ,759-767. 2012

KHOON, C.B.; TALIB, S.S. Effects of naphthalene acetic acid and two phenolic substances on rooting of pepper shoots cultures *in vitro*. **MARDI Research Bulletin**, v.13, n.1, p.108-110, 1985.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. **Statistical Databases**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat> acesso em 13 setembro 2014

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: Sistema de recuperação automática** – **SIDRA**. 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=1&i=P>. Acesso em: 18 de outubro de 2014.

LEMOS, O. F. de. **Mutagênese *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese de doutorado. Piracicaba - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 191p. 2003.

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

LOURINHO, M. P.; Costa, C. A. S. da.; Souza, L. C. de.; Souza, L. C. de.; Neto, C. F. O. Conjuntura da pimenta-do-reino no mercado nacional e na região norte do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p.1016, 2014.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Brazil country paper presented on the 35th Session of the International Pepper Community, held at Kuala Lumpur, Malaysia from 29 October, to 02 November 2007. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. **MAPA/SDA/DIPOV/CGQV**, 2007.

MATHEWS, M. H.; RAO, P. S. In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Current Science**, v. 53, n.4, p. 183-186, 1984

MENDES, B.M.J.; MENDES, F.J.; TULMANN NETO, A.; DEMETRIO, C.G.B.; PUSKE, O.R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.12, p.863-867, dez. 1996.

MILANEZ, D. et al. **Cultura de pimenta-do-reino**. Vitória, ES: EMCAPA, 1987. 94p. (EMCAPA, Documentos, 33).

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. de. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, jan-fev, 2008.

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

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

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

POLTRONIERI, M. C.; ALBUQUERQUE, F. C.; OLIVEIRA, M. R. C. Retrospectivas, avanços e perspectivas no melhoramento genético de pimenta-do-reino visando resistência à fusariose. **Fitopatologia Brasileira**, 25 Suplemento: p. 246-248, 2000.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>> Acesso em: 07 de outubro de 2014.

PHILIP, V.J.; JOSEPH, D.; TRIGGS, G.S.; DICKINSON, N.M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, v.12, p.42-44, 1992

SANTOS, L.R.R. **Ontogênese, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.

SYROS, T. et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.69-77, 2004.

2. MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE HÍBRIDOS DE *Piper nigrum* L. SUBMETIDOS A DIFERENTES FONTES DE CITOCININAS

RESUMO

A pimenteira-do-reino, denominada *Piper nigrum* L., produz fruto de grande valor econômico mundial no ramo das especiarias. A forma de propagação comercial é vegetativa via estacas com baixa produção de mudas por planta/ano, mas através da micropropagação é possível obter um grande número de mudas de qualidade e em curto prazo. Neste processo, entre os fatores que promovem a morfogênese *in vitro*, as citocininas merecem destaque, pois influenciam na diferenciação de gemas e no crescimento das brotações. Portanto, neste trabalho, o objetivo foi estudar os efeitos de diferentes combinações de citocininas (6-benzilaminopurina e Thidiazuron) no meio de cultura sobre a multiplicação *in vitro* de híbridos intra e interespecíficos de pimenteira-do-reino e a interação citocinina x híbridos, em cinco subcultivos. O meio básico de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) foi utilizado, com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel e suplementado com combinações de 0,5 mg.L⁻¹ BAP e 0,0 e 0,25 µM TDZ. O cultivo foi realizado em condições controladas de sala de crescimento por seis semanas para cada subcultivo e avaliados quanto ao número de gemas e brotos por explante e comprimento de brotos, cujos dados foram analisados estatisticamente. Na ausência de TDZ, o BAP induziu maior número de gemas e brotações por explante, na maioria dos subcultivos, tendo promovido a formação de brotos de maior comprimento e em geral com características morfofisiológicas normais. Os híbridos apresentaram diferentes respostas na diferenciação de brotos *in vitro*, o que sugere influência genotípica. Os subcultivos sucessivos diminuíram a capacidade de multiplicação dos genótipos. O meio de cultura 1/2 MS com apenas o uso de BAP a 0,5 mg.L⁻¹ é favorável à diferenciação e multiplicação de brotos em pimenteira-do-reino e há resposta diferenciada entre genótipos.

Termos para indexação: pimenta-do-reino, micropropagação, subcultivos.

ABSTRACT

The black pepper plant (*Piper nigrum* L.) produces a fruit of great worldwide value in the field of spices. The commercial propagation method is by cuttings, with low seedling production of plant/year. However, it is possible to have a great number of quality seedlings in a short period through micropropagation. In this process, among the factors that affect the *in vitro* morphogenesis, the cytokinins must be highlighted because of their influence on bud differentiation and on bud growth. Therefore, the aim of this work was to study the effect of different cytokinins combinations (6-benzylaminopurine and thiadizuron) in the culture medium over the *in vitro* multiplication of intra- and interspecific black pepper hybrids, and the interaction cytokinin x hybrids, in five subculturings. The basal MS medium (MURASHIGE E SKOOG, 1962) was applied, with 30 g.L⁻¹ sucrose, solidified with 2 g.L⁻¹ Phytigel and supplemented with combinations of 0.5 mg.L⁻¹ BAP and 0.0 or 0.25 µM TDZ. The culturing was conducted under controlled conditions of the growth room, for six weeks per subculture, and each of them was evaluated by the number of buds and shoots per explant, and by the shoots length. Data were statistically analyzed. The results showed that in the absence of TDZ, BAP induced a greater number of buds and shoots per explant in the majority of subcultures, having promoted the shoot formation of greater length and generally with normal morpho-physiological characteristics. The hybrids presented different responses in *in vitro* shoot differentiation, suggesting a genotypic influence. The successive subcultures reduced the multiplication capacity of the genotypes. The ½ MS medium containing only 0.5 mg.L⁻¹ BAP is favorable to the differentiation and multiplication of black pepper shoots and there is varied response between genotypes.

Index terms: black pepper, micropropagation, subcultures.

2.1 INTRODUÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta originária da Índia, pertence à família Piperaceae e ao gênero *Piper*, o qual apresenta várias espécies. Dentre essas espécies, a espécie *Piper nigrum* é a mais importante comercialmente uma vez que seu fruto é largamente utilizado como condimento na culinária em todo o mundo além de empregados nas indústrias cosméticas e farmacêuticas (SZALLASI, 2005 ;RODRIGUES E SILVA, 2010; PRABHAKARAN NAIR, 2011;). Segundo IBGE 2014, o Brasil é o quarto maior produtor de pimenta-do-reino, sendo o estado do Pará o primeiro no ranque nacional.

O método de propagação comercial de pimenteira-do-reino mais utilizado é vegetativa por estaquia, que se não praticado corretamente favorece a disseminação de doenças como fusariose, murcha amarela e viroses, sendo a fusariose a principal doença da cultura, capaz de reduzir o ciclo produtivo da cultura de 15 a 20 anos para menos de 8 anos (LEMOS *et al.*, 2011). Além disso, a estaquia permite a propagação de apenas 50 plantas em um ano e apenas a partir de plantas com dois anos de idade (MILANEZ *et al.*, 1987).

A técnica de micropropagação tem um forte impacto sobre a produção de plantas com qualidade fitossanitária e em larga escala, e protocolos foram estabelecidos visando à produção comercial de mudas para varias espécies vegetais (FLORES, 2006; MARTINS, 2011; CARVALHO, 2013), pois possui a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora, desde que as exigências nutricionais, hormonais e ambientais sejam satisfatórias, por isso vem se mostrando uma alternativa viável como método de propagação.

Uma das fundamentais etapas que constituem o processo de micropropagação é a multiplicação de brotos que tem por objetivo a maximização da multiplicação de gemas e brotos que em geral é otimizado com a adição de diferentes citocininas, isoladas ou associadas a auxinas, ao meio de cultura (ROGALSKI *et al.*, 2003).

As citocininas são essenciais à citocinese, atuando na divisão celular, estão ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares uma vez que tendem a promover a quebra da dominância apical (OLIVEIRA *et al.*, 2007; KERBAUY, 2008).

O 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina que proporciona, em geral, os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de diversas espécies (SANTOS *et al.*,

2006, SOARES et al., 2011) dentre as quais, a pimenteira-do-reino (MOURA *et al* 2008; SANTOS, 2012). Há uso também do Thidiazuron (TDZ) que surgiu como um regulador altamente eficaz em culturas de tecidos para um conjunto diversificado de espécies, que se estende desde gramíneas e herbáceas até espécies lenhosas, segundo Curti (2011).

Estudos adicionam as auxinas em conjunto com citocininas ao meio de cultura com o intuito de promover o aumento do comprimento dos brotos, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (ROCHA *et al.*, 2009)

De acordo com Peres (2002), o efeito diferencial dos vários tipos de reguladores de crescimento, quando aplicados ao meio de cultura, pode estar relacionado ao fato de cada um interferir de modo particular no metabolismo hormonal endógeno e à especificidade genotípica da cultura em estudo.

Diante do exposto, esse trabalho objetivou avaliar os efeitos de diferentes combinações das citocininas BAP e TDZ ao meio de cultura sobre a multiplicação *in vitro* de híbridos intra e interespecíficos de pimenteira-do-reino e a interação das combinações de citocinina e híbridos em cinco subcultivos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Foram avaliadas as condições de cultivo *in vitro* na multiplicação de híbridos intra e interespecíficos de *Piper nigrum* L. (Figura 1).



Figura 1. Etapas desenvolvidas para o estabelecimento das melhores condições de cultivo *in vitro* de híbridos de pimenteira do reino.

2.2.1 Material Vegetal

Para a realização do experimento, utilizou-se como fonte de explantes plântulas de híbridos intra e interespecífico de *Piper nigrum* L, germinadas *in vitro* em meio de cultura ½ MS com 0,17 g.l⁻¹ de NH₂PO₄ por cinco semanas.

Os híbridos foram obtidos a partir de sementes provenientes de polinização controlada de cruzamentos intraespecífico entre as cultivares de *Piper nigrum* (Guajarina, Bento e Apra) e cruzamentos interespecífico entre as espécies *Piper nigrum* e *Piper arboreum* de pimenteira-do-reino, os quais promoveram a formação de diferentes híbridos designados Lote, como descrito na Tabela 1. Todo material utilizado pertence ao Banco Ativo de Germoplasma – BAG da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

Tabela 1. Híbridos provenientes dos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos de pimenteira do reino.

Cruzamentos		Híbridos
Bento x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 7
Apra x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 15
Bento x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 21
Guajarina x Piper arboreum	Interespecíficos	Lote 9

2.2.2 Estabilidade fisiológica dos explantes

Broto de híbridos intra e interespecífico foram estabilizados fisiologicamente a partir de explantes de segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm provenientes de brotos já estabelecidos *in vitro*, que em câmara de fluxo laminar foram inoculados em frascos de vidro cilíndricos com capacidade de 300 ml, contendo 40 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), adicionados de 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,2 mg L⁻¹ de ácido indolacético (IAA) e pH ajustado para 5,8.

O cultivo foi realizado por quatro semanas em condições de fotoperíodo de 16h.luz.dia⁻¹, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25±3 °C.

Esta etapa foi realizada com o intuito de uniformizar o material vegetal nas mesmas condições de cultivo e no mesmo estágio de desenvolvimento vegetativo.

2.2.3 Experimento preliminar

A partir de brotos estabilizados fisiologicamente (Figura 2a) foram excisados explantes, ápices caulinares contendo uma folha (Figura 2b), e inoculados em condições assépticas em tubos de ensaio de vidro de 25 x 150 mm, contendo 15 ml de meio de cultura básico MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) suplementados com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel e complementado com diferentes combinações de reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) (Tabela 2). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada por 20 minutos a 121 °C e 1,5 atm de pressão. Os explantes foram mantidos sob

condições de fotoperíodo de 16h.luz.dia⁻¹, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25±3 °C

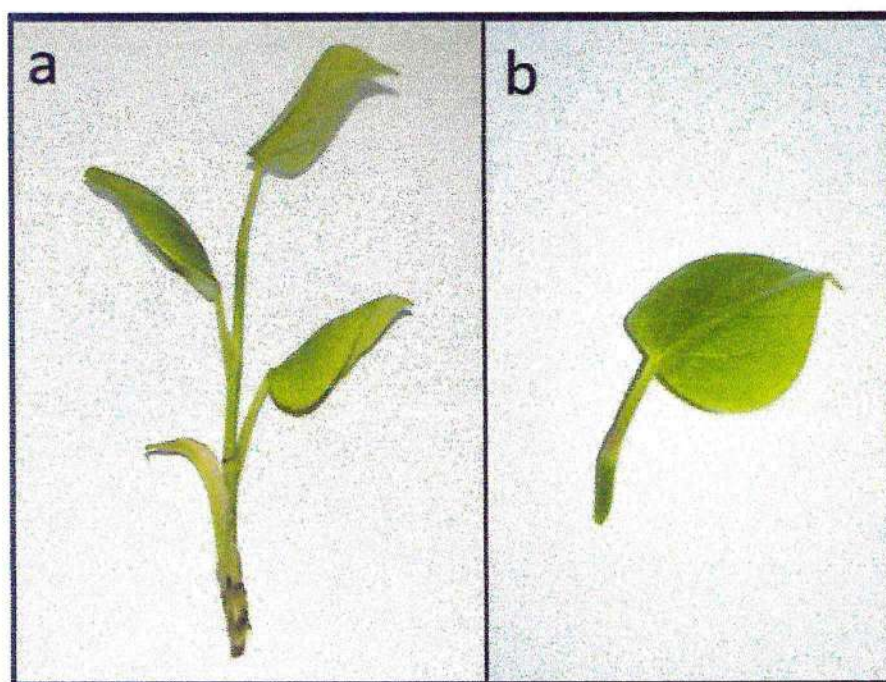


Figura 2. Broto estabilizado *in vitro* (a), ápice caulinar com uma folha (b)

Foram testados quatro híbridos e onze combinações de reguladores de crescimento (Tabela 2) em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 X 11, totalizando 44 interações, sendo cada tratamento composto de 5 repetições, e cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um explante.

Após seis semanas de cultivo foram feitas avaliações qualitativas quanto a diferenciação e desenvolvimento de brotos de híbridos de pimenteira-do-reino com o intuito de selecionar os tratamentos que melhor regeneraram brotos para a partir de então dar início aos subcultivos.

Tabela 2 . Combinações utilizadas no experimento preliminar para a diferenciação de gemas e brotos de híbridos de pimenta do reino, em meio básico MS com diferentes combinações de BAP e TDZ.

COMBINAÇÕES DE CITOCININAS	
BAP (mg.L ⁻¹)	TDZ (μM)
0,5	0,00
0,5	0,25
0,5	0,50
0,5	1,00
0,5	2,00
0,5	4,00
0	0,25
0	0,50
0	1,00
0	2,00
0	4,00

2.2.4 Multiplicação *in vitro*

O meio de cultura de multiplicação utilizado nessa etapa de proliferação e multiplicação de brotos para a realização dos subcultivos de acordo com os estudos preliminares foi o MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel e complementado com combinações de 6-benzilaminopurina na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ e Tidiazuron nas concentrações de 0,0 e 0,25 μM (Tabela 3). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada por 20 minutos a 121 °C e 1,5 atm de pressão. As condições de cultivo foi fotoperíodo de 16h.luz.dia⁻¹, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25±3 °C.

Tabela 3. Combinações de citocininas empregados na etapa de multiplicação *in vitro* de híbridos de pimenteira-do-reino ao meio de cultura MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytagel

BAP(mg. L ⁻¹)	TDZ(μM)	Combinação citocinina
0,5	0,0	C1
0,5	0,25	C2

Para a realização do primeiro subcultivo foi considerado o cultivo dos brotos do experimento preliminar dos tratamentos selecionados (Tabela 3), onde ápices caulinares com uma folha foram inoculados em tubos de ensaio de vidro contendo 15 ml do meio de cultura de multiplicação (Figura 3a). Para os subcultivos posteriores, os explantes foram inoculados em frasco cilíndrico com capacidade de 300 ml contendo 40 ml de meio de multiplicação, contendo de dois a cinco explantes cada (Figura 3b).

Após seis semanas de cultivo *in vitro* no meio de multiplicação, realizou-se o primeiro subcultivo onde os brotos foram seccionados em condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de pinças e bisturi para a separação dos segmentos nodais apicais e axilares para gerar os subcultivos subsequentes

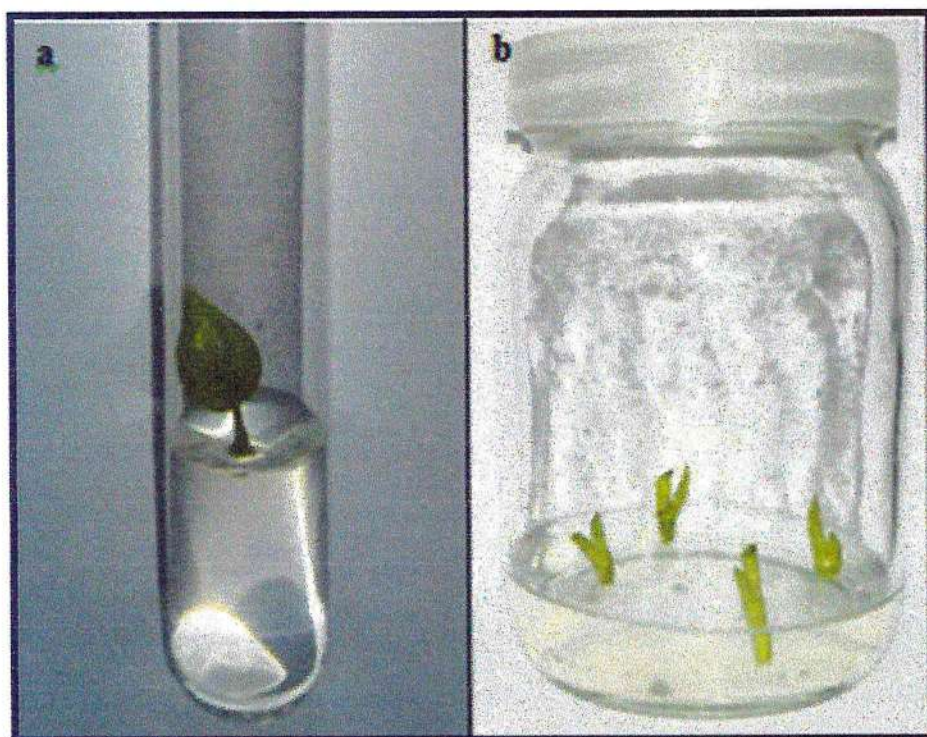


Figura 3. Explante em meio de multiplicação para o primeiro subcultivo (a), micropropagação de segmentos nodais de híbridos de pimenta do reino (b).

No total foram realizados cinco subcultivos todos em intervalos de seis semanas, inoculando os explantes caulinares no mesmo meio de cultura anterior.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2, num total de 8 tratamentos, com quatro híbridos e duas combinações de citocininas (BAP e TDZ), sendo cada tratamento composto de cinco repetições e cada repetição representada por um tubo de ensaio contendo uma gema apical no primeiro subcultivo e nos subcultivos subsequentes, cada repetição constituída de um frasco cilíndrico contendo de 2 a 5 explantes. Os dados foram submetidos à análise da variância com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA E AZEVEDO, 2009), e quando possível, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Realizou-se regressão polinomial das variáveis gemas e brotos por explante para o fator subcultivos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 EXPERIMENTO PRELIMINAR

A avaliação qualitativa da diferenciação e desenvolvimento de brotos de híbridos intra e interespecífico de pimenteira-do-reino, cultivados em meio de cultura MS suplementado com as combinações de thidiazuron (TDZ) nas concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 4,00 μM e de 6-benzilaminopurina (BAP) a 0 e 0,5 mg L^{-1} após seis semanas de cultivo *in vitro*, revelou que a maioria das combinações das citocininas utilizadas gerou brotações com características morfológicas indesejáveis, destacando-se os meios em que se adicionou 0,5 mg L^{-1} BAP + 0,50 μM TDZ; 0,5 mg L^{-1} BAP + 1,00 μM TDZ; 0,5 mg L^{-1} BAP + 2,00 μM TDZ; 0,5 mg L^{-1} BAP + 4,00 μM TDZ; 0,25 μM TDZ; 0,50 μM TDZ; 1,00 μM TDZ; 2,00 μM TDZ e 4,00 μM TDZ. Nessas combinações exibiam presença intensa de calo na região da base cortada (Figura 4 **a** e **b**) e nas regiões que se localizavam as gemas (Figura 4**b**), desenvolveram pouco ou nenhuma formação da parte aérea e quando esta se desenvolveu apresentava folhas grandes (Figura 4 **c**) ou mal formada (Figura 4 **d** ; **e**) e aspectos de vitrificação (Figura 4 **e**).

As características indesejáveis provenientes do meio de cultura adicionados com as combinações de citocininas supracitadas inviabilizaram a multiplicação *in vitro* de brotos, revelando que tais meios não são recomendados para ser utilizados nesta fase.

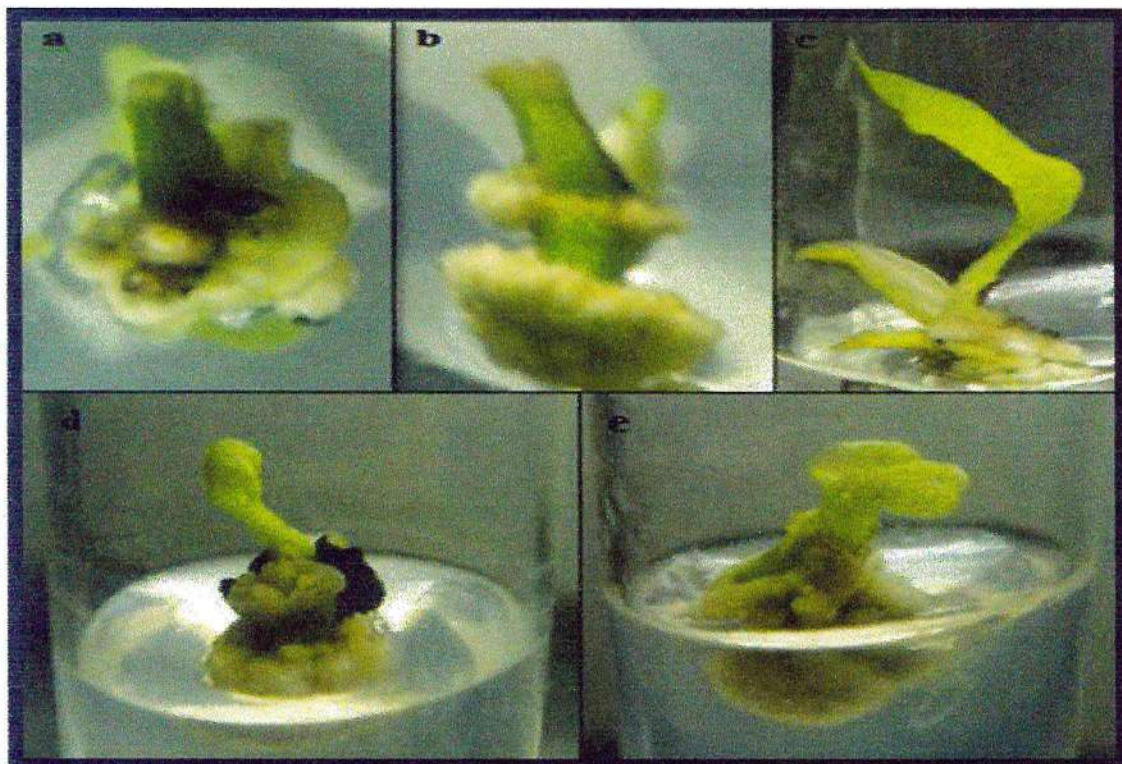


Figura 4. Aspectos qualitativos observados durante o cultivo *in vitro* de brotos de pimenta-do-reino ao serem submetidos ao meio MS com diferentes combinações de TDZ e BAP.

Porém com os resultados qualitativos obtidos no experimento preliminar observou-se que nas concentrações de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,25 \mu\text{M}$ de TDZ, os brotos exibiram adequada formação da parte aérea com formação de novas gemas e lançamentos de folhas novas.

2.3.2 MULTIPLICAÇÃO

A análise de variância para número de gemas e brotos por explante e comprimento médio do broto, para interação entre híbridos e combinações de citocininas no primeiro subcultivo de híbridos intra e interespecíficos de pimenta-do-reino, revelaram para a variável gema diferenças estatísticas apenas para o fator combinações de citocininas (F2) ao nível de 5% de probabilidade; para as variáveis broto e comprimento do broto houveram diferenças estatísticas significativas apenas

para o fator Híbridos (F1) sendo essas diferenças ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 4) .

Tabela 4. Análise de variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do primeiro subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Híbrido(F1)	3	0.9666	2.3395	0.7249	2.6667 ns	8.1377 **	7.3224 **
Comb. Citoc.(F2)	1	2.5000	0.7562	0.0902	6.8966 *	2.6304 ns	0.9116 ns
F1 X F2	3	0.3000	0.2895	0.1049	0.8276 ns	1.0072 ns	1.0598 ns
Tratamento	7	0.9000	1.2348	0.3685			
Resíduo	32	0.3625	0.2875	0.0990			

I - Gema; MG = 2.55000; CV% = 23.61

II Broto; MG = 1.81250; CV% = 29.58

III - Comprimento do broto; MG = 1.56750; CV% = 20.07

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

Considerando a variância no primeiro subcultivo significativa para combinações de citocininas na indução de gemas e híbrido para diferenciação de brotos e comprimento de broto realizou-se a comparação das médias pelo Teste Tukey.

Quando se avaliou o número de brotações entre híbridos, o lote 15 mostrou-se superior com média de 2,500 quando comparado com os demais híbridos, quanto as combinações de citocininas as médias não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 5).

Diferenças estatísticas para a variável comprimento do broto foram observadas apenas entre híbridos, no qual o lote 15 novamente se destacou apresentando maior média de comprimento de broto (1,900) que não diferiu do lote 21 (1,670) (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de comparação de média do primeiro subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.

Híbrido (Lote)	Gemas/ explante		Brotos/explante		Comprimento de broto (cm)	
	C1 ²	C2 ³	Média ¹	C1	C2	Média ¹
7	2,600	2,800	2,700a	1,600	2,000	1,800b
9	2,200	2,600	2,400a	1,300	1,600	1,450b
15	2,400	3,400	2,900a	2,200	2,800	2,500a
21	2,000	2,400	2,200a	1,600	1,400	1,500b
Média	2,300B	2,800A		1,750A	1,950A	
		cv=23,61; dms=0,729		cv=29,58; dms=0,649		cv=20,07; dms=0,381

¹Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúscula na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

² Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,00µM TDZ

³ Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,25 µM TDZ

A análise de variância do segundo subcultivo revelou que houve efeito de genótipos para as variáveis broto e comprimento do broto e que houve interação entre híbridos e citocininas para as variáveis gema e brotos (Tabela 6).

Tabela 6. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do segundo subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Híbrido(F1)	3	0.69358	0.81667	1.12967	2.6210 ns	3.3097 *	5.5512 **
Comb. Citoc.(F2)	1	0.04225	0.06400	0.14400	0.1597 ns	0.2594 ns	0.7076 ns
F1 X F2	3	1.13558	0.88867	0.18867	4.2913 *	3.6015 *	0.9271 ns
Tratamento	7	0.78996	0.74000	0.58557			
Resíduo	32	0.26463	0.24675	0.20350			

I - Gema; MG = 3.15750; CV% = 16.29

II Broto; MG = 2.41000; CV% = 20.61

III - Comprimento do broto; MG = 1.73500; CV% = 26.00

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

No segundo subcultivo, a média da quantidade de gemas acumulados por explante dos híbridos em estudo não se mostrou desigual estatisticamente para os fatores Híbridos e Combinação de citocininas. Diferenças significativas foram observadas apenas na interação (F1 X F2), cujo no lote 9 a combinação com 0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,00 µM TDZ (C1) mostrou-se superior e diferente estatisticamente da combinação C2 com média 3,440 e 2,600 respectivamente, e dentro da combinação C1 o lote 15 apresentou maior média de gemas por explante e não diferiu estatisticamente dos lotes 7 e 9, mas diferiu do lote 21(Tabela 7).

Para a formação de brotos ocorreram diferenças estatísticas significativas para o fator híbrido sendo a maior média pertencente ao lote 15 (2,830) que não diferiu dos lotes 21 e 7 e diferiu do lote 9 que apresentou média de 2,190, para a interação (F1XF2) o meio com de adição de 0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,00 µM TDZ apresentou diferenças significativas entre híbridos destacando-se o lote 15, com média de 3,200 brotos/explante. O mesmo lote apresentou diferenças significativas entre combinações de citocininas cuja a maior média foi 3,200 brotos/explante obtida no meio com 0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,00 µM TDZ (Tabela7).

O lote 15 apresentou maior comprimento do broto com média de 2,230 cm. E as combinações de citocininas respondem semelhantemente entre si. (Tabela 7).

Tabela 7. Teste de comparação de média do segundo subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.

Híbrido	Gemas/ explante		Brotos/explante		Comprimento de broto (cm)			
	C1 ²	C2 ³	Média ¹		C1	C2	Média ¹	
7	3,100abA	3,460aA	3,280a	2,040Ba	2,600aA	2,320ab	1,740	1,500
9	3,440abA	2,600aB	3,020a	2,180bA	2,200aA	2,190b	1,480	1,740
15	3,660aA	3,26aA	3,460a	3,200aA	2,460aB	2,830a	2,420	2,040
21	2,560bA	3,180aA	2,870a	2,060bA	2,540aA	2,300ab	1,540	1,420
Média	3,190A	3,125A		2,370A	2,450A		1,795A	1,675A
cv=16,29; dms=0,623				cv=20,61; dms=0,60		cv=26,00; dms=0,546		

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

² Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,00µM TDZ

³ Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,25 µM TDZ

A análise de variância do terceiro subcultivo mostrou diferenças significativas na proliferação de gemas para o fator híbrido. Para a variável broto por explante apenas o efeito da interação híbrido X combinação de citocinina mostrou-se semelhante enquanto o comprimento do broto para o fator híbrido, combinação de citocinina e a interação entre os fatores apresentaram diferenças significativas (Tabela 8).

Tabela 8. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do terceiro subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Híbrido(F1)	3	2.90625	4.12198	0.64706	7.9487 **	11.1813 **	5.8795 **
Comb. Citoc.(F2)	1	0.60025	5.73806	1.11556	1.6417 ns	15.5651 **	10.1366 **
F1 X F2	3	0.55025	0.11168	0.42531	1.5050 ns	0.3029 ns	3.8646 *
Tratamento	7	1.56711	2.63415	0.61895			
Resíduo	32	0.36562	0.36865	0.11005			

I - Gema; MG = 3.09750; CV% = 19.52

II Broto; MG = 2.40875;

III - Comprimento do broto; MG = 1.78750; CV% = 18.56

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

No terceiro subcultivo a média da diferenciação de novas gemas por explante apresentou significativas diferenças apenas para o fator híbrido, sendo o lote 15 com média de 3,840 mostrando-se mais promissor e diferente estatisticamente dos demais lotes (Tabela 9).

Quanto à formação de brotos/explante houve diferença significativa entre o fator combinações de citocininas sendo o meio com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ(C1) com média 2,789 superior a combinação com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,25\ \mu\text{M}$ TDZ (C2) com média de 3,284 e dentre os híbridos a maior proliferação de brotos pertence ao lote 15 que difere estatisticamente dos demais (Tabela 9).

O comprimento médio do broto foi superior e diferente estatisticamente em meio com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ (C1) que apresentou média de 1,954 cm. O lote 15 foi mais responsivo com maior média de comprimento de broto (2,099) diferindo estatisticamente apenas do lote 9. Ocorreram também diferenças entre médias na interações (F1XF2), onde o lote 15 apresentou maior comprimento de broto (2,099), o lote 21 e a combinação com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ (C1) foi melhor com média de 2,200 brotos explantes (Tabela 9).

Tabela 9. Teste de comparação de média do terceiro subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.

Híbrido	Gemas/ explante			Brotos/explante			Comprimento do broto (cm)		
	C1 ²	C2 ³	Média ¹	C1	C2	Média ¹	C1	C2	Média ¹
7	3,140	2,920	3,030b	2,756	2,232	2,292b	1,798aA	1,844abA	1,821ab
9	2,360	2,740	2,550b	2,214	1,580	1,897b	1,660aA	1,300bA	1,480b
15	4,040	3,640	3,840a	3,760	2,808	3,284a	2,160aA	2,030aA	2,099a
21	3,340	2,600	2,970b	2,420	1,500	1,960b	2,200aA	1,300bB	1,750ab
Média	3,220A	2,970A		2,787A	2,030B		1,954A	1,620B	

cv=19,52; dms=0,732

cv=25,21; dms=0,735

cv=18,56; dms=0,402

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

² Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,00μM TDZ

³ Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,25 μM TDZ

A análise de variância do quarto subcultivo mostrou que não houve efeitos das diferentes combinações de citocininas e nem da interação para a diferenciação de novas gemas. Para variável broto/explante apenas o fator combinação de citocinina apresentou diferenças significativas e para o comprimento médio do broto não houve efeito da interação (Tabela 10).

Tabela 10. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do quarto subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Híbrido(F1)	3	2.09614	0.41502	3.55449	5.1709 **	1.6397 ns	20.2512 **
Comb. Citoc.(F2)	1	0.82944	6.50442	7.12336	2.0461 ns	25.6986 **	40.5843 **
F1 X F2	3	0.26408	0.17226	0.50090	0.6514 ns	0.6806 ns	2.8538 ns
Tratamento	7	1.13002	1.18089	2.75565			
Resíduo	32	0.40538	0.25310	0.17552			

I - Gema; MG = 3.36750; CV% = 18.91

II Broto; MG = 2.39175; CV% = 21.03

III - Comprimento do broto; MG = 2.08600; CV% = 20.08

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

No quarto subcultivo, os híbridos lote 15 e lote 21 permitiram maior diferenciação de novas gemas com médias de 4,100 e 3,060 respectivamente. As combinação de citocininas testadas não apresentaram diferenças estatísticas entre si. No entanto, para a proliferação de brotos, o fator híbrido não apresentou diferenças estatísticas, mas o fator combinação de citocininas sim, cuja comparação de médias mostrou diferença significativa e superior na combinação C1 (0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,00 µM TDZ) com média de 2,795 brotos/explante (Tabela 10).

Para o comprimento do broto a combinação C1 (com 0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,00 µM TDZ) promoveu maior média (2,508), dentre os híbridos o lote 15 apresentou o maior comprimento de brotos com média de 2,802 (Tabela 10).

Tabela 11. Teste de comparação de média do quarto subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.

Híbrido	Gemas/ explante		Brotos/explante		Comprimento do broto		
	C1 ²	C2 ³	Média ¹	C1	C2	C1	Média ¹
7	3,200	3,060	3,130b	2,798	2,028	2,680	2,177b
9	3,236	2,700	2,968b	2,502	1,930	2,288	2,014b
15	3,960	4,060	4,100A	3,260	2,082	3,502	2,802a
21	3,650	3,070	3,360ab	2,620	1906	1,562	1,351c
Média	3,511A	3,223A		2,795A	1,988B	2,508A	1,664B
cv=18,91; dms=0,771				cv=18,91; dms=0,771			
				cv=20,08; dms=0,507			

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

² Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,00µM TDZ

³ Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,25 µM TDZ

A análise de variância do quinto subcultivo o fator combinação de citocinina influenciou efetivamente todos os parâmetros avaliados, e o fator híbrido teve efeito para a variável broto/explante (Tabela 11).

Tabela 12. Análise da variância do delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 X 2 (Híbridos x Combinações de citocininas) quanto a proliferação de gemas e brotos por explante e comprimento de broto(cm) do quinto subcultivo de híbridos de pimenta do reino, após seis semanas de cultivo *in vitro*.

FV	G.L	Q.M.			F		
		I	II	III	I	II	III
Híbrido(F1)	3	1.09768	2.08460	0.08176	1.7785 ns	6.0651 **	0.2173 ns
Comb. Citoc.(F2)	1	5.07656	5.03390	3.82542	8.2254 **	14.6461 **	10.1693 **
F1 X F2	3	0.09044	0.25573	0.20969	0.1465 ns	0.7440 ns	0.5574 ns
Tratamento	7	1.23442	1.72213	0.67139			
Resíduo	32	0.61718	0.34370	0.37617			

I - Gema; MG = 3.18525; CV% = 24.66

II - Broto; MG = 2.43575; CV% = 24.07

III - Comprimento do broto; MG = 1.83925; CV% = 33.35

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0.01 \leq p < 0.05$) ns não significativo ($p \geq 0.05$)

No quinto subcultivo combinação de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00 \mu\text{M}$ TDZ (C1) proporcionou maior número de gemas /explante com média de 3,541 e entre híbridos não houveram diferenças estatísticas (Tabela13).

Quanto à formação de brotações as maiores médias encontram-se no meio com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00 \mu\text{M}$ TDZ (C1) com média de 2,790, entre o fator híbridos o lote 15 apresentou maior média de brotos/explante (3,106) (Tabela13).

O meio com $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00 \mu\text{M}$ TDZ (C1) promoveu a maior média de comprimento de broto (2,148) e sem diferenças entre híbridos (Tabela 13).

Tabela 13. Teste de comparação de média do quinto subcultivo quanto a proliferação *in vitro* de brotos e gemas por explantes e comprimento de broto em meio básico de cultura MS suplementado com diferentes combinações de BAP e TDZ após 42 dias.

Híbrido	Gemas/ explante			Brotos/explante			Comprimento do broto (cm)		
	C1 ¹	C2 ²	Média ¹	C1	C2	Média ¹	C1	C2	Média ¹
7	3,750	2,810	3,280a	2,666	2,016	2,341b	2,300	1,520	1,910a
9	3,51	2,732	3,124a	2,410	1,942	2,176b	2,374	1,460	1,917a
15	3,810	3,314	3,560a	3,694	2,518	3,106a	2,060	1,540	1,800a
21	3,082	2,460	2,771a	2,392	1,848	2,120b	1,860	1,600	1,730a
Média	3,541A	2,829B		2,790A	2,081B		2,148A	1,530B	
cv=24,66; dms=0,951			cv=24,07; dms=0,710			cv=33,35; dms=0,743			

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

² Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,00µM TDZ

³ Combinação de citocinina, 0,5mg.L⁻¹ BAP+ 0,25 µM TDZ

À medida que os subcultivos eram realizados foram observadas características indesejadas nos brotos estabelecidos, essas distinções foram notadas nos brotos provenientes do meio de multiplicação contendo BAP em conjunto com $0,25 \mu\text{M}$ TDZ, os brotos apresentaram entre nó curto resultando em brotos com comprimentos menores aos obtidos no meio com apenas $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, além disto, resultou em algumas folhas malformadas, retorcidas, grandes e com calos na superfície abaxial (Figura 5).

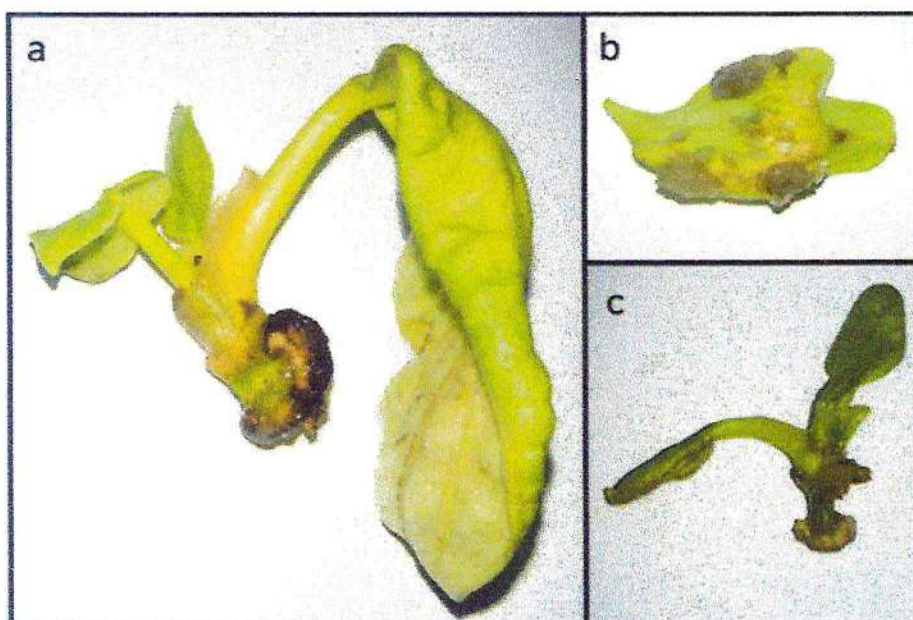


Figura 5. Anormalidades em brotos provenientes de meio de cultura com adição de BAP+TDZ, folhas grandes e retorcidas(a), calos na superfície abaxial da folha(b), e entre nó curto(c).

A regressão entre subcultivos considerando a taxa de gemas por explante nos meios com diferentes combinações de citocininas como mostra a Figura 6, revela que para os híbridos lote 15 e 21, independente das combinações de citocininas utilizadas, e para o lote 7 na combinação $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,25 \mu\text{M}$ TDZ (C2) houve tendência crescente de proliferação de gemas/explante até o terceiro subcultivo (Figura 6 a, c e d).

Para o lote 9, em ambas as combinações e lote 7 na combinação $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00 \mu\text{M}$ TDZ, a média do número de gemas tem uma tendência linear crescente em relação aos subcultivos (Figura 6 a e b).

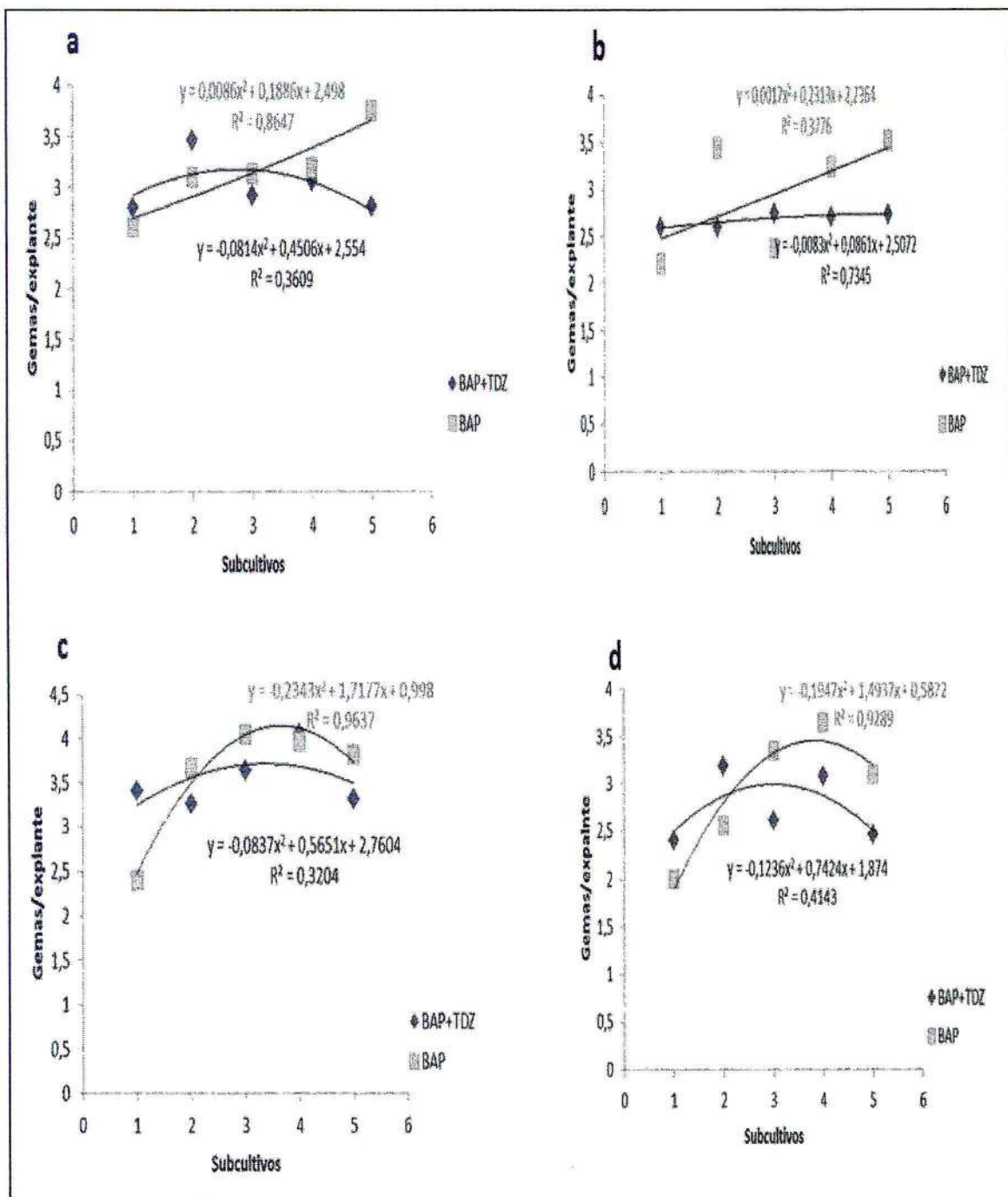


Figura 6. Número de gemas por explante de diferentes híbridos de pimenta do reino em meio de cultura com combinações de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,25\mu\text{M}$ TDZ e $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP em cinco subcultivos com intervalos de 42 dias cada. Lote 7- (a); Lote 9 –(b); Lote15 – (c); Lote21- (d).

Os graficos de regressão que constituem a Figura 7 mostram que para os diferentes híbridos analisados e as diferentes combinações dos reguladores de crescimento, houve um aumento do número de brotos/explante a medida que se aumenta os subcultivos esse acréscimo ocorre até o terceiro subcultivo nos lotes 7 e 15 (Figura 7 a e c) e até o quarto subcultivo nos lotes 9 e 21 (Figura 7 b e d) , com tendência em diminuir a capacidade de multiplicação de brotos até o quinto subcultivos.

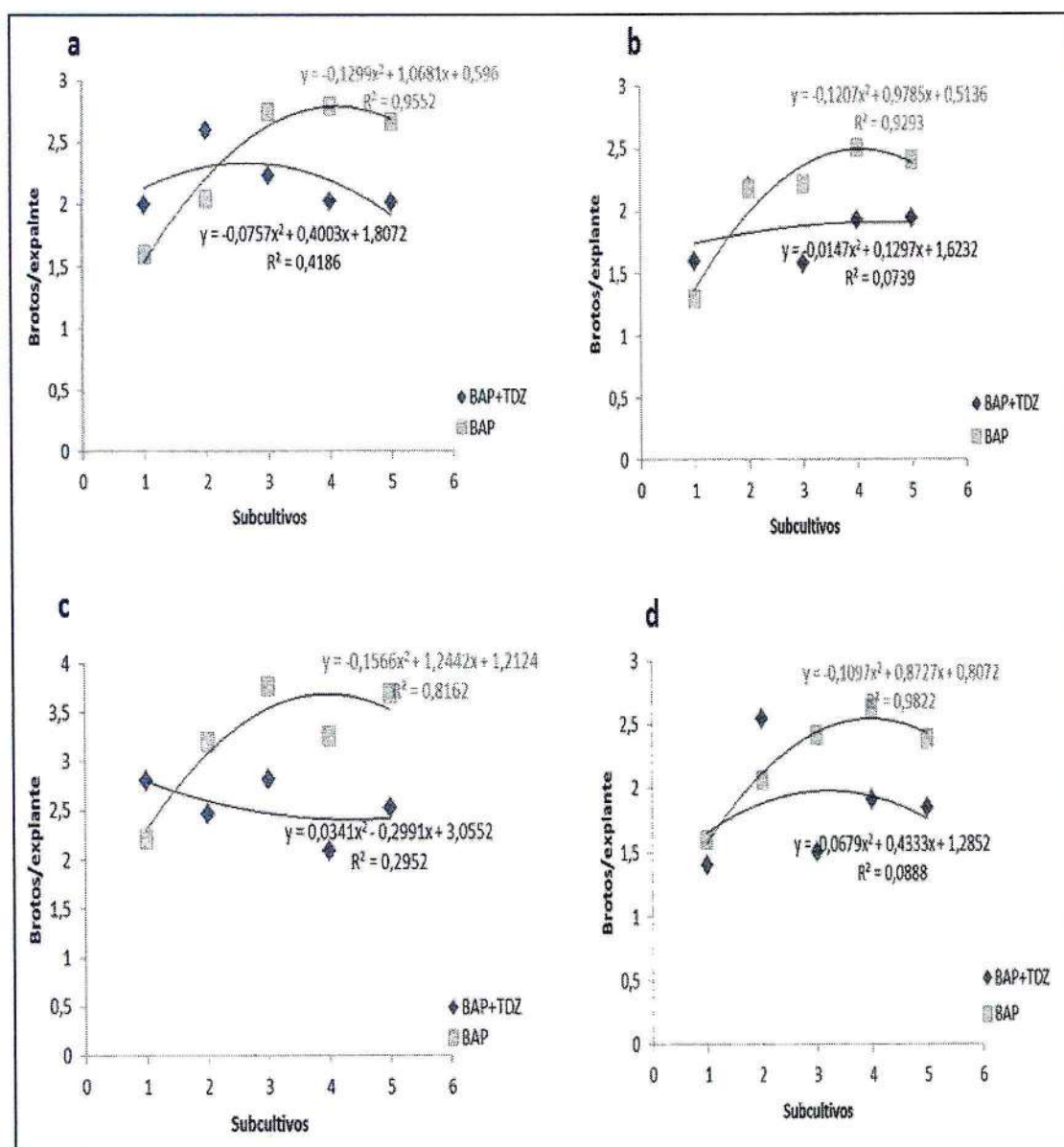


Figura 7. Número de brotos por explante de diferentes híbridos de pimenta do reino em meio de cultura com combinações de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,25\mu\text{M}$ TDZ e $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP em cinco subcultivos com intervalos de 42 dias cada. Lote 7- (a); Lote 9 –(b); Lote15 – (c); Lote21- (d).

Ao avaliar o número de gemas, a combinação de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ (C1) foi o que apresentou os melhores resultados, embora a combinação $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,25\ \mu\text{M}$ TDZ(C2) apresentou semelhanças estatísticas quanto ao proliferação de gemas da combinação C1 no segundo, terceiro e quarto subcultivo (Tabela 7, 9 e 11), fatores indesejáveis foram observados no meio com a combinação C2 (Figura 5).

Ao considerar apenas o desempenho das combinações de citocininas ao longo dos subcultivos para o número de brotos, percebemos que no terceiro, quarto e quinto subcultivos, a combinação de $0,05\ \text{mg L}^{-1}$ BAP + $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ (C1) foi a melhor para promover a proliferações de brotos,

Para o comprimento de broto a adição de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,00\ \mu\text{M}$ TDZ (C1) ao meio de cultura MS promoveu maior alongamento dos brotos no primeiro, terceiro, quarto e quinto subcultivos (Tabelas 5, 9, 11 e 13).

Dentre os híbridos em estudo e ao considerar ambas as combinações de citocininas testadas nos cinco subcultivos, o lote 15 teve grande destaque uma vez que apresentou média superior na maioria das análises realizadas para todas as variáveis avaliadas (Tabela 5, 7, 9, 11 e 13).

2.4 DISCUSSÃO

As citocininas assim chamadas porque estimulam a divisão celular (citocinese) são largamente utilizadas em cultura de tecidos de diversas espécies, atuando desta forma na morfogênese (GEORGE, 1996). É de grande relevância a concentração e o tipo de citocinina, para a melhor proliferação de brotações através da quebra da dominância apical (DZAZIO et al., 2002); contudo, concentrações muito elevadas podem ser prejudiciais, causando a formação de brotações anormais e hiper-hídricas (VASCONCELOS et al., 2012).

O Thidiazuron (TDZ) é uma feniluréia que mostra uma atividade citocinínica, atuando intensamente na divisão celular. Em concentrações altas provoca o desequilíbrio hormonal e tem efeito tóxico ou desordenada divisão celular promovendo a formação de calos (FLORES et al., 2007, ALVARENGA., 2013).

De acordo com experimento preliminar, uma vez que as citocininas agem na quebra da dominância apical, é possível que a alta atividade citonínica do TDZ tenha sido a causadora de entre nós curtos, brotações relativamente pequenas ou até mesmo nenhum desenvolvimento da parte aérea dos híbridos de pimenteira do reino cultivados em meio com adição ou não de BAP adicionados com concentrações acima de 0,25 μ M de TDZ

Furtado et al. (2007), estudando o TDZ na regeneração *in vitro* de amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas notou que o TDZ inibiu o crescimento dos brotos e aumentou o tamanho das folhas em explantes de gema cotiledonar, em explantes de hipocótilo respondeu apenas em formação de calos (aglomerados de células) de onde se esperava o surgimento de alguns brotos.

O TDZ promove a emissão de múltiplas brotações, perda da dominância apical, regeneração devido a intensa divisão celular (FLORES, et al. 2007; SILVA et al., 2003), podendo também ser usado para a formação e manutenção de calos (KOKOTKIEWICZ et al., 2012; MAHESHWARI E KOVALCHUK, 2011).

Neste trabalho foram observadas folhas mal formadas com calos na superfície abaxial, o que não é objetivo, pois espera-se a organogênese direta onde o órgão vegetal é induzido e se desenvolve a partir de um explante, isto é sem passar pela fase inicial de calo (massa de células com crescimento desordenado e indiferenciado). Observações semelhantes de várias anormalidades morfo-fisiológicas associadas ao uso de TDZ foram feitas por KIM et al., 1997 e SOARES et al., 2011.

Na etapa de multiplicação, as combinações dos reguladores de crescimento vegetal (TDZ e BAP) foram suficientes para promover a proliferação de gemas e brotos a partir de segmentos nodais de híbridos de pimenta do reino.

As respostas observadas nos híbridos em virtude das combinações de citocininas ao decorrer dos subcultivos pode ser atribuído às características que os reguladores de crescimento vegetal possuem de inibir, promover ou modificar as diferentes respostas fisiológicas, através das quais controlam o crescimento e desenvolvimento da planta (VIEIRA *et al.* 2010., TAIZ E ZEIGER, 2012).

Os efeitos dos hormônios dependem da concentração, do estágio de desenvolvimento, da interação com outros hormônios e do tipo de órgão ou tecido vegetal (KERBAUY 2008, TAIZ E ZEIGER 2012, JESUS E PERES 2013).

As citocininas controlam a divisão celular, estando intimamente ligadas à diferenciação das células e, sobretudo na formação de gemas caulinares (KERBAUY 2008) e a alta atividade de citocinina pertencente ao TDZ (RIBEIRO *et al.*, 2010) pode provocar um desequilíbrio no balanço hormonal.

De acordo com Peres (2002), os componentes mais críticos adicionados ao meio de cultura são os reguladores de crescimento vegetal. Dessa forma, o balanço hormonal de citocininas é um fator de suma importância para o sucesso em sistemas de micropropagação, nos quais se objetivam altas taxas de multiplicação.

No primeiro subcultivo, a combinação de BAP ($0,5\text{mg.L}^{-1}$) + TDZ ($0,25\mu\text{M}$) se mostrou satisfatório para a indução de gemas em híbridos de pimenta do reino, visto que a maior média de número de gemas pertence a esse tratamento.

Recentemente, o TDZ vem sendo utilizado como uma alternativa para substituição das citocinina sintéticas como cinetina e benzilaminopurina, pois possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações (GRAÇA *et al.* 2001; RIBEIRO *et al.* 2010).

Espécies lenhosas como *Rauvolfia tetraphylla* L. e *Leucaena leucocephala* (Lam.) apresentaram um alto número de gemas e brotos com a utilização de $0,23\mu\text{M}$ ($6,98$ brotos/explante) de TDZ, adicionado ao meio de cultura (FAISAL *et al.* 2005; SHAIK *et al.* 2009).

No entanto, a utilização do TDZ, mesmo em baixa concentração em conjunto com o BAP, neste trabalho não foi eficiente na multiplicação *in vitro* de híbridos de pimenta do reino quando utilizados em subcultivos subsequentes, uma vez que pode se observar que a combinação de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,00\mu\text{M}$ TDZ (C1) apresentou

semelhanças estatísticas quanto a proliferação de gemas da combinação $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,25\text{ }\mu\text{M}$ TDZ (C2) no segundo, terceiro e quarto subcultivo e superior no quinto subcultivo, e para a diferenciação de brotos a C1 mostrou-se superior no terceiro, quarto e quinto subcultivos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Moura *et al* (2008) trabalhando com a cv. Bragantina de pimenteira –do-reino que obteve melhores resultados para a proliferação de gemas e brotos por explante em meio contendo BAP a $0,5\text{ mg.L}^{-1}$.

Segundo Santos (2012) em estudo com diferentes cultivares de pimenta do reino, a ausência de TDZ e a presença de BAP no meio de cultura apresentaram respostas mais eficientes para obtenção de gemas.

Moura et al. (2012) observaram uma tendência crescente do número de gemas axilares por explante à medida que se aumentou a concentração do regulador de crescimento BAP, e a concentração de $0,6\text{ mg.L}^{-1}$ foi mais responsiva para a multiplicação de *Plathymenia reticulata*.

Outro fator que tornou a utilização de BAP em conjunto com TDZ ineficiente para a multiplicação *in vitro* de híbridos ao longo dos subcultivos é o desenvolvimento de brotos mal formados, com entre nó curto e folhas atípicas (retorcidas, grandes), formação de calosidade nos explantes. Observações semelhantes de várias anormalidades morfo-fisiológicas associadas ao uso de TDZ foram feitas por GRIBAUDO E FRONDA 1991; KIM et al., 1997; SOARES *et al.*, 2011; DELPONTE *et al.*, 2001 e SANTOS 2012.

Segundo Ribeiro *et al.* (2010), o TDZ é mais ativo que outras citocininas por causa do aumento da atividade da fosfatase ácida. Essa enzima promove a interconversão nucleotídeo nucleosídeo da estrutura de citocininas endógenas, tornando-as biologicamente mais ativas, podendo manifestar-se como inibidor do crescimento e desenvolver gemas curtas e não alongadas (KIM *et al.*, 1997). Tais características podem explicar os piores resultados do comprimento médio de broto para todos os híbridos no meio em que foi adicionado $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP + $0,25\text{ }\mu\text{M}$ TDZ.

O alongamento dos brotos tem certa importância para o processo de multiplicação *in vitro*, pois a individualização das gemas para formação de novos brotos (multiplicação) só é possível se os entre-nós não forem muito curtos.

De acordo com MORAIS *et al.* (2014) e ASMAR *et al.* (2011) maiores comprimentos de brotos foram obtidos em meio de cultura sem suplementação com

reguladores vegetais, por sua vez, os comprimentos de brotos alcançados neste trabalho mostrou-se satisfatório em meio de multiplicação contendo BAP.

A taxa de proliferação de gemas e brotos varia de acordo com os subcultivos, apresentando tendência de aumento inicial e posterior diminuição na capacidade de multiplicação de brotos e gemas à medida que se aumentam os subcultivos, o que pode estar relacionado com o uso constante de citocininas

A presença constante ou excessiva de citocininas no meio de indução ou multiplicação de brotos pode desequilibrar exageradamente o balanço hormonal endógeno dos explantes, além de inibir as respostas desejadas (LEMOS, 2010).

Segundo relato em vários estudos de micropropagação de diversas espécies, o excesso de citocinina, pode ser tóxico (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998; LESHEM *et al.* (1988); VILLA *et al* 2006).

Nos cinco subcultivos verificaram-se diferenças também nas respostas quanto as taxas no número de gemas, brotos por explante, comprimento do broto em função das diferentes combinações de citocininas ao meio de cultura para os diferentes híbridos sobressaindo-se o lote 15 que apresentou melhor performance, sugerindo a existência de diferenças genóticas na resposta à indução morfogênica *in vitro*. A implicação disto para estudos de micropropagação relaciona-se com a necessidade de serem desenvolvidos protocolos regenerativos específicos para cada genótipo.

Variações na taxa de regeneração atribuídas a diferentes genótipos também foram citadas para outras espécies micropropagadas, como é o caso da bananeira (MENDES *et al.*, 1996).

De acordo com GUERRA *et al.* (1999) a taxa de regeneração *in vitro* de brotações axilares é variável de acordo com o genótipo em estudo.

2.5 CONCLUSÃO

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

- A multiplicação *in vitro* de híbridos de pimenteira-do-reino é mais adequada em meio de cultura MS, suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP,.
- A regeneração *in vitro* é variável com o genótipo, sendo o lote 15 mais responsivo na etapa de multiplicação.
- A taxa de multiplicação é variável nos subcultivos, com tendência de maior indução de brotos no início e redução ao longo dos subcultivos para os híbridos de pimenteira-do-reino.

2.6 REFERÊNCIAS

ASMAR, A.S. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13,n.esp., p.533-38, 2011.

CARVALHO, A.A.de. Influência de diferentes fatores na micropropagação e na análise dos compostos voláteis *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides*. 2013. 76 f. **Dissertação** - Universidade Federal de Lavras.

COSTA, G. F.DE.; NEPOMUCENO, G. F.; SANTANA, J. R. F. de. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**, v.40, n.5, mai, 2010.

CURTI, A.R. 2011. *Contribuições para a Micropropagação de Peltophorum dubium (SPRENGEL) Taubert.* – **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

DELPONTE E.M et al.(2001) Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus glóbulos subsp. glóbulos* Labill- **R. Árvore**, viçosa-MG, V 25,n1, p.1-8,2001

FAISAL, M.; AHMAD, N. & ANIS, M. 2005. Shoot multiplication in *Rauvolfia tetraphylla* L. using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 80: 187–190.

FLORES, R; MALDANER, J; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Cienc. Rural** vol.36 no.3 Santa Maria June 2006.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2007.

FURTADDO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; CASTRO, J. P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*arachis Hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA** ISSN 1519-5228, Volume 7- Número 1 - 1º Semestre 2007 .

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq. v.1p., 1998, 183-260.

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

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2ed. Edington: Exenetics, 1.574., 1996

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on Grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.8, p.1083-1091, 1991.

GUERRA, M. P.; VESCO, L. L. V.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODAIR, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira ‘420A’. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

IBGE. 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2014.

Alvarenga, I. C. Lâminas de irrigação e omissão de nutrientes no cultivo *in vivo* e luz e TDZ na micropropagação e constituintes voláteis de *Achillea millefolium* L. – Lavras : UFLA, 2013.

JESUS, F. A. ; PERES, L. E. P. 2013. Fisionômica. In: Aluizio Borém; Roberto Fritsche-Neto. (Org.). Ômicas 360º: **Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**, 1ed. Editora Suprema LTDA. p. 209-242.

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

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

LESHEM B, WERKER E & SHALEV DP (1988) The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany** 62(3):271-276.

KERBAUY, G.B. 2008. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

KIM, M.K.; SOMMER, H.E.; BONGARTIEN, B.C.; MERKLE, S.A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron". **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, n.8, p.536-540, 1997

KOKOTKIEWICZ, A. et al. Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. **Zurich Naturforsch Scientiae**, Tubingen, v. 67, n. 1-2, p. 65-76, Jan./Feb. 2012.

MARTINS, L. M; PEREIRA, A. M. S; FRANÇA, S. C ; BERTONI, B. W. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Cienc. Rural** vol.41 no.3 Santa Maria Mar. 2011 Epub Mar 04, 2011.

MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.648-655, 2006.

MAHESHWARI, P.; KOVALCHUK, I. Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*. **News Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 778-87, Oct. 2011.

MENDES, B.M.J.; MENDES, F.J.; TULMANN NETO, A.; DEMETRIO, C.G.B.; PUSKE, O.R. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.12, p.863-867, dez. 1996.

MILANEZ, D. et al. **Cultura de pimenta-do-reino**. Vitória, ES: EMCAPA, 1987. 94p. (EMCAPA, Documentos, 33).

MORAIS, T.P.L.; ASMAR, S.A.L.; LUZ, J.M.Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.350-355, 2014.

MOURA, L. C. DE .; TITON, M.; MIRANDA, N. A.; MOREIRA, P. T.; OLIVEIRA, M. L. R. de.; Multiplicação e alongamento *in vitro* de vinhático (*Plathymenia reticulata*) **Sci. For., Piracicaba**, v. 40, n. 96, p. 499-505, dez. 2012

MOURA, E. F.; MENEZES, I. C.; LEMOS, O. F. de. Concentrações de citocinina e carvão ativado na micropropagação de pimenta-do-reino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.72-76, jan-fev, 2008.

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

OLIVEIRA, L.M. de; PAIVA, R.; SANTANA, J.R.F. de; NOGUEIRA, R.C.; SOARES, F.P.; SILVA, L.C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.29, n.1, p.25-30, 2007.

PERES, L.E.P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PRABHAKARAN NAIR, K. P. **Agronomy and economy of black pepper and cardamom**. The “King” and “Queen” of Spices. London: Elsevier Science Publishing, 2011. 366 p.

RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; SANTOS, J.W.dos; CARVALHO, J.M.F.C. Efeito do thidiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n.4, p. 366- 371.2010.

ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Biosciense Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, R. R. A história sob o olhar da química: As especiarias e sua importância na alimentação humana. **Química Nova na Escola**, São Paulo, 2010. v. 32, n.2, p. 85.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira "Santa Rosa": efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.365-367, 2003.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.P.C; MARTINOTTO, C.; SOARES, F.P.; PAIVA, P.D.O. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.293-296, 2006.

SANTOS, L.R.R. Ontogênese, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). 2012. 83 f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.

SHAIK, N.M.; ARHA, M.; NOOKARAJU, A.; GUPTA, S.K.; SRIVASTAVA, S.; YADAV, A.K.; KULKARNI, P.S.; ABHILASH, O.U.; VISHWAKARMA, R.K.; SINGH, S.; TATKARE, R.; CHINNATHAMBI, K.; RAWAL, S. & KHAN, B.M. 2009. Improved method of *in vitro* regeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species. **Physiology and Molecular Biology of Plant**, 15: 311–318.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, F. G. et al. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 27, n.3, 541-547, 2003.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NERY, F.C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 152-157, jan./fev., 2011.

SZALLASI, A. piperina: pesquisadores descobrem novo sabor em um antigo tempero. **Tendências em Ciências Farmacêuticas**, 26 (9): 437-439, 2005.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 2012. **FISIOLOGIA VEGETAL**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed

VASCONCELOS, A.G.V.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.C.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n.5, mai, 2012

VIEIRA, E.L.; SOUZA, G.S.; SANTOS, A.R. & SILVA, J.S. 2010. **Manual de Fisiologia Vegetal**. EDFMA, São Luis.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; TEODORO, G.S.; MIYATA, L. Y. multiplicação in vitro de amoreira-preta 'cherokee': efeito de meios de cultura, cinetina e Ga3. 53 (307): 357-362, 2006 **revista Cer**.

3. ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BROTO COM AUXINAS, ACLIMATIZAÇÃO E FORMAÇÃO DE MUDAS DE HÍBRIDOS INTRA E INTERESPECÍFICOS DE *Piper nigrum* L.

Resumo

O processo de enraizamento adventício de plantas cultivadas *in vitro* é uma técnica que vem sendo empregada na propagação vegetativa de diversas espécies. Muitos fatores estão relacionados com a fase de enraizamento, influenciando positiva e/ou negativamente no estabelecimento de protocolos de micropropagação, e estão diretamente ligados ao sucesso das etapas de aclimatização e formação de mudas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de híbridos intra e interespecífico de pimenteira-do-reino quanto à indução do enraizamento *in vitro* pela adição das auxinas (AIA, AIB e ANA) ao meio de cultura ½ MS e avaliar a taxa de sobrevivência dos brotos enraizados nas etapas de aclimatização e formação de mudas. Na etapa de enraizamento foram adicionados ao meio de cultura ácido indolacético (AIA), ácido naftaleno áctico (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) nas concentração de 1,0; 1,5; 2,5 µM e sem auxinas(controle). A aclimatização foi realizada em casa de vegetação em bandejas plásticas contendo vermiculita e adição de 10 ml de solução nutritiva por planta quinzenalmente, e após 28 dias foram transferidas para sacos plásticos contendo substrato para a formação de mudas. Após 28 dias em meio de enraizamento, os maiores percentuais de enraizamento foram obtidos com 1,5µM de AIA, 100% para todos os híbridos. A aclimatização por 28 dias em substrato vermiculita proporcionou maiores taxas de sobrevivência das plantas provenientes do meio ½ MS com adição de AIA. Na fase de formação de mudas com substrato terra preta, as plantas apresentaram 100% de sobrevivência. Então, para maior taxa de sobrevivência e formação de mudas recomenda-se o enraizamento de brotos em meio básico de cultura com ½ MS e adição 1,5 µM de AIA.

Termos para indexação: Cultivo *ex vitro*; *Piper nigrum* L; Fitoreguladores.

Abstract

The process of adventitious rooting of *in vitro* cultivated plants is a technique that has been applied in the vegetative propagation of several species. Many factors are related to rooting phase, having a positive and/or negative influence on the micropropagation establishing protocols, and are directly related to the steps of acclimatization and formation of seedlings. The aim of this work was to evaluate the response of intra- and interspecific black pepper hybrids as for the induction of *in vitro* rooting by added auxins (IAA, IBA and NAA) to the ½ MS culture medium, and to evaluate the survival rate of rooted shoots in the steps of acclimatization and seedling formation. At the rooting phase, indoleacetic acid (IAA), naphthaleneacetic acid (NAA) and indolebutyric acid (IBA) were added to the culture medium at concentrations of 1.0; 1.5; 2.5 µM and zero auxin (control). Acclimatization was conducted in a plant nursery, with plastic trays containing vermiculite and being added 10 ml of nutritive solution per plant at every 15-day period. After 28 days, the plants were transferred to plastic bags containing a seedling formation substrate. After 28 days in the rooting substrate, the higher rooting percentages were obtained at 1.5µM IAA, being 100% for all hybrids. The acclimatization for 28 days with the vermiculite substrate yielded higher survival rates for plants that came from the ½ MS medium with IAA. At the formation phase of seedlings with soil as substrate, the plants presented 100% survival. Therefore, for the higher survival rate and formation of seedlings, it is recommended the rooting of shoots in basal medium of ½ MS and the adding of 1.5µM IAA.

Index terms: black pepper, rooting, acclimatization, seedling formation.

3.1 Introdução

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta trepadeira originária da Índia, pertencente à família Piperaceae e ao gênero *Piper*, o qual apresenta várias espécies, dentre as quais a *Piper nigrum* L., cujo fruto possui grande valor econômico mundial no ramo de especiarias.

O Brasil está entre os países de maior produção e exportação, dois Estados brasileiros vêm se destacando na produção de pimenta-do-reino: Pará, com 79 %, e Espírito Santo, com 13 % da produção nacional (IBGE, 2014).

Porém, a incidência de doenças na cultura como a fusariose, murcha amarela, e viroses como o PYMoV e CMV, vem ocasionando a redução no ciclo de vida da planta e significativas perdas de produção. A micropropagação constitui uma alternativa para conter a limitação da expansão da cultura da pimenteira-do-reino através da propagação de mudas em tempo e espaço físico reduzidos, com alta fidelidade genética e com qualidade fitossanitária (GEORGE 2008).

O sucesso do cultivo *in vitro* de espécies vegetais depende da eficácia nas etapas do processo de micropropagação, e o enraizamento, aclimatização e formação de mudas, sendo cada uma destas, importantes para otimizar a propagação clonal de plantas.

Nesse escopo, diversos reguladores vegetais da classe das auxinas têm sido empregadas no enraizamento *in vitro* para estimular processos moleculares e bioquímicos (DE KLERK *et al.* 1999) com o intuito de promover divisão, alongamento e diferenciação celular, além de serem responsáveis pela dominância apical (ROCHA *et al.*, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2012) por este motivo são largamente utilizadas na indução de raízes adventícias (LUND *et al.*, 2008).

Para induzir e promover o enraizamento de brotos em meio de cultura as auxinas mais usadas são o ácido alfa-naftaleno acético (NAA), seguido do ácido indol-3-butírico (IBA) e ácido 3-indolilacético (IAA).

A diferenciação de raízes adventícias é indispensável para a aclimatização e o insucesso do enraizamento torna a taxa de sobrevivência de plantas aclimatizadas baixa e/ou nulas (SANTOS 2012).

Fatores abióticos, como luz, temperatura e umidade relativa também desempenham papel relevante na aclimatização, pois influenciam no metabolismo em geral da planta (CORREA E FETT-NETO, 2004; CORREA *et al.*, 2005).

Segundo CHANDRA et al. (2010) um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver na etapa de aclimatização devido à transferência brusca do ambiente *in vitro* para *ex vitro*.

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo estudar a etapa de enraizamento *in vitro*, aclimatização e formação de mudas *ex vitro* de híbridos intraespecíficos e interespecíficos de pimenteira-do-reino testando três tipos de auxinas em diferentes concentrações no meio de cultura para o enraizamento e avaliar a taxa de sobrevivência nas etapas de aclimatização e formação de mudas.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará. Foram investigadas as melhores condições de cultivo *in vitro* na etapa de enraizamento e no cultivo *ex vitro* visando o estudo nas etapas de aclimatização e formação de mudas de híbridos intraespecíficos e interespecíficos de *Piper nigrum* L. (Figura 8).

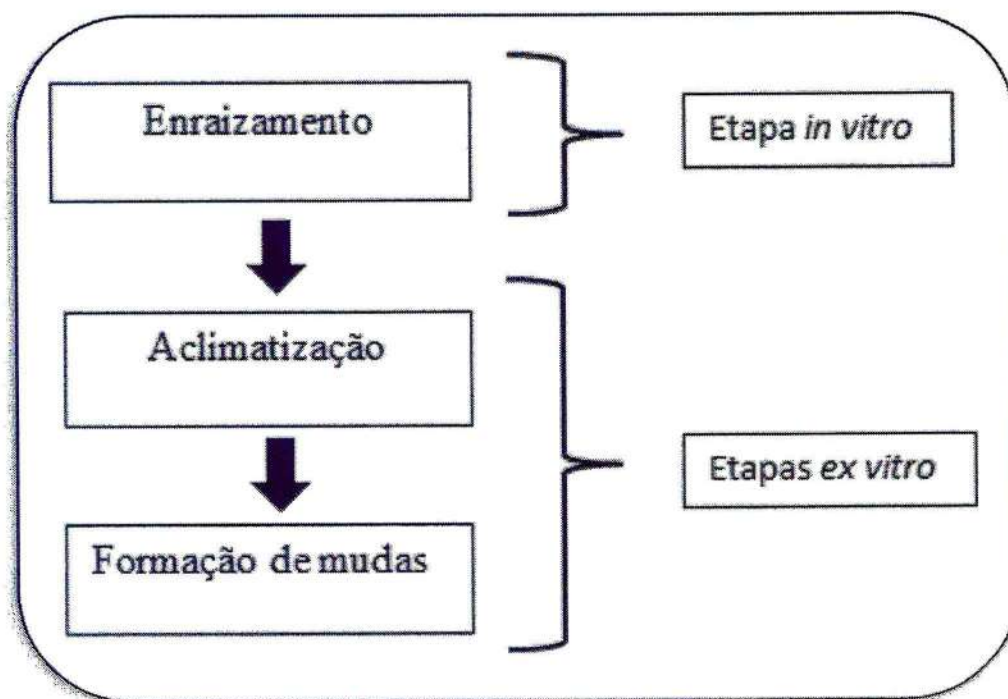


Figura 8. Etapas desenvolvidas para o estabelecimento das melhores condições de cultivo de híbridos de pimenteira do reino.

3.2.1 Enraizamento *in vitro* de híbridos de *Piper nigrum* L.

Para a realização dos experimentos, utilizou-se como fonte de material vegetal brotos provenientes do 5º subcultivo *in vitro* de híbridos intra e interespecífico de *Piper nigrum* L.

Os híbridos foram obtidos a partir de sementes provenientes de polinização controlada de cruzamentos intraespecífico entre as cultivares de *Piper nigrum* Guajarina, Bento e Apra e cruzamentos interespecífico entre as espécies *Piper nigrum* e *Piper arboreum* de pimenteira do reino, os quais promoveram a formação de diferentes

híbridos designados Lote, como descrito na Tabela 14. Todo material utilizado pertence ao Banco Ativo de Germoplasma – BAG da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará.

Tabela 14. Híbridos provenientes dos cruzamentos intraespecífico e interespecífico de pimenteira do reino.

Cruzamentos		Híbridos
Bento x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 7
Apra x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 15
Bento x Guajarina	Intraespecíficos	Lote 21
Guajarina x <i>Piper arboreum</i>	Interespecíficos	Lote 9

Inicialmente, brotos provenientes do quinto subcultivo do processo de multiplicação *in vitro* foram transferidos para frascos cilíndricos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel, os brotos permaneceram neste meio por um período de 15 dias em condições controladas de cultivo, para que possíveis resíduos de reguladores de crescimento não influenciassem na etapa de enraizamento.

Posteriormente, os brotos foram seccionados de forma asséptica para a formação de explantes de segmentos caulinares contendo duas gemas e uma folha e inoculados em frascos cilíndricos de vidro com capacidade de 300 mL contendo 40 mL de meio de cultura de enraizamento.

O meio de cultura básico utilizado na etapa de enraizamento de brotos foi o ½ MS, suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, solidificado com 2 g.L⁻¹ de phytigel. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada por 20 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão. Os tratamentos consistiram da adição de ácido indolacético (AIA), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB), todos na concentração de 1,0; 1,5; 2,5 µM. Como controle, utilizou-se o tratamento sem adição de auxinas (Tabela 15). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16h.luz.dia⁻¹, intensidade luminosa de 3.000 lux e temperatura de 25±3 °C.

Tabela 15. Tratamentos empregados na etapa de enraizamento *in vitro* de quatro híbridos de pimenteira-do-reino.

Auxinas	Concentrações (µM)	Tratamentos
-	Sem regulador	T1
AIB	1,0	T2
AIB	1,5	T3
AIB	2,5	T4
AIA	1,0	T5
AIA	1,5	T6
AIA	2,5	T7
ANA	1,0	T8
ANA	1,5	T9
ANA	2,5	T10

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 10 com num total de 40 interações, sendo cada tratamento composto de quatro repetições e cada repetição constituída de um frasco cilíndrico contendo 5 explantes.

Os dados foram submetidos à análise da variância com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA E AZEVEDO, 2009), e quando possível às médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$), considerando a média por frasco em cada tratamento.

Aos 28 dias de cultivo *in vitro*, foi avaliada a resposta da diferenciação de raízes dos diferentes genótipos em relação aos tratamentos testados na etapa de enraizamento, por meio da coleta dos dados de porcentagem de brotos enraizados, média do número de raízes/explante, média do número de brotos/explante, comprimento da maior raiz/explante (mm). As medições foram realizadas com o auxílio de um paquímetro digital.

3.2.2 Aclimatização de brotos de híbridos de *Piper nigrum* L.

Os brotos enraizados *in vitro* foram retirados dos frascos e lavados em água corrente para eliminar resíduos do meio de cultura aderido nas raízes. Em seguida, as plântulas foram acondicionadas em bandejas plásticas constituídas de 24 células (6,5 cm de diâmetro) preenchidas com vermiculita, sendo marcada a procedência dos tratamentos do enraizamento, foram distribuídos duas plântulas por célula.

As bandejas contendo as plântulas permaneceram por uma semana em local com baixa intensidade luminosa e protegida de chuva, Após este período, foram transferidas para casa de vegetação em condições ambientais por quatro semanas para crescimento e formação de mudas, a nutrição foi realizada quinzenalmente através da utilização de 10 ml/célula de solução nutritiva composta do meio MS com metade da concentração de sais. Quando necessário foram realizada pequenas irrigações com o auxílio de um regador para manter a umidade do substrato.

Foram avaliados a porcentagem de sobrevivência dos brotos enraizados de híbridos de pimenteira-do-reino provenientes de diferentes meios de enraizamento utilizados na etapa anterior.

3.2.3 Formação de mudas de híbrido de *Piper nigrum* L

Posteriormente aos 28 dias da aclimatização foi realizado o transplântio das plantas aclimatizadas em bandejas em casa de vegetação para sacos plásticos de polietileno preto (16x12cm) contendo terra preta e matéria orgânica como substrato e alocados em casa de vegetação

Após 60 dias foi avaliado a porcentagem de sobrevivência de mudas de diferentes híbridos de pimenteira-do-reino.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Enraizamento *in vitro* de híbridos de *Piper nigrum* L.

A auxina, AIA, como regulador de crescimento em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS para a diferenciação de raízes em brotos de híbridos de pimenteira-do-reino, foi mais eficiente que as auxinas, AIB e ANA, nas concentrações de 1,0; 1,5; e 2,5 μM , pois promoveu 100% de indução de raízes para os lotes 7, 15 e 21, e para o lote 9 somente na concentração de 1,5 μM ocorreu 100%, nas demais, 1,0 μM AIA (T5) e 2,5 μM AIA (T7) foram 90 e 95%, respectivamente, ou seja, o meio $\frac{1}{2}$ MS e 1,5 μM (T6) proporcionou 100% de brotos enraizados, independente do híbrido (Figura 10).

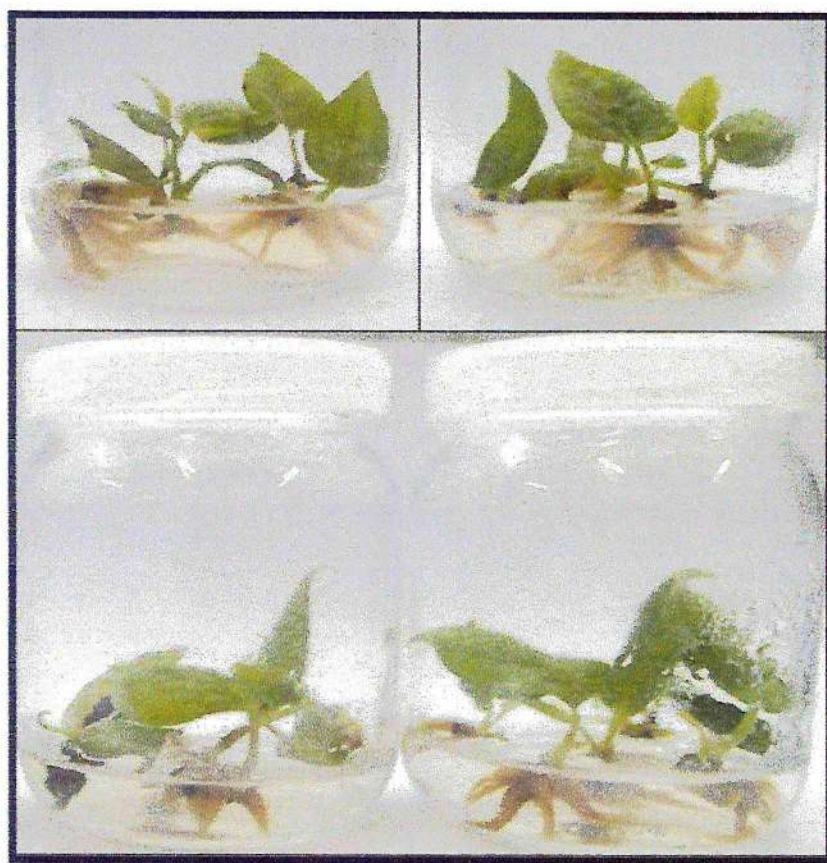
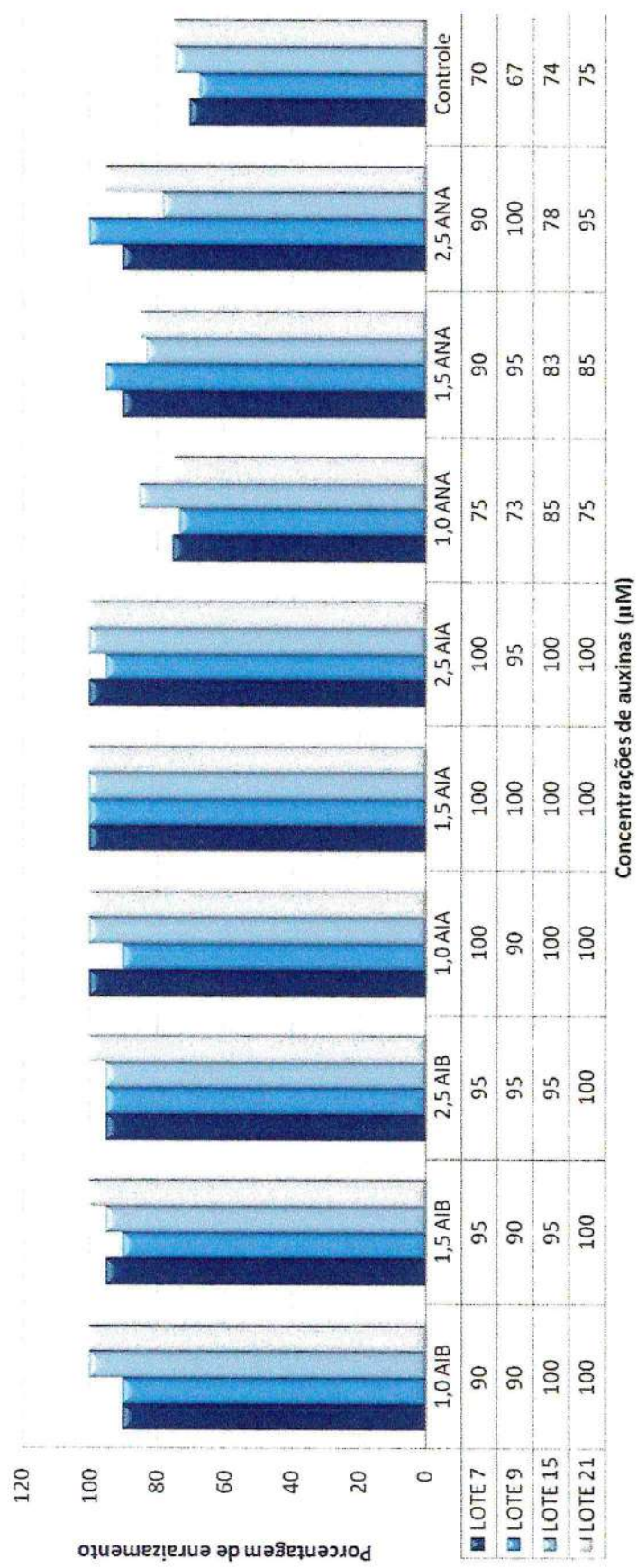


Figura 9. brotos de híbridos de pimenta do reino enraizados em meio MS com adição da auxina ANA.

Ressalte-se que seguido os meios com AIA, os meios com AIB promoveram maior taxa de enraizamento de brotos que os meios com adição de ANA e sem auxinas.

A adição de ANA promoveu a diferenciação de raízes grossas e curtas (figura 9).

Figura 10. Percentual de brotos enraizados de híbridos intra e interespecíficos de pimenteira-do-reino após 28 dias de cultivado *in vitro* em meio de cultura ½ MS suplementado com diferentes concentrações das auxinas AIB, AIA e ANA



A análise de variância para número de raízes, comprimento de raízes, e comprimento do broto revelaram diferenças significativas entre as auxinas (F1) e a interação Híbrido x Auxinas, mas o genótipo Híbrido (F2) não influenciou significativamente no comprimento do broto. Ressalte-se que o fator Híbrido para a variável comprimento de raízes e a interação Híbrido x Auxinas para a variável comprimento de brotos, o nível de significância foi a 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$) e as demais diferenças foram significativas ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)(Tabela 16).

Tabela 16. Valores de F segundo análises de variância das médias de número de raiz, comprimento de raiz e comprimento do broto de híbridos de pimenteira-do-reino após enraizamento *in vitro* com diferentes concentrações de auxinas adicionada ao meio de cultura MS.

Fontes de variação	F		
	I ¹	II ²	III ³
Auxinas (F1)	17.2731 **	39.3750 **	33.6652 **
Híbrido (F2)	4.8963 **	3.5156 *	1.8567 ns
Híbrido x Auxinas	6.5680 **	9.4262 **	1.6839 *

¹ n° raiz; ² comprimento raiz; ³ comprimento do broto

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns - não significativo ($p \geq .05$)

Verificou-se que a adição da auxina AIB nas concentrações de 1,0 e 1,5 μM , da auxina AIA na concentração de 1,5 μM e da auxina ANA na concentração 1,0 e 2,5 μM promoveram maiores médias de número de raízes. Entre os híbridos, os lotes 7, lote 9 e lote 15 responderam semelhantemente entre si e apresentaram maiores número de raízes, 4.44250, 4.94500, 4.47500, respectivamente, diferindo do lote 21 com média de 3.94750 (Tabela 17).

Quanto a variável comprimento da raiz (mm), a concentração de 1,5 μM de AIA apresentou maior comprimento de raiz (32,74562 mm) . Os lotes 9 e 21 apresentaram maiores médias de comprimento de raiz, respectivamente 19.15625 mm e 21.22375 mm (Tabela 17).

Observações de aspectos qualitativos permitiram identificar que as raízes mais finas foram de origem dos meios de cultura suplementado com AIB e sem adição de auxinas, seguidos dos tratamentos com AIA e posteriormente ANA (Figura 11).

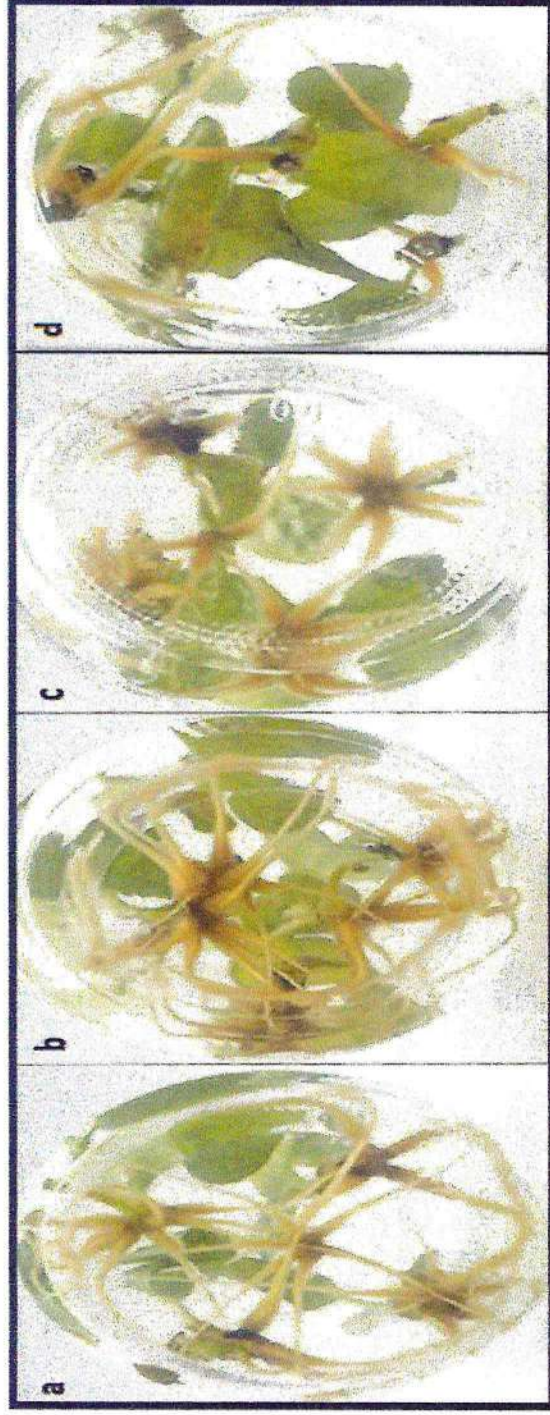


Figura 11. Brotos de híbridos de pimenta do reino cultivados em meio MS com adição da auxina AIB - **a**, AIA - **b**, ANA - **c** e controle - **d**

Tabela 17. Teste de comparação de média quanto à diferenciação de raízes em meio básico MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIB, AIA e ANA após 28 dias de cultivo.

AUXINAS μM	Nº DE RAÍZES				MÉDIA	COMPRIMENTO RAIZ (mm)				MÉDIA
	7	9	15	21		7	9	15	21	
AIB										
1,0	5.0000 abcB	7.9500 abA	7.8000 aA	3.6750 bcdB	6.10625 a	7.6825 eB	19.2575 bcA	27.1075 bA	8.2550 eB	15.57563 de
1,5	3.5000 cdB	8.3500 aA	3.4500 cB	4.8000 abcB	5.02500 ab	28.3100 abAB	20.5475 bB	9.0475 cdC	31.8850 aA	22.44750 bc
2,5	2.1500 dB	3.5000 deAB	4.7000 bcA	3.3000 cdAB	3.41250 cd	8.5125 eAB	7.3075 dB	7.1250 dB	16.2300 deA	9.79375 f
AIA										
1,0	3.3500 cdAB	4.2500 cdeA	3.7500 cA	1.3000 dB	3.16250 d	21.0025 bcdB	35.7400 aA	22.7075 bB	20.9175 bcdB	25.09188 b
1,5	7.0000 aA	5.4000 bcdAB	3.8500 cB	6.5000 aA	5.68750 ab	31.5575 aAB	34.5125 aAB	37.5025 aA	27.4100 abcB	32.74562 a
2,5	6.3000 abA	2.8000 deB	3.3000 cB	5.6500 abcA	4.51250 bc	26.5400 abcA	17.5075 bcdB	26.7175 bA	31.0325 abA	25.44938 b
ANA										
1,0	4.6250 abcdAB	6.7000 abcA	6.6000 abA	3.1000 cdB	5.25625 ab	17.1125 cdeA	17.0475 bcdA	17.6475 bcA	19.3225 cdA	17.78250 cd
1,5	3.0000 cdA	2.6500 eA	3.7000 cA	3.1000 cdA	3.11250 d	8.5100 eB	11.5200 bcdAB	17.6300 bcA	7.9475 eB	11.40187 ef
2,5	5.6000 abcA	5.1500 cdeA	4.6500 bcA	6.1500 abA	5.38750 ab	23.0525 abcA	18.3050 bcA	7.2600 dB	22.0025 abcdA	17.65500 cd
Controle										
0	3.9000 bcdA	2.7000 eA	2.9500 cA	1.9000 dA	2.86250 d	12.0625 deB	9.8175 cdB	10.6750 cdB	27.2350 abcA	14.94750 de
MÉDIA	4.44250 AB	4.94500 A	4.47500 AB	3.94750 B	-	18.43425 B	19.15625 AB	18.34200 B	21.22375 A	-
MG = 4.45250					MG = 19.28906					
CV% = 26.16					CV% = 23.44					

¹ Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

² Combinação de citocinina, $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,00\mu\text{M}$ TDZ

³ Combinação de citocinina, $0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,25\mu\text{M}$ TDZ

Para o fator comprimento do broto, os maiores valores para o comprimento foram provenientes dos tratamentos com 1,0 e 1,5 μM de AIA com as respectivas médias 26.30500 e 24.64812 mm.

Os híbridos responderam de maneira semelhante quanto ao desenvolvimento do comprimento dos brotos apresentando comprimento de brotos de 17.89700 (lote 7), 19.34000 (lote 9), 18.16900 (lote 15) 2 18.75800 mm (lote 21), (Tabela 18).

Tabela 18. Teste de comparação de média quanto ao comprimento da plântula em meio básico MS suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIB, AIA e ANA após 28 dias de cultivo.

AUXINAS μM	COMPRIMENTO DO PLÂNTULA				
	7	9	15	21	MÉDIA
AIB					
1,0	17.2575 cdA	19.9225 bcA	17.7425 bcdA	18.3700 bcA	18.3231 bc
1,5	12.8275 cdA	16.4300 cdA	12.3425 deA	16.2900 cA	14.4725 de
2,5	19.5350 bcA	18.1225 bcA	19.8275 abcA	17.9575 cA	18.8606 bc
AIA					
1,0	26.9425 aAB	28.8075 aA	22.5200 abB	26.9500 aAB	26.3050 a
1,5	24.2150 abA	24.0175 abA	25.2350 aA	25.1250 abA	24.6481 a
2,5	18.2525 bcdA	22.9300 abcA	21.6450 abcA	17.8450 cA	20.1681 b
ANA					
1,0	14.8775 cdA	16.3375 cdA	18.0000 bcdA	13.8925 cA	15.7768 cd
1,5	16.2825 cdA	19.4325 bcA	15.5075 cdeA	17.2350 cA	17.1143 bcd
2,5	17.0000 cdA	17.4875 bcA	18.7650 abcdA	17.1450 cA	17.5993 bcd
Controle					
0	11.7800 dAB	9.9125 dB	10.1050 eB	16.7700 cA	12.14188 e
MÉDIA	17.89700 A	19.34000 A	18.16900 A	18.75800 A	
MG = 18.54100					
CV% = 16.09					

Ao considerar o desempenho das concentrações de auxinas adicionadas ao meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS na etapa de enraizamento *in vitro* a concentração de 1,5 μM de AIA mostrou-se eficiente para o desenvolvimento de raízes com características desejáveis finas e compridas além de promover maiores médias para a variável número de raízes, comprimento de raízes e comprimento de plântulas (Figura 10; Tabela 17 e 18). Entre os híbridos o lote 9 apresentou melhor performance na diferenciação de raízes.

3.3.2 Aclimatização de brotos enraizados de híbridos de *Piper nigrum* L.

As taxas de sobrevivência durante a aclimatização estão interligadas à porcentagem de enraizamento, número e qualidade das raízes provenientes da fase de enraizamento *in vitro* (Figura 12).

As maiores taxas de sobrevivência ocorreram nos tratamentos com AIA, seguido dos tratamentos com AIB e sem auxinas, ambos apresentaram no enraizamento raízes longas e relativamente finas, sendo os tratamentos com ANA os que apresentaram raízes curtas e grossas e que tiveram menores taxas de sobrevivência de brotos enraizados na aclimatização.

Independente dos híbridos estudados, os tratamentos com AIA apresentaram taxas de sobrevivências superiores às demais concentrações de auxinas (Figura 13).

O substrato vermiculita, as condições de cultivo em casa de vegetação para os híbridos dos lotes 9, lote 15 e lote 21 provenientes do meio $\frac{1}{2}$ MS com adição de $1,5 \mu\text{M}$ de AIA tiveram maiores percentuais de sobrevivências com os respectivos valores 93%, 99% e 97%, já para o lote 7 a concentração de $2,5 \mu\text{M}$ de AIA adicionados ao meio $\frac{1}{2}$ MS apresentou percentagem de sobrevivência de plantas superior aos demais tratamentos (95%). (Figura13)

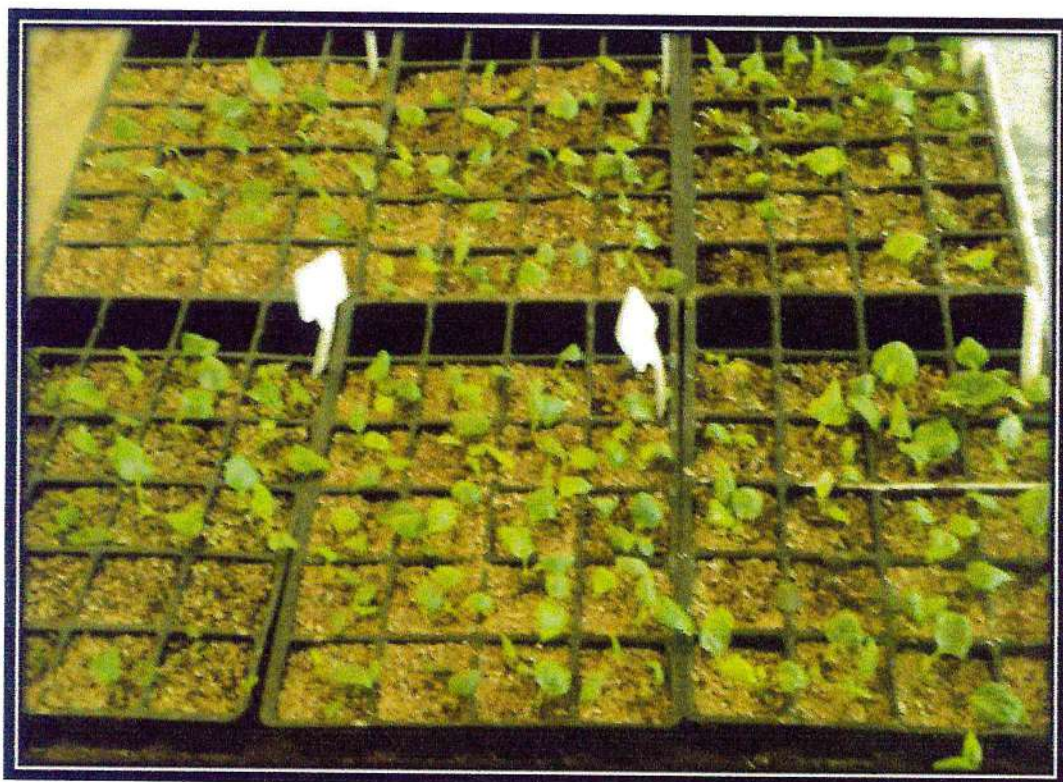
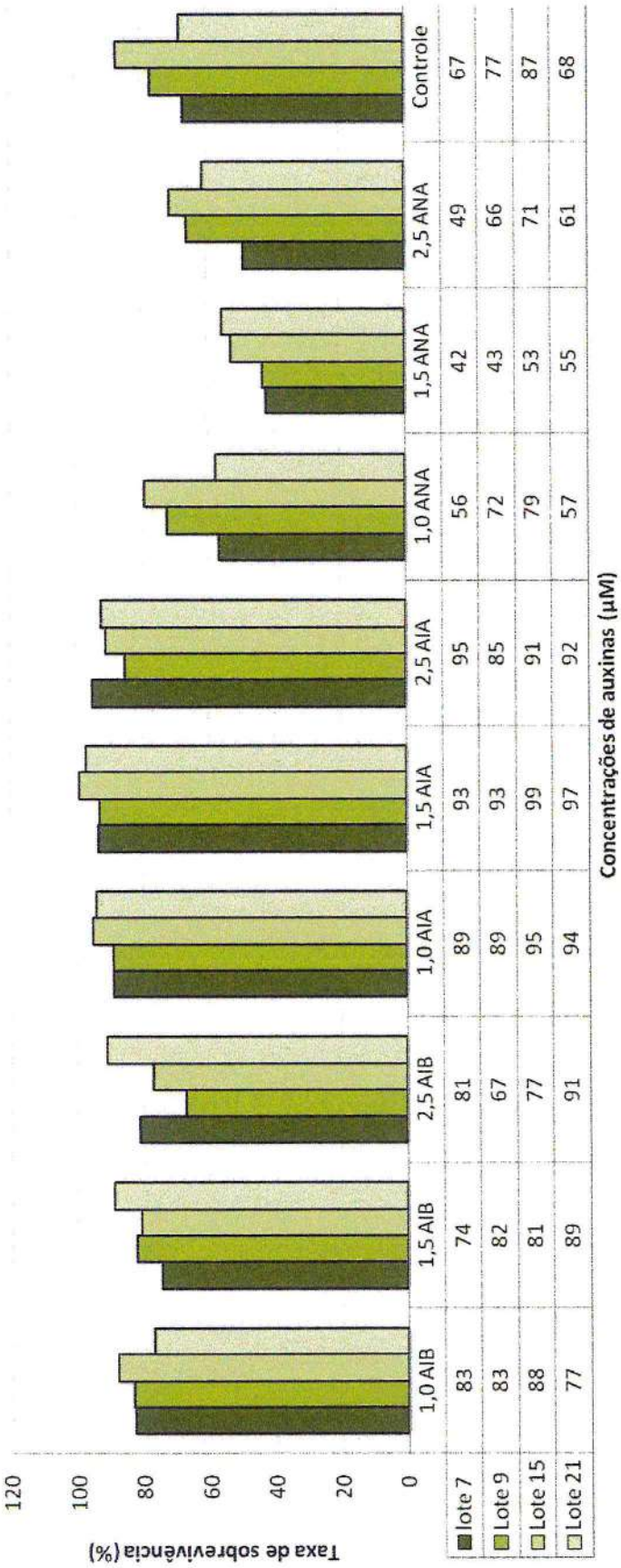


FIGURA 12. Aclimatização de brotos enraizados de híbridos de pimenteira do reino.

Figura 13. Percentual de taxa de sobrevivência de brotos enraizados de híbridos intra e interespecíficos de pimenta do reino provenientes de meios de enraizamento com diferentes concentrações das auxinas AIB, AIA e ANA, aclimatizados *ex vitro* por 28 dias em casa de vegetação.



3.3.3 Formação de mudas de híbrido de *Piper nigrum* L

A taxa de sobrevivência obtidas após 60 dias da etapa de formação de mudas foi de 100% de plantas vivas para todos os híbridos de pimenta do reino em estudo (Figura 14). Este fato evidencia que as plantas que sobreviveram a etapa de aclimatização apresentavam desenvolvimento favorável para a formação de mudas além das condições de cultivo e a utilização de terra preta e matéria orgânica como substrato.



FIGURA 14. Formação de mudas de plantas aclimatizadas de híbridos de pimenteira-do-reino.

3.4 Discussão

Os resultados obtidos durante a fase de enraizamento *in vitro* evidenciam a importância das auxinas no meio ½ MS para o enraizamento de brotos de híbridos de pimenteira-do-reino. No entanto, o tratamento controle sem a adição de auxinas exógena proporcionou de enraizamento sinalizando a síntese endógeno de auxina. Segundo Schwertner *et al.* (2008) houve enraizamento de caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq], uma piperacea, em meio MS isento de reguladores vegetais.

Embora neste trabalho tenha ocorrido a formação de raízes em meio ½ MS sem auxinas, a porcentagem foi inferior quando comparado com os tratamentos com adição de auxinas AIA, AIB e ANA. Estes resultados estão de acordo com trabalhos encontrados na literatura, que apontam a necessidade da inclusão de uma auxina nos meios de cultura para aperfeiçoar o enraizamento de espécies frutíferas, como ameixeira (MAGALHÃES e PETERS, 1991; LEITE *et al.*, 1994) e macieira (CENTELLAS *et al.*, 1999).

As auxinas são substâncias essenciais no cultivo de plantas, pois promovem modificações plásticas na parede celular vegetal durante o processo de divisão celular, permitindo a extensibilidade da célula (LASKOWSKI *et al.*, 2008). Podem também estimular várias respostas fisiológicas quando utilizadas na indução de raízes, folhas, gemas axilares ou apicais, embriões e calos (RODRIGUES E LEITE, 2004; CID, 2010; MERCIER, 2012) e tais respostas podem ser positivas ou negativas no que diz respeito ao enraizamento *in vitro*.

O uso da formulação ½ MS suplementados com auxinas para a diferenciação de raízes pode ter favorecido o enraizamento *in vitro* de híbridos de pimenteira-do-reino. Estudos mostram que uma concentração elevada de sais do MS pode prejudicar o enraizamento de brotos em algumas espécies, o que tem levado alguns pesquisadores a trabalhar com diluições das formulações básicas deste meio (ERIG *et al.* 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Houve diferenças nas respostas entre as concentrações e auxinas, saliente-se que as auxinas mais comuns empregadas nos meios de cultura para o enraizamento *in vitro* são o ANA, AIB e AIA. A diferença entre si, além da parte estrutural da molécula, é a estabilidade que decresce respectivamente.

Os efeitos dos hormônios dependem da concentração, do estágio de desenvolvimento, da interação com outros hormônios e do tipo de órgão ou tecido vegetal (KERBAUY 2008, TAIZ E ZEIGER 2012, JESUS E PERES 2013).

O processo de formação de raiz adventícia ocorre de uma a três semanas e pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongação. As fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o crescimento (elongação) das raízes pode ser inibido pela presença dessa classe de substâncias (MCCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998; LIMA, 2010). Este fato adicionado a estabilidade do ANA, pode estar relacionado com os resultados obtidos nos tratamentos que continham esta auxina onde as raízes obtidas foram curtas e grossas.

As auxinas estão envolvidas na regulação do crescimento e desenvolvimento, principalmente nos processos que determinam a arquitetura das raízes (BIELACH *et al.*, 2012).

No presente estudo, o desempenho do AIA promoveu as maiores porcentagens de brotos enraizados, e a maioria dos tratamentos proporcionou 100% de enraizamento, com destaque o tratamento com 1,5 μM de AIA que induziu 100% de enraizamento para todos os híbridos. Segundo vários autores, o AIA endógeno age como um ativador de genes alavancando a formação precoce do primórdio radicular e a aplicação de auxinas sintéticas favorecem a conjugação entre o AIA endógeno e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação de raízes iniciais (GASPAR E HOFINGER, 1988; ONO E RODRIGUES, 1996; ASSIS E TEIXEIRA, 1998; ALOUFA, 2003).

Além de diferenças na resposta do enraizamento em relação às diferentes concentrações de auxinas, houve diferenças também entre híbridos, onde o lote 9 apresentou melhor desempenho no processo de diferenciação de raízes quanto as variáveis número de raízes, comprimento de raízes, e não diferiu estatisticamente dos demais híbridos quanto a variável comprimento da plântula. Segundo Zanol *et al.* (1997), existem diferenças entre genótipos e sensibilidade para com a auxina no enraizamento de plantas frutíferas.

Lima (2010), em estudo de cana-de açúcar (*Saccharum officinarum*) observou diferenças genotípicas entre a variedade RB 872552 que apresentou maior percentual de enraizamento (82,5%) quando cultivada em meio MS com a concentração de 1,5 μM de AIA.

Souza e Pereira (2007) notaram diferenças no potencial de enraizamento condicionado pelos genótipos de uma mesma espécie, em função tanto da auxina como da dose utilizada.

As plantas com maior altura foram resultantes dos tratamentos em que foi adicionado 1,0 e 1,5 μM de AIA, evidenciando a favorável ação no crescimento dos híbridos intra e interespecífico de pimenteira-do-reino. Segundo Mercier (2008) há participação da auxina no processo de expansão e alongamento celular, resultando em maior altura de plantas.

As diferenças nas respostas de crescimento podem estar, segundo Souto *et al.* (2010), relacionadas com o estágio fisiológico da espécie que responde diferentemente às concentrações utilizadas de auxinas e da aptidão dos tecidos ou células a receberem este estímulo. De acordo com Rahman (2013), as auxinas desempenham papel central e interagem com vários hormônios na regulação, crescimento e desenvolvimento das plantas.

Na etapa de aclimatização, os brotos enraizados provenientes dos meios de enraizamento $\frac{1}{2}$ MS com as auxinas AIA, AIB e sem auxinas respectivamente, apresentaram características desejáveis das raízes, sendo estas finas e longas permitindo assim as maiores taxas de sobrevivência na aclimatização.

A qualidade, número e comprimento de raízes e desenvolvimento da parte aérea são fatores decisivos para a sobrevivência das plantas na aclimatização.

Plantas com maior número de raízes e maior comprimento de parte aérea respondem melhor ao processo de aclimatização *ex vitro*, já que a formação de maior quantidade de raízes possibilitaria aumento da absorção de nutrientes e água, compensando a perda de água devido à pequena espessura da cutícula no início do processo de aclimatização (DEWIR *et al.*, 2005). As raízes são também responsáveis pela fixação das plantas nos substratos e na maioria das espécies são órgãos armazenadores de água, quanto maiores e mais desenvolvidas maior a chance de sobrevivência das plantas *ex vitro* nas fases de aclimatização e formação de mudas.

Silveira (2010) sugerem que uma vez iniciada a rizogênese *in vitro*, pode ocorrer o favorecimento do crescimento das plantas na fase de aclimatização, pela renovação desse sistema radicular.

As condições de cultivo oferecidas na aclimatização dos brotos enraizados mostrou-se favorável, pois variações extremas são desfavoráveis às culturas (VASQUÉZ *et al.*, 2005), como a redução da radiação solar incidente (BURIOL *et al.*,

2005), velocidade do vento (CHAVARRIA et al., 2008), alteração da temperatura do ar, do substrato e da umidade relativa do ar (REIS et al., 2009) promovendo intensa diminuição na taxa de sobrevivência.

O substrato vermiculita também pode estar relacionado as altas taxas de sobrevivências obtidas na aclimatização. O substrato apresenta como característica: elevada capacidade de retenção de água, tornando-a facilmente disponível; distribuição das partículas de tal modo que, ao mesmo tempo que retenham água, mantenham a aeração para que as raízes não sejam submetidas a baixos níveis de oxigênio, o que compromete o desenvolvimento da cultura (EMBRAPA UVA E VINHO, 2006).

3.5 CONCLUSÕES

Este trabalho permite as seguintes conclusões:

- As auxinas aumentam o percentual de enraizamento *in vitro* de híbridos intra e interespecífico de pimenteira-do-reino.

- O AIA a 1,5 μ M induz 100% de enraizamento de brotos de quaisquer híbridos em meio ½ MS .

- Os brotos enraizados em meio de cultura ½ MS com 1,5 μ M e 2,5 μ M de AIA proporcionam elevadas taxas de sobrevivência das plantas de híbridos intra e interespecíficos de pimenteira-do-reino na fase de aclimatização.

- Todas plantas dos híbridos de pimenteira-do-reino em estudo que são aclimatizadas em vermiculita se desenvolvem em mudas em substrato de terra preta e matéria orgânica.

3.6 REFERÊNCIAS

ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-96.

ALOUFA, M. A. I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: Congresso brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 14.; congresso brasileiro de cultura de tecidos de plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais... Lavras**: UFLA, 2003. p. 3-5

BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 367, n. 1595, p. 1469-78, 2012.

BURIOL, G. A.; LAGO, I.; HELDWEIN, A. B.; SCHNEIDER, F. M.; ANDRIOLO, J. L.. Disponibilidade de radiação solar para hortaliças cultivadas em ambiente protegido no período invernal no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.13, p.21-26, 2005.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R. de L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

CHAVARRIA, G.; SANTOS, H. P.; FELIPPETO, J.; MARODIN, G. A. B.; BERGAMASCHI, H.; CARDOSO, L. S.; FIALHO, F. B. Relações hídricas e trocas gasosas em vinhedo sob cobertura plástica. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, p.1022-1029, 2008.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. 2010. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. **Cultivo *in vitro* de Plantas**. Brasília: Embrapa. p. 15-49.

CORREA, L. da R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, v.29, p.315-324, 2004.

CORREA, L. da R., PAIM D.C., SCHWAMBACH, J., FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, v.45, p.63-73, 2005.

De Klerk G-J, Van der Krieken W, De Jong JC. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular Development and Biology-Plant* 35, 189-199.

DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J; PAEK, K. Y. 2005. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. **Plant Growth Regulation**, v.46, p.241-251.

EMBRAPA UVA E VINHO, Sistemas de Produção, 15, ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica Dez./2006

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; HAVES, A. da C. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1/2, p. 61-68, 2004

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). *Adventitious root formation in cuttings*. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117-131.

GEORGE, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background, ***Plant Propagation by Tissue Culture: the background***. Vol. 1. 3.ed., Springer, Dordrecht, p. 2–28.

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

IBGE. 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2014.

JESUS, F. A. ; PERES, L. E. P. 2013. Fisionômica. In: Aluizio Borém; Roberto Fritsche-Neto. (Org.). *Ômicas 360º: Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas*, 1ed. Editora Suprema LTDA. p. 209-242.

KERBAUY, G. B. 2008. *Fisiologia Vegetal*. 2a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda.

LASKOWSKI, M., GRIENEISEN, V. A., HOFHUIS, H., TEN HOVE, C. A., HOGEWEG, P., MARÉE, A. F. M. & SCHERES, B. Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. **PLOS Biology**, v6, n.12, p. 2721-2735, 2008.

LEITE, D.L.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.de L.; NAKASU, B.H. Micropropagação de pereira (*Pyrus* spp.) cultivar Carrick. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.16, n.1, 236-241, 1994.

LIMA, G. V. M. Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento *in vitro* de variedades de cana-de-açúcar (*saccharum officinarum* L.). **Dissertação** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010

LUND, S.T.; SMITH, A.G.; HACKETT, W.P. Cuttings of a tobacco mutant, rae, undergo cell divisions but do not initiate adventitious roots in response to exogenous auxin. **Physiologia Plantarum**, v.92, n°2, p.372-380, 2008.

MAGALHÃES JR. A.M.; PETERS, J.A., Cultura in vitro de ameixeira: Efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina/ PR, v.3, n.1, p.57-61, 1991.

MARUBAKAIDO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.19, n.2, p.199-205, 1997.

MERCIER, H. 2012. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.) **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 431p.

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

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.

OLIVEIRA, Y. de . Pré-aclimatização *in vitro* de abacaxi ornamental. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1647-1653, 2010. Número especial.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants**. 6th ed., New York, .Y.: W.H.Freeman, 944p., 1999.

RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 147, p. 28–35, 2013.

REIS, L. S.; SOUZA, J. L. DE; AZEVEDO, C. A. V. de. Evapotranspiração e coeficiente de cultivo do tomate caqui cultivado em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, p.289-296, 2009.

RIBEIRO, M. de N. O. Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-deleite). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 101-106, 2008.

ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Biosciense Journal**, Uberlândia, v.25, n.1, p.69-74, 2009.

RODRIGUES, T. D. J. D.; LEITE, I. C. Fisiologia vegetal - **Hormônios das plantas**. Jaboticabal: Funep, 2004, 78p.

SANTOS, L.R.R. Ontogênese, multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de quatro cultivares de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). 2012. 83 f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.

SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E.O.; HIDALGO, A.F.; ZAFFARI, G.R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, n.1, p.76-81, 2008.

SILVEIRA, D. G. Development of micropropagated shoots and plants of Caroá in different substrates. **Acta Horticulturae**, v. 865, p. 305-313, 2010.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p.179-185.2010.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 2012. **FISIOLOGIA VEGETAL**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed

VASQUÉZ, M. A. N.; FOLEGATTI, M. V.; DIAS, N. DA S.; SILVA, C. R. Efeito do ambiente protegido cultivado com melão sobre os elementos meteorológicos e sua relação com as condições externas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.25, p.137-143, 2005.

ZANOL, G.C. et al. Efeito de diferentes concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira cv.