

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Piper aduncum* L.¹

Gilvania Maria FERREIRA²
Milton Guilherme da Costa MOTA³
Irenice Maria dos Santos VIEIRA⁴
Maria do Socorro Farias BATISTA⁵
Sheila Patrícia Gomes da SILVA⁶
Carmen Célia Costa da CONCEIÇÃO⁷

RESUMO: *Piper aduncum* é uma planta selvagem, com ação fungicida, bactericida e moluscicida utilizada na Amazônia para o controle de vários tipos de doenças. Para domesticação desta espécie há necessidade de estudo sobre sua propagação. Técnicas de cultura de tecido, como micropropagação, têm sido usadas para a propagação de espécies vegetais. Este trabalho tem como objetivo avaliar a micropropagação de *Piper aduncum* em diferentes concentrações de ANA e BAP. O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFRA e utilizaram-se segmentos nodais oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*. Os segmentos foram inoculados em meio MS contendo sacarose a 3%, phytigel 0,2% e pH ajustado para 5,8. Foram testadas diferentes concentrações de reguladores de crescimento ANA + BAP. Ocorreu a formação de calos nas diferentes concentrações de reguladores, entretanto com maior eficiência para concentração 1,5mg.L⁻¹ BAP e 0,75 mg.L⁻¹ ANA. A testemunha, sem regulador de crescimento, produziu plântulas normais. Os reguladores de crescimento não mostraram eficiência na proliferação de brotações em segmentos nodais de *P. aduncum*.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Fitorregulador, Cultura de Tecido, Planta Medicinal

IN VITRO PROPAGATION OF *Piper aduncum* L.

ABSTRACT: The *Piper aduncum* is a wild plant that has fungicide, bactericide and moluscicida action. In the Amazon region, it is used to control several types of diseases. For domestication of

¹ Aprovado para publicação em 21.09.2005

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP pelo primeiro autor, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia – Biologia Vegetal Tropical (FCAP/CNPq) plantg@ig.com.br

² Bióloga, M.Sc. em Agronomia, Área de concentração Biologia Vegetal Tropical.

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Adjunto da UFRA.

⁴ Bioquímica, Dra., Professora Adjunta da UFRA.

⁵ Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Agronomia/ Biologia Vegetal Tropical.

⁶ Engenheira Agrônoma, M.Sc. em Agronomia/ Biologia Vegetal Tropical.

⁷ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Técnica Administrativa da UFRA.

this specie there is need of knowledge about his propagation. Techniques of tissue culture, as micro propagation, have been used for propagation of vegetable species. The objective of this work was to evaluate the micro propagation of *Piper aduncum* in different concentrations of ANA and BAP. The experiment was courrier out in the Vegetable Biotechnology Laboratory of UFRA using node segments from cultivated plants in vitro. The segments were inoculated in medium MS containing saccharose (3 %), phytagel (0,2 %) and the pH adjusted to 5.8. Different concentrations of growing regulators ANA + BAP were tested. Callus was formed in different concentrations of regulators with more efficiency in the concentrations of 1,5mg.L-1 BAP and 0,75mg.L-1 ANA. The control tretment, without growing regulators, produced normal plants. The growth regulators did not show any efficiency in the proliferation of sprouting in node segments of *P. aduncum*.

INDEX TERMS: Tissue Culture, Growth Regulator, Medicinal Plant

1 INTRODUÇÃO

Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L., família Piperaceae) ocorre naturalmente na Amazônia em áreas de vegetação secundária (MOTA et al., 2001). Nesta região apresenta amplo uso popular na cura de diferentes doenças (VIEIRA, 1991). Contém no óleo essencial, o composto natural dilapiol, em elevada concentração, cerca de 97% (MAIA et al., 1998), cujas atividades moluscicida (ORJALA et al., 1993), inseticida (BERNARD et al., 1995) e fungicida (BASTOS, 1997) têm sido comprovadas.

Piper aduncum é um arbusto de 2 a 7 metros. As folhas são membranáceas, elípticas, ápice curtamente acuminado, base assimétrica arredondada ou codiforme, opacas em ambas as faces, sendo a inferior finamente pubescente. As espigas são alongadas com 7 a 14 cm de comprimento e 2,5 a 3,4 mm de diâmetro, com flores minúsculas e frutos obpiramidais (BERG, 1993).

Naturalmente a espécie propaga-se de forma assexuada (FERREIRA et al., 2002). Entretanto, o desenvolvimento de um sistema de propagação assexuada permitiria a clonagem de matrizes com alta capacidade de produção de óleo essencial, viabilizando o cultivo em escala comercial.

A domesticação desta espécie selvagem e seu uso em sistemas de produção agroflorestais, passa pelo desenvolvimento de sistemas de propagação (PAIVA; VALOIS, 2001). A micropropagação surge como técnica alternativa para fixação de genótipos em programas de melhoramento e produção comercial de mudas (REINART; BAJAJ, 1977; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994).

Em outras espécies de *Piper* (pimenta-do-reino), tem sido feita a micropropagação através do uso de AIA, ANA e BAP e AIB (MENEZES, 1997).

O trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de segmentos nodais da *Piper aduncum* quando submetidas a dife-

rentes combinações de ANA e BAP, visando obter a melhor técnica para propagação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFRA.

Para realização do experimento, foram utilizados segmentos nodais de 1,5 a 2cm de comprimento oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. Sob câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram excisados das plântulas por meio de pinças e bisturi. Depois, inoculados em tubos de ensaio de vidro contendo meio nutritivo MS com 0,2% de phytigel, sacarose a 3% e acrescido de reguladores de crescimento ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina), (Tabela 1) tendo o pH ajustado para 5,8. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, num esquema fatorial 5 x 3, com 10 repetições, onde os fatores foram cinco combinações de BAP + ANA (Tabela 1) e três períodos de avaliação (30, 60 e 90 dias). Cada repetição foi constituída por um explante num tubo de ensaio com dimensões de 25 x 150mm, contendo 10 mL de meio de cultura de cada tratamento. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz/ dia. Os parâmetros de avaliação consistiram na determinação do peso da massa de calo fresca e comprimento do caule.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 encontra-se o resumo da análise da variância para o comprimento de parte aérea de plântulas de *P. aduncum* propagadas *in vitro* e avaliadas aos 30, 60 e 90 dias. Pela análise da variância verificou-se que havia diferenças altamente significativas entre os fitorreguladores, entre os dias de avaliação e para a interação fitorreguladores x dias. Nos desdobramentos da interação só houve diferença estatística significativa entre fitorreguladores dentro de 60 dias (A/B_2), entre fitoreguladores dentro de 90 dias (A/B_3) e entre dias dentro da testemunha (B/A_1).

Em todos os tratamentos houve produção de parte aérea, sendo que na testemunha (sem regulador de crescimento) os segmentos nodais desenvolveram plântulas inteiras.

Na Tabela 3 estão os valores das médias para o comprimento (cm) da parte aérea de plântulas de *P. aduncum in vitro* e avaliadas em diferentes períodos. Em média, a testemunha foi superior a todas as combinações, pelo teste de Tukey, não havendo diferença estatística significativa entre as quatro combinações de BAP + ANA.

Considerando a interação fitorreguladores dentro de dias aos 60 e 90 dias a testemunha foi estatisticamente superior às demais combinações de ANA e BAP, não havendo diferença significativa entre as combinações aos 30 dias (Tabela 3).

Considerando a interação dias dentro de fitorreguladores, somente na testemunha verificou-se diferença estatística significativa entre os dias de avaliação, sendo as médias aos 60 e 90 dias semelhantes entre si e ambas superiores àquelas verificadas aos 30 dias. Após os 60 dias houve uma tendência à estabilização do crescimento, sendo que alguns tratamentos aos 90 dias apresentaram médias ligeiramente inferiores as de 60 dias. Ressalte-se que as plântulas medidas aos 60 dias e 90 dias não eram as mesmas, atribuindo-se essa diferença aos explantes utilizados.

Nas Tabelas 2 e 4 encontram-se o resumo da análise da variância e as médias, respectivamente, para peso de massa fresca de calos de *P. aduncum* produzidos em diferentes combinações de BAP + ANA e avaliados aos 30 dias, 60 e 90 dias.

Verificou-se que em todas as combinações de BAP + ANA houve produção de calos, a exceção na testemunha (sem reguladores de crescimento) onde foram produzidas plântulas (Tabela 4).

Pela análise da variância encontraram-se diferenças estatísticas significativas entre combinações de fito- reguladores, entre períodos de avaliação e para interação fitoreguladores x dias de avaliação. Entre as diferentes combinações de fitorreguladores (Tabela 4), verificou-se que em $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, os calos pesaram em média $3,20 \text{ g}$, diferindo dos demais pelo Teste de Tukey. Nesta situação, todas as combinações de fitoreguladores foram

estatisticamente diferentes da Testemunha (sem fitorregulador), a qual não produziu calo.

Quanto ao período de avaliação, estes diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, detectando-se crescimento significativo ao longo do período de avaliação, atingindo os calos à média de $3,52 \text{ g}$ ao final dos 90 dias (Tabela 4).

Com relação aos desdobramentos de dias de avaliação dentro de combinações de BAP + ANA, só não houve diferença significativa para dias de avaliação dentro da testemunha, que não produziu calos. Nos demais desdobramentos as diferenças foram altamente significativas pelo Teste F (Tabela 2), com destaque para a combinação $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA aos 90 dias (Tabela 4).

Nos desdobramentos, as combinações de BAP + ANA dentro de dias de avaliação só não houve diferença estatística significativa entre combinações dentro de 30 dias. Aos 60 dias todas as combinações produziram efeitos semelhantes sendo superiores à testemunha (sem reguladores). Aos 90 dias a combinação $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA foi superior às demais combinações, as quais não diferiram entre si, mas foram superior à testemunha na produção de calos.

Neste trabalho, nos diferentes balanços entre BAP e ANA ocorreram desenvolvimento de parte aérea e calo, porém, praticamente não ocorreu formação de raízes com exceção para a testemunha, onde houve

formação de plântulas inteiras. Pescador et al. (2000), trabalhando com pimenta longa (*Piper hispidinervium*), uma espécie semelhante a *Piper aduncum*, obteve grande produção de raiz em todos os tratamentos, ocorrendo maior peso de raiz aos 60 dias de cultivo na combinação 2,61 μ M de ANA + 4,44 μ M BAP.

Neste trabalho, somente o tratamento sem fitorreguladores formou plântulas inteiras, as quais tiveram peso médio de 0,08 g, 0,07g e 0,29g, e o peso da raiz de 0,023g, 0,019g e 0,012g, aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Com relação ao tamanho da parte aérea das plântulas

produzidas a maior média no trabalho de Pescador et al. (2000) foi para o tratamento sem regulador de crescimento aos 60 dias de cultivo, resultado este que está de acordo com o obtido neste trabalho. Isto significa que os explantes usados em ambos trabalhos possuem quantidades suficientes de fitorreguladores para crescimento.

Neste trabalho a maior produção de calo foi obtida no meio MS suplementado com 1,5 mg.L⁻¹ BAP + 0,75 mgL⁻¹ ANA aos 90 dias, com fase possível fase estacionária do crescimento do calo nos demais tratamentos entre os 60 e 90 dias, (Tabela 4), embora a curva de crescimento não tenha sido estabelecida.

TABELA 1 - Concentrações e combinações de reguladores de crescimento BAP e ANA utilizados nos tratamentos. FCAP. Belém (PA), 2001.

Fitorregulador (mg.L ⁻¹)	BAP	+	ANA
A1	0,0	+	0,0
A2	1,0	+	0,5
A3	1,5	+	0,5
A4	1,0	+	0,75
A5	1,5	+	0,75

TABELA 2 - Resultados da análise da variância para comprimento (cm) da parte aérea (CPA) e peso (g) de massa fresca de calos (PC) de *P. aduncum* nas diferentes concentrações e combinações de reguladores de crescimento, em três períodos de avaliação. FCAP, Belém (PA), 2001.

Fonte de Variação	GL	QM	
		CPA	PC
Tratamento	14	40,2486	4,0380
Fitoreguladores (A)	4	166,5228**	5,3687**
Dias (B)	2	52,8802**	3,1931**
AXB	8	37,0662**	1,0838**
B/A1	2	104,7004**	0,0000ns
B/A2	2	0,5743n.s	2,7244**
B/A3	2	0,5183n.s	3,4638**
B/A4	2	0,0742n.s	3,9457**
B/A5	2	0,2196n.s	7,3943**
A/B1	4	0,1894n.s	0,1441ns
A/B2	4	62,9096**	2,5004**
A/B3	4	63,8263**	4,8918**
RESÍDUO	123	0,5274	0,0610

B1=30 dias; B2= 60 dias; B3=90 dias

TABELA 3 - Valores médios para o comprimento (cm) da parte aérea de plântulas de *Piper aduncum* “in vitro” e avaliadas em diferentes períodos. FCAP, Belém (PA), 2002.

Fitoregulador (A) Mg.L ⁻¹	Dias (B)			† Média
	30	60	90	
0,0 BAP + 0,0 ANA	1,1100	7,07	7,00	5,06
1,0 BAP + 0,5 ANA	0,7800	1,21	1,22	1,07
1,5 BAP + 0,5 ANA	0,8100	1,26	0,90	0,99
1,0 BAP + 0,75 ANA	1,0333	1,09	1,21	1,11
1,5 BAP + 0,75 ANA	0,8600	1,08	0,80	0,91
†† Média	0,91	2,34	2,22	-

† DMS Tukey $p < 0,01 = 0,54$

A/B DMS Tukey $p < 0,01 = 0,95$

†† DMS Tukey $p < 0,01 = 0,36$

B/A DMS Tukey $p < 0,01 = 0,81$

TABELA 4 - Valores médios para peso (g) de massa fresca de calos de *Piper aduncum*, referentes às combinações de reguladores de crescimento e avaliadas em diferentes períodos. FCAP, Belém (PA), 2002.

Fitoregulador (A) mg.L ⁻¹	Dias (B)			†Média
	30	60	90	
0,0 BAP + 0,0 ANA	0,00	0,00	0,00	0,00
1,0 BAP + 0,5 ANA	0,60	3,50	3,64	2,43
1,5 BAP + 0,5 ANA	0,32	2,32	3,89	2,18
1,0 BAP + 0,75 ANA	0,28	3,09	3,72	2,36
1,5 BAP + 0,75 ANA	0,28	2,98	6,36	3,20
††Média	0,29	2,29	3,52	-
† DMS Tukey p<0,01= 0,74		B/A DMS Tukey p<0,01=1,10		
†† DMS Tukey p<0,01= 0,49		A/B DMS Tukey p<0,01=1,28		

4 CONCLUSÃO

O uso de reguladores de crescimento ANA E BAP, em diferentes concentrações testadas, não mostraram eficiência para proliferação de brotações em segmentos nodais de *P. aduncum*. A combinação de 1,5 mg.L⁻¹ e 0,75 mg.L⁻¹ ANA foi mais eficiente na formação de calos aos 90 dias de avaliação.

REFERÊNCIAS

- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinepellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.
- BERG, M. E. van den. *Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 2.ed. Belém: MPEG, 1993. p. 62-66.
- BERNARD, C. B. et al. Inseticidal defenses of piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology*, v. 21, p. 801-814, 1995.
- FERREIRA, G.M. et al. Germinação de sementes de pimenta-de-macaco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., 2002, Uberlândia. Uberlândia: Sociedade de Olericultura do Brasil, 2002. 1 CD-ROOM.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon Region. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 13, p. 269-272, 1998.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. *Princípios de biotecnologia em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 344.

MENEZES, I.C. *Morfogênese in vitro em tecido somático de pimenta-do-reino (Piper nigrum L.)*. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - UFPA, Belém, 1997.

MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; MAIA, J. G. S.; GAIA, J. M. D. *Coleta de germoplasma de Piper aduncum L. na Amazônia brasileira*. In.: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE. 3., 2001. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p. 192 – 194.

ORJALA, J. et al. 5 new prenylated P-Hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medica*. v. 59, n. 6, p. 546 – 551, 1993.

PAIVA, J. R; VALOIS, A. C. C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In.: NASS, L. L. et al. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183p.

PESCADOR, R. et al. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 15, p. 18-23, 2000.

REINART, I.; BAJAJ, Y. P. S. *Plant cell. tissue and organ culture*. Berlin: Springer-Verlag, 1977. 463 p.

VIEIRA, L. S. *Manual de medicina popular: a fitoterapia da Amazônia*. Belém: FCAP, 1991. p. 11.