

Artigo original

CULTIVO IN VITRO DE *PIPER ADUNCUM* ESPÉCIE COM POTENCIAL ECONÔMICO DA AMAZÔNIA SUL-OCIDENTAL

Andrea R*

Embrapa Gado de Corte/CRBio
<https://orcid.org/0000-0001-9640-4218>

Yamura RBT†

Embrapa Acre/CREA AC
<https://orcid.org/0000-0002-8841-0324>

Silva DA‡

Escola Lorival Sombra Pereira Lima/CRBio
<https://orcid.org/0000-0003-0686-1533>

Vasconcelos JM§

Rede Bionorte/CRBio
<https://orcid.org/0000-0001-7969-9894>

Manfio CE¶

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural/CREA-SC
<https://orcid.org/0000-0003-4089-6502>

* Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP); Pesquisadora na Embrapa Gado de Corte onde atua no Laboratório de Biotecnologia Vegetal; Bióloga; Avenida Rádio Maia 830, Vila Popular, 79106-550, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil; andrea.raposo@embrapa.br

† Mestre em Engenharia de Processos pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Graduada em Engenharia de Segurança do Trabalho pela Faculdade de Ciências Aplicadas Dr. Leão Sampaio; Analista de pesquisa na Embrapa Acre; renata.beltrao@embrapa.br

‡ Licenciada em Ciências Biológicas pela União Educacional do Norte; Professora na Escola de Ensino Fundamental e Médio Lourival Sombra Pereira Lima; denise.arrudaa@hotmail.com

§ Doutoranda pelo Programa de Pós-graduação Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Ocidental/Rede Bionorte da Universidade Federal do Acre; Bióloga; janamv_88@hotmail.com

¶ Pós-doutora em Melhoramento de Plantas pela Universidade Federal de Viçosa e Universidade de Cruz Alta; Doutora em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa; Pesquisadora na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina; candidamanfio@epagri.sc.gov.br

Resumo: A pimenta de macaco (*Piper aduncum*) é uma espécie nativa da Amazônia, que possui grande potencial econômico em razão de o seu óleo essencial conter substâncias bioquímicas com propriedades fungicida e inseticida. Seu cultivo é sustentável, podendo ser explorado de forma não destrutiva e renovável. Com a crescente demanda para a produção de óleo essencial dessa espécie, existe a necessidade da implantação de cultivos comerciais, e com isso se tem como limitação a oferta de mudas em quantidade e com qualidade. A produção de mudas em laboratório por meio da micropropagação supre tal necessidade, já que permite a obtenção de material isento de doenças e em larga escala. O objetivo deste trabalho foi verificar os parâmetros necessários para o cultivo in vitro de sementes dessa espécie. Foram realizados três experimentos: germinação e crescimento inicial, multiplicação e enraizamento in vitro. Foram utilizados os meios de cultura MS e WPM em diferentes concentrações salinas. Para multiplicação in vitro foram testadas quatro citocininas em cinco diferentes concentrações, e para o enraizamento in vitro foram utilizados três tipos de auxinas em seis diferentes concentrações. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro. Verificou-se que a germinação in vitro das sementes de *P. aduncum* deve ser realizada se utilizando sais do meio MS; para a multiplicação e o enraizamento in vitro não é necessária a adição de reguladores de crescimento nesse meio, provavelmente os níveis endógenos desses reguladores nos explantes são suficientes para suprir suas necessidades de crescimento e desenvolvimento. Observou-se também que a utilização de citocininas propicia o aparecimento de calos na base dos explantes.

Palavras-chave: Reguladores de crescimento. Piperaceae. Cultivo in vitro.

***In vitro* culture of *Piper aduncum* species with economic potential of South Western Amazon**

Abstract: *Piper aduncum*, popularly known as pimenta de macado is a species native to the Amazonian, that has great economic potential due to the essential oil has biochemical substances with fungicidal and insecticidal properties. Its cultivation is sustainable, can be exploited in a form non destructive and renewable. With the growing demand for production of essential oil of this species there is a need to implantation of commercial crops, and consequently the limitation is the offer of seedlings in quantity and quality. The production of seedlings in laboratory for micropropagation supplies this need, allowing obtain seedlings disease-free and produced on a large scale. The work aimed to check the parameters necessary for the in vitro cultivation of seeds this species. Three experiments were performed: germination and initial growth; in vitro multiplication and rooting, for in

in vitro germination and initial growth the culture media used were MS and WPM culture media in different salt concentrations, for *in vitro* multiplication, four cytokinins were tested at five different concentrations and for *in vitro* rooting three auxin were used in six different concentrations. All variables were submitted to analysis of variance and, when the *F* value was significant, a comparison of the means by the Tukey Test at the 5% probability level of error was used for qualitative treatments. For the quantitative treatments, a polynomial regression analysis was performed at the 5% error probability level. The result indicate that *in vitro* germination of *P. aduncum* seeds should be using salts of MS medium for multiplication and *in vitro* rooting is not necessary to the addition of growth regulators in this medium, probably the endogenous levels of these regulators in explants are sufficient to provide their growth and development needs. It was also observed that the use of cytokinins facilitates callus formation at the base of explants.

Keywords: Regulators growth. Piperaceae. *In vitro* cultivate.

Recebido em 14 de fevereiro de 2019

Aceito em 17 de setembro de 2019

1 INTRODUÇÃO

A pimenta de macaco (*Piper aduncum*) é uma espécie nativa da Amazônia, pertencente à família botânica Piperaceae, caracteriza-se por ser uma planta que possui grande potencial econômico em razão de o seu óleo essencial possuir substâncias bioquímicas (dilapiol, linalool, nerolidol, entre outras) que podem ser utilizadas como: fungicida,^{1,2,3} inseticida e larvicida,^{4,5} além de molusquicida,⁶ parasiticida^{7,8,9} e antibiótico.¹⁰ Apresenta potencial sinérgico quando combinada com inseticidas convencionais, fazendo o inseto perder a capacidade de criar resistência ao inseticida e, com isso, eleva o desempenho dele e reduz sua quantidade utilizada.

Seu cultivo é sustentável, podendo ser explorada de forma não destrutiva, haja vista que o óleo é obtido a partir de suas partes aéreas e ramos finos. Possui alta capacidade de rebrota, sendo possível realizar diversos cortes ao longo dos anos, caracterizando um sistema de produção ambientalmente correto, tendo a vantagem, com relação a outras culturas, de dispensar a necessidade de novos plantios a cada ano.¹¹

Entre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a mais amplamente utilizada, especialmente para a produção de mudas em espécies medicinais,

ou com algum potencial de interesse econômico. É uma técnica capaz de proporcionar a propagação de um elevado número de plantas, em curto espaço de tempo e de alta qualidade genética e fitossanitária.¹²

Com a crescente demanda para a produção de óleo essencial dessa espécie, existe a necessidade da implantação de cultivos comerciais, e com isso se tem como limitação a oferta de mudas em quantidade e qualidade. Portanto, a produção em laboratório por meio da micropropagação é uma alternativa que deverá ser utilizada para multiplicar linhas clonais obtidas a partir de sementes plantadas de matrizes selecionadas e germinadas *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi verificar os parâmetros necessários para o cultivo *in vitro* desta espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, dividido em três experimentos: germinação e crescimento inicial, multiplicação e enraizamento *in vitro*.

Para as condições gerais de cultivo foram utilizados tubos de ensaio com capacidade de 110 mL (contendo 10 mL de meio) ou frascos de vidro com capacidade de 250 mL (contendo 30 mL de meio), sendo fechados com tampas de polipropileno. O pH dos meios de cultivo utilizados em todos os experimentos era aferido e ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, e esta ocorria durante um período de 15 minutos a 1,1 Kgf.cm⁻², em temperatura de 121 °C. Todos os meios de cultivos eram suplementados com sacarose (30 g.L⁻¹) e solidificados com ágar (6 g.L⁻¹). Após a inoculação nos tratamentos os frascos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura controlada de 25±2 °C, com intensidade luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, expostos ao fotoperíodo de 16 horas de luz.

2.1 GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL IN VITRO

Esse experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 24 repetições por tratamento. Foram testadas 3 concentrações salinas (25%(1/4), 50%(1/2) e 100%(1)) e 2 tipos de meio de cultura, MS¹³ e WPM¹⁴ (Wood Plant Médium), em um esquema bifatorial, sendo a unidade experimental composta por um tubo

de ensaio de 110 mL de volume, contendo 10 mL de meio e uma semente. As sementes de *P. aduncum* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre foram previamente desinfestadas em água corrente com detergente por cinco minutos, e, em seguida, submetidas a três lavagens em água destilada e esterilizada. Posteriormente, o material foi conduzido à câmara de fluxo laminar e mergulhado em álcool etílico a 70% (v/v), durante um minuto, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 minutos e após lavado três vezes em água destilada e autoclavada, sendo imediatamente inoculado nos tratamentos.

Aos 90 dias foram realizadas avaliações referentes à taxa de germinação, sendo avaliados os parâmetros: Comprimento da Parte Aérea (CPA), Comprimento da Parte Radicular (CPR), e Número de Nós (NN) e relação CPR e CPA.

2.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Foram testadas cinco concentrações (0; 2,5; 5; 10; 20 μM) e quatro tipos de citocininas (2-isopentiladenina (2iP), 6-benzilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN) e tidiazuron (TDZ)), em um esquema bifatorial, sendo a unidade experimental composta por um frasco de 250 mL de volume, contendo 30 mL de meio e quatro explantes (segmentos nodais). Os explantes eram oriundos do primeiro subcultivo de *P. aduncum*, e as plântulas germinadas in vitro possuíam entre 1 e 2 cm e apresentavam um nó.

Após 50 dias foram avaliados o Número de Brotos (NB), a Altura do Maior Broto (AMB), o Número de Nós (NN) e a Porcentagem de Calos (PC).

2.3 ENRAIZAMENTO IN VITRO

O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento. Foram testadas seis concentrações (0; 1,33; 2,7; 4; 5,3; 10,7 μM) de três tipos de auxinas (ácido indolbutírico (AIB), ácido indolacético (AIA) e ácido nafatalenoacético (ANA), em um esquema bifatorial, sendo a unidade experimental composta por um frasco de 250 mL de volume, contendo 30 mL de meio e quatro explantes

(segmentos nodais). Os explantes eram oriundos do primeiro subcultivo de *P. aduncum* plântulas germinadas in vitro.

Após 50 dias de incubação, foram avaliadas a porcentagem de enraizamento, o Comprimento da Raiz Principal (CRP), o Comprimento da Parte Aérea (CPA,) o Número de Folhas (NF) e o Número de Raízes (NR).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1.15 Os gráficos foram elaborados no Microsoft Office Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL

No presente trabalho foi verificado que a germinação in vitro de *P. aduncum* ocorreu em todos os meios de cultura avaliados (Tabela 1). Observou-se que os tratamentos que utilizaram os sais do meio de cultura MS proporcionaram maiores taxas de germinação do que os que utilizaram os sais do meio WPM, e que não ocorreu diferença estatística na germinação entre os tratamentos utilizando os mesmos sais.

O meio de cultura MS¹⁶ é frequentemente utilizado para espécies herbáceas, sua concentração salina possui maiores quantidades de nutrientes, em especial de nitrato e amônia. O meio WPM é mais utilizado para espécies lenhosas e possui maiores concentrações de potássio e íons sulfato.¹⁷

Tabela 1 – Germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de *P. aduncum* após 90 dias de cultivo em diferentes concentrações salinas dos meios de cultura MS e WPM

Tratamento	% germinação	CPA	CPR	NN	Relação CPR/CPA
MS	67 a	12,68 ab	36,44 ab	2,50 a	2,87
½ MS	62 a	14,90 a	25,66 ab	2,86 a	1,72
¼ MS	62 a	15,16 a	22,50 b	2,33 a	1,48
WPM	38 b	6,94 b	29,24 ab	1,23 b	4,21
½ WPM	34 b	6,87 b	34,21 ab	1,12 b	4,98
¼ WPM	38 b	5,69 b	42,91 a	1,00 b	7,54

* Nota: Letras diferentes comparadas na vertical indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey (ao nível de 5% de significância). CPA: Comprimento da Parte Aérea, CPR: Comprimento da Parte Radicular e NN: Número de Nós.

Em trabalho¹⁸ com essa mesma espécie os meios MS ¼ e ¾ foram os que proporcionaram melhor desenvolvimento in vitro após 35 dias de estabelecimento. O meio MS possui maior concentração salina quando comparado com o WPM, e com isso maior interferência no potencial osmótico, o que pode interferir na germinação in vitro das sementes por não fornecer água necessária para sua embebição.¹⁹ Neste estudo este fato não foi observado, já que as sementes que estavam nos tratamentos contendo o meio MS apresentaram melhor germinação quando comparados com os tratamentos contendo o meio WPM (Tabela 1). Os menores índices de germinação do meio WPM podem ser resultado da falta de algum nutriente, já que esse meio possui concentrações salinas reduzidas quando comparado com o meio MS.

Outro estudo²⁰ alcançou 92,7% e 94,8% de germinação de sementes de *P. hispidinervum* com os meios de cultura MS e WPM, respectivamente. A alta taxa de germinação é atribuída à existência de reservas nas sementes suficientes para a emergência, não se utilizando os nutrientes do substrato nessa etapa inicial.

Ao estudar²¹ o estabelecimento in vitro de *Dipteryx alata*, utilizando diversas concentrações do meio de cultura MS, esta afeta a germinação, o número de explantes formados e a matéria seca das raízes. Também, à medida que a concentração salina no meio aumentou, ocorreu uma diminuição no número de plantas formadas. Essa redução favoreceu a absorção de água pelas plantas sobreviventes, melhorando seu desenvolvimento. Já em estudos²² com *Billbergia zebrina*, uma bromeliácea com

importância comercial, a concentração salina e de sacarose afeta diretamente a resposta morfogênica das plantas; quanto maior a concentração salina, maior a formação de brotos.

Em estudos¹⁹ de germinação in vitro em sementes de *Melissa officinalis* utilizando os meios MS, MS 1/2 e 1/4, foi verificado que o meio MS 1/2 apresentou maior porcentagem de germinação, enquanto que o meio MS possibilitou plântulas com maior comprimento. Embora maiores concentrações salinas no meio de cultura possam reduzir a germinação, vão produzir plântulas maiores, mais vigorosas, pois ocorre maior disponibilidade de nutrientes e vitaminas, proporcionando, assim, melhor desenvolvimento das plântulas presentes naquele meio.

No presente trabalho também se pode observar que todos os tratamentos que utilizaram sais do meio MS apresentaram valores superiores e estatisticamente significativos para o Número de Nós (NN) após 90 dias de cultivo in vitro.

O caule é constituído pela gema apical, gemas axilares, nós e entrenós. Os nós são regiões das quais partem as folhas e as gemas axilares, estas são constituídas por meristemas primários que possuem células indiferenciadas que se encontram em estágio embrionário. A²³ grande vantagem da utilização de gemas laterais como fonte de explante é que, por envolver órgãos meristemáticos pré-formados, tem-se maior estabilidade genética das plantas que serão micropropagadas.

Na micropropagação, plantas que apresentam maior número de segmentos nodais ou gemas axilares são preferidas, ao se considerar que esses tipos de propágulos possuem menor variação somaclonal e epigenética, além de possibilitarem maior taxa de multiplicação.²⁴ Neste trabalho não foram observadas plântulas anormais.

Com o aumento dos sais no meio de cultura, ocorre aumento no número de folhas das plântulas e redução no número de raízes em batatas cultivadas in vitro.²⁵ Esse fato se deve à quantidade de nitrogênio no meio de cultura, quanto maior a concentração desse elemento no meio, maior incremento na parte aérea e redução no número de raízes das plântulas formadas. Os tratamentos que utilizaram o meio MS apresentaram os maiores CPAs, fato que corrobora os resultados de Bandinelli, Bisognin, Gnocato, Mambrin, Sausen e Nicoloso.²⁵

A relação entre CPR e CRP foi mais baixa nos tratamentos que utilizaram os sais de meio MS (Tabela 1). O equilíbrio no desenvolvimento entre caule e raízes é vantajoso para o crescimento inicial in vitro, considerando que ambos possuem funções complementares na sobrevivência geral das plantas. Ledo, Seca, Barboza e Silva Junior²⁶ observaram esse equilíbrio em plântulas de mangabeira em todos os tratamentos.

Para o comprimento da parte aérea, observa-se na Tabela 1 que o meio MS proporcionou plântulas maiores e com uma relação CPR e CPA mais equilibrada, além de apresentar diferença significativa para a germinação e o número de nós, o que vai provavelmente elevar a taxa de multiplicação na próxima etapa.

O processo de germinação é um mecanismo natural que depende da viabilidade das sementes e de condições ambientais favoráveis. Na germinação in vitro, além da temperatura e do fotoperíodo, o tipo de meio de cultura utilizado pode interferir no resultado final desse processo, sendo esse último um dos fatores mais importantes para que ocorra o sucesso da propagação in vitro.

Diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas na cultura in vitro, as quais diferem entre si basicamente com relação à concentração dos sais. Os sais e açúcares que compõem o meio, além de promoverem a nutrição, influenciam também na morfogênese e no crescimento celular por interferirem nas propriedades osmóticas da solução.¹⁵

A adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio. Portanto, quanto maior a concentração de sais no meio de cultura, menor será o seu potencial osmótico e, conseqüentemente, a disponibilidade de água para o explante.¹⁵

3.2 MULTIPLICAÇÃO IN VITRO

Não houve interação entre os fatores estudados, no entanto, para os fatores separadamente, sim. Como se pode observar na Figura 1 das quatro citocininas estudadas, não foi observada massa calogênica somente com a utilização da KIN; já com o uso do 2ip, observaram-se calos na base dos explantes nas concentrações de 2,5 e 20 μML^{-1} e com o TDZ e BAP foram observados calos em todas as concentrações

utilizadas. Ao contrário do observado neste estudo, Jana, Sivanesan e Jeong²⁷ verificaram que das citocininas que utilizaram o TDZ promoveram calos na base dos explantes da planta *Sophora tonkinensis*.

A análise de regressão das variáveis número de brotações, altura do maior broto e número de nós para a espécie em estudo mostra que os resultados para as citocininas cinetina e 2ip são superiores às demais citocininas, pois são observados número de brotos, comprimentos de brotos e números de nós superiores em todas as concentrações; ainda se pode notar que nas outras duas citocininas há uma tendência de redução do valor das variáveis com o aumento das concentrações. Esse fato sugere que o índice de citocinina endógeno dos explantes é o suficiente para induzir as múltiplas brotações, pois o uso de reguladores de crescimento aumenta o custo de obtenção de explantes e o processo in vitro.

No entanto, quando se observa a variável porcentagem de formação de calos com o uso da citocinina cinetina, independente da concentração não houve a formação de calos; com o uso de 2ip também não houve formação nas concentrações de 5 e 10 μML^{-1} . No entanto, com as citocininas TDZ e BAP nas concentrações diferentes de zero houve formação de calos.

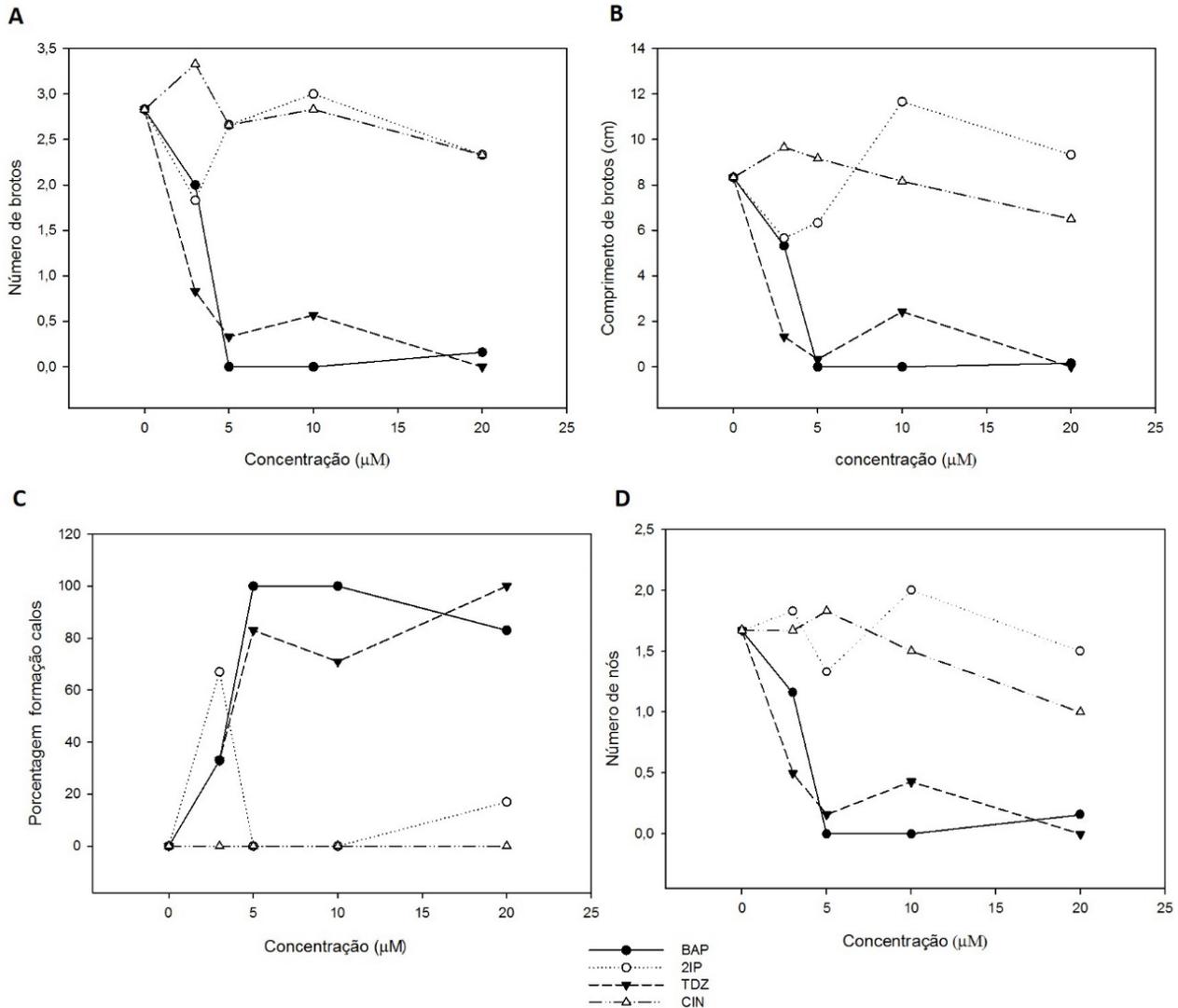


Figura 1 – Influência de diferentes concentrações de KIN (μM^{-1}), TDZ (μM^{-1}), 2iP (μM^{-1}) e BAP (μM^{-1}) na multiplicação in vitro de microbrotos de *P. aduncum*. A) Número de Brotos, B) Comprimento de Brotos, C) Percentagem de Formação de Calos e D) Número de Nós

Jana, Sivanesan e Jeong,²⁷ estudando o efeito de diferentes citocininas na multiplicação in vitro de *Sophora tonkinensis*, planta herbácea, verificaram que esta apresentou baixos resultados na indução da multiplicação dos brotos e que ocorreram calos na base dos explantes. Já Siddique, Bukhari, Perveen e Siddiqui²⁸ verificaram que a utilização das citocininas BA, KIN e TDZ foram efetivas para a indução de múltiplas brotações em *Cassia angustifolia*, sendo que não foram observados calos em todos os tratamentos realizados.

As citocininas, embora sejam importantes aliadas da cultura de tecidos, em algumas plantas podem apresentar alguns problemas, como hiper-hidricidade, dificuldade de enraizamento e aparecimento de massa calogênica. No presente estudo foram observados calos em 100% dos explantes que cresceram em meio de cultura suplementado com BAP e TDZ; esse fato demonstra a fitotoxicidade dessas citocininas para a planta estudada.

Sousa,²⁹ estudando *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, observou que quanto maior a concentração da citocinina utilizada para induzir a multiplicação in vitro, menor a altura dos brotos obtidos. O BAP parece ser a citocinina mais adequada e utilizada para a multiplicação in vitro,¹² porém em espécies de piperáceas, o acréscimo dessa citocinina no meio de cultura, além de muitas vezes aumentar o número de múltiplas brotações, proporciona o aparecimento de calos.³⁰

Silva, Balzon e Scherwinski-Pereira³⁰ observaram menores valores para altura dos brotos nos tratamentos que continham BAP, tanto para *P. hispidinervum* quanto para *P. aduncum*; a formação de um número maior de brotações com maior comprimento da parte aérea ocorreu em meio de cultura isento da adição dessa citocinina.

3.3 ENRAIZAMENTO IN VITRO

Observou-se que a suplementação do meio de cultura com auxinas AIB e AIA e na ausência delas promoveu 100% de enraizamento em todos os tratamentos. Já com a utilização da ANA ocorreu 100% de oxidação em todos os tratamentos; não foram observados calos em nenhum dos tratamentos.

Observando as auxinas AIA e AIB, verifica-se que para todas as variáveis estudadas não ocorreram diferenças estatísticas nos meios com sua presença ou ausência com relação ao controle (Figura 2). Esse fato pode indicar que esses reguladores não estão exercendo efeitos na rizogênese da espécie em estudo; provavelmente os níveis de auxinas endógenos estão sendo suficientes para promover o enraizamento.

Com relação ao ANA, é possível que o balanço hormonal dos explantes esteja sendo afetado pela quantidade e tipo de auxina, e, por esse fato, não ocorreu o enraizamento. Existem espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença desses reguladores, o que pode ser explicado pelo elevado nível endógeno desses reguladores

de crescimento.¹² O efeito fisiológico depende da concentração de cada regulador no meio, sendo que cada parte da planta tem uma resposta diferente às alterações das concentrações de auxinas e citocininas.³¹

Silva Balzon e Scherwinski-Pereira,³⁰ estudando a propagação in vitro de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, verificaram que na fase de multiplicação os microbrotos já apresentavam 100% de formação radicular, indicando que essas espécies apresentam potencial morfogênico para o desenvolvimento de raízes, sem a necessidade de estímulos externos, ou seja, de reguladores de crescimento.

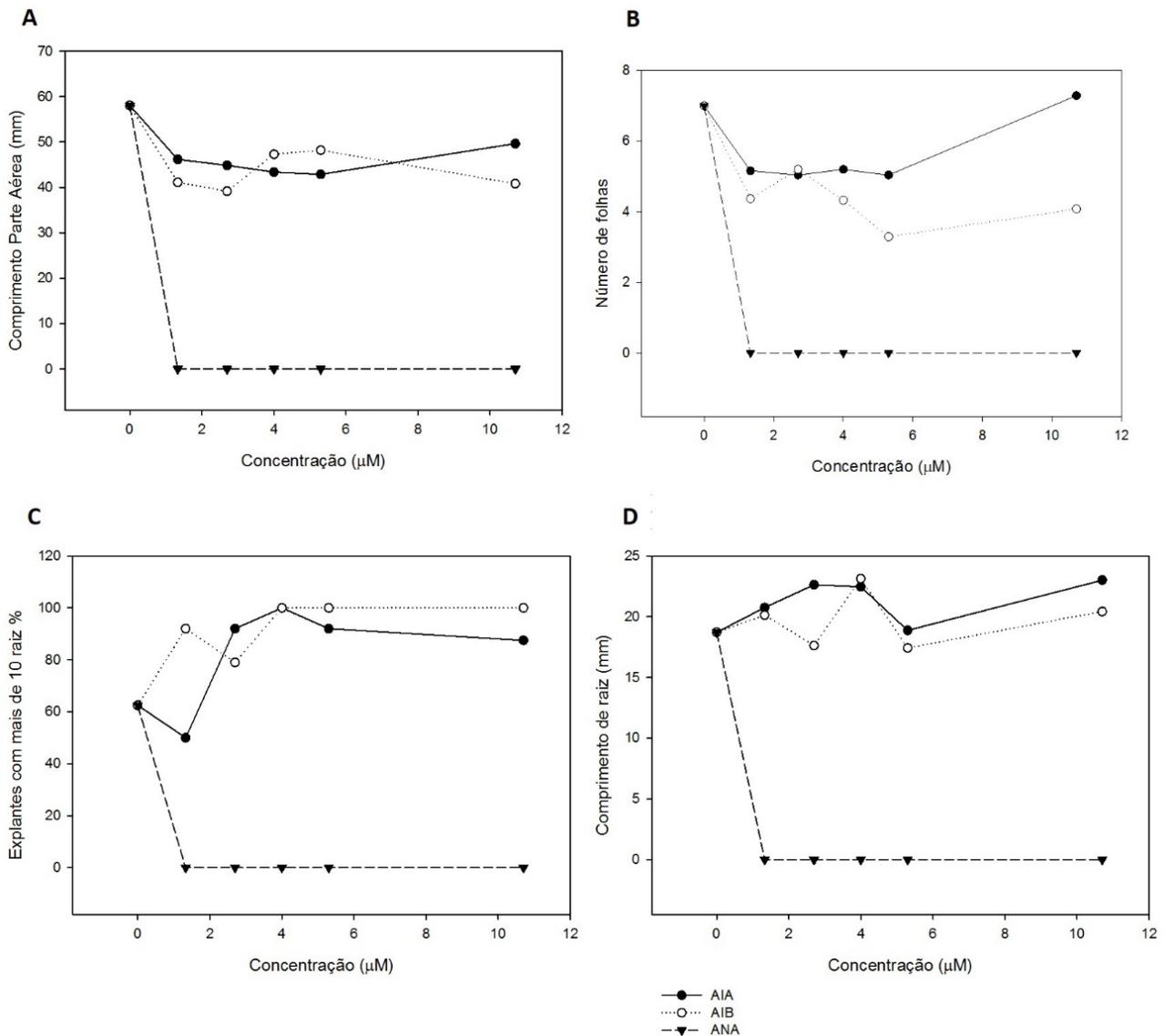


Figura 2 – Influência de diferentes concentrações de AIA (μM^{-1}), AIB (μM^{-1}) e ANA (μM^{-1}) no enraizamento in vitro de microbrotos de *P. aduncum*. A) Comprimento da Parte Aérea (CPA), B) Número de Folhas (NF), C) em porcentagem de enraizamento (%E) e D) Comprimento da Raiz Principal (CRP)

No presente estudo verifica-se que a espécie *P. aduncum* **n**ão necessita de suplementação do meio de cultura com a utilização de reguladores de crescimento, para estimular tanto a multiplicação quanto o enraizamento, fato observado entre os tratamentos que utilizaram as citocininas e as auxinas, quando comparados com o tratamento que não as utilizou.

4 CONCLUSÃO

O meio de cultura contendo sais do MS é ideal para o cultivo in vitro de sementes de *P. aduncum*; não é recomendado o uso de citocininas por promoverem o aparecimento de calos na base dos explantes.

Agradecimentos

Ao CNPq e a Embrapa Acre pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Valadares ACF, Alves CCF, Alves JN, De Deus IPB, Oliveira Filho JG, Santos TCL, et al. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acad Bras Cienc*. 2018;90(3):2691-99. doi:10.1590/0001-3765201820180033
2. Mamood SN, Hidayatulfathi O, Budin SB, Rohi GA, Zulfakar MH. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. *Bulletin of Entomological Research*. 2016;107(1):49-56. doi:10.1017/S00074853160000614
3. Almeida RP, Souto RNP, Silva MHL e Maia JGS. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem Biodivers*. 2009;9(6):1427-34. doi:10.1002/cbdv.200800212

4. Oliveira GL, Cardoso SK, Lara Júnior CR, Vieira TM, Guimarães EF, Figueiredo LS, *et al.* Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). *na Acad Bras Cienc.* 2013;85(1):1227-34. doi:10.1590/0001-3765201391011
5. Volpe HX, Fazolin M, Garcia RB, Magnani RF, Barbosa JC, Miranda MP. Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*. *Pest Manag Sci.* 2016;72:1242-49. doi:10.1002/ps.4143
6. Rapado LN, Nakano E, Ohlweiler FP, Kato MJ, Yamaguch ILF, Pereira CA, *et al.* Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *J Helminthol.* 2011;85:66-72. doi:10.1017/S0022149X10000258
7. Monzote L, Ramón Scull R, Paul Cos P, Willian Setzer WS. Essential oil from *Piper aduncum*: chemical analysis, antimicrobial assessment, and literature. *Review Medicines.* 2017;4(49):1-14. doi:10.3390/medicines4030049
8. Ceole LF, Cardoso MDG, Soares MJ. Nerolidol, the main monstituent of *Piper aduncum* essential oil, Has anti-leishmania braziliensis activity. *Parasitology.* 2017;1:1-12. doi:10.1017/S0031182017000452
9. Villamizar LH, Cardoso MG, Andrade J, Teixeira ML, Soares MJ. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017;112(2):131-39. doi:10.1590/0074-02760160361
10. Brazão MAB, Brazão FV, Maia JGS, Monteiro MC. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát.* 2014;13(6):517-26.
11. Bergo CL, Silva RC, Ohlson OC, Biasi LA, Panobianco M. Luz e temperatura na germinação de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*). *Rev. bras. sementes.* 2010;3(3):170-76. doi:10.1590/S0101-31222010000300019

12. Grattapaglia D, Machado MA. Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EmbrapaSPI/Embrapa-CNPq; 1998. v.1. p. 183-260.
13. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and biossays with tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15:473-97.
14. Lloyd G, McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings.* 1980;30:421-27.
15. Ferreira DF. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* 2014;38(2):109-12. doi:10.1590/S1413-70542014000200001
16. Bertozzo F, Machado IS. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) in vitro. *Ciênc. agrotec.* 2010;34(6):1477-87. doi:10.1590/S1413-70542010000600018
17. Pasqual M, Chalfun NNJ, Ramos JD. Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações: aplicação na propagação de plantas. Lavras: UFLA/FAEPE; 2001. 81 p.
18. Silva ST, Pacheco FV, Alvarenga ICA, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Ferreira C.P. Optimization of the protocol for the *in vitro* cultivation of *Piper aduncum* L. *American Journal of Plant Sciences.* 2014;5:3474-82. doi:10.4236/ajps.2014.523363
19. Reis ÉS, Pinto JEBP, Rosado LS, Correa RM. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Rev. Ceres.* 2008;55:160-67.
20. Guedes RS, Schimitz GCB, Maciel SA, Oliveira JP, Pereira JES. Avaliação da germinação de sementes e do desenvolvimento inicial de plantas de pimenta longa in vitro. In: 46º Anais do Congresso Brasileiro de Olericultura. 2006. Goiânia; 2006.

21. Pinhal HF, Araruna EAC, Carneiro PAP, Abreu SA, Melo B, Luz JMQ. Concentration of ms medium and cutting of seeds on *in vitro* establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). Biosci. J. 2017;33(2):306-13. doi:10.14393/BJ-v33n2-36327
22. Martins JPR, Pasqual M, Martins AD, Ribeira SF. Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). Aust. J. Crop Sci. 2015;9:85-91.
23. Faria GA, Costa MAPC, Ledo CAS, Junghans TG, Souza AS, Mario Cunha AP. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. Bragantia. 2007;66(4):535-43. doi:10.1590/S0006-87052007000400002
24. Torres AC, Caldas LS, Buso JA. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa; 1999. v.2. 517 p.
25. Bandinelli MG, Bisognin DA, Gnocato FS, Mambrin RB; Sausen D, Nicoloso FT. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. Hortic. bras. 2013;31(1):242-47. doi:10.1590/S0102-05362013000200011
26. Ledo AS, Seca GSV, Barboza SBSC, Silva Junior JF. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. Ciênc. Agrotec. 2007;31(4):989-93. doi:10.1590/S1413-70542007000400007
27. Jana S, Sivanesan I, Jeong BR. Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2013;3(7):549-53. doi:0.1016/S2221-1691(13)60111-2
28. Siddique I, Bukhari NAW, Perveen K, Siddiqui I. Influence of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication and plantlet formation in *Cassia angustifolia* Vahl. Braz Arch Biol Technol. 2015;58(5):686-91. doi:10.1590/S1516-89132015050290
29. Sousa PCA. Organogênese, embriogênese somática e uso de óleo mineral como estratégias de propagação e conservação *in vitro* de *Piper aduncum* e *Piper hispidinerum* [mestrado]. [Brasília]: Universidade de Brasília; 2013.

30. Silva TL, Balzon TA, Scherwinski-Pereira J. E. A rapid in vitro protocol for propagation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum*, two species from Amazon region with multi-purpose uses. Afr. J. Biotechnol. 2012;11(89):15539-46. doi:10.5897/AJB12.1888

31. POZO JCD, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E., Gutierrez C. Hormonal control of the plant cell cycle. Biol Plantarum. 2005;123:173-83. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00420.x