



DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)

Carla Effegem¹, Andréia Barcelos Passos Lima Gontijo², Alex Campanharo³, Ivoney Gontijo⁴

1. Graduanda em Agronomia no Centro Universitário Norte do Espírito Santo - CEUNES/UFES (carlaeffegem@hotmail.com)
2. Professora Doutora do Centro Universitário Norte do Espírito Santo - CEUNES/UFES
3. Graduando em Agronomia no Centro Universitário Norte do Espírito Santo - CEUNES/UFES
4. Professor Doutor do Centro Universitário Norte do Espírito Santo - CEUNES/UFES, São Mateus – Brasil

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

RESUMO

Um dos empecilhos na produção da pimenta-do-reino é a doença fusariose, manifestada por meio do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Protocolos de desinfestação de sementes são desenvolvidos para proporcionar assepsia, qualidade das plantas e aumento na cadeia produtiva. Assim, a propagação *in vitro* a partir de sementes apresenta-se como forma viável de produção na tentativa de produzir plantas saudáveis livres de patógenos. Objetivou-se no presente trabalho desenvolver um protocolo para desinfestação de sementes de pimenta-do-reino visando sua introdução *in vitro* por meio de sementes. Os tratamentos de desinfestação testados variaram com relação ao tipo e concentração do agente desinfestante. Taxas de germinação satisfatórias foram alcançadas quando as sementes foram submetidas no álcool 70% por 1 minuto, 100 % de hipoclorito de sódio por 15 minutos e fungicida Cercobin por 10 minutos e posterior lavagem em água estéril. Nesta condição também foram apresentadas as menores taxas de contaminação, não sendo observada a presença de fungos, o que demonstra a eficiência desses agentes na assepsia das sementes. As sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio na concentração de 100% e 1,0 g L⁻¹ de fungicida Cercobin por 10 minutos favoreceram as menores porcentagens de contaminação pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

PALAVRAS-CHAVE: hipoclorito de sódio, *Fusarium solani*, patógenos.

***IN VITRO* STERILIZATION AND GERMINATION OF BLACK PIPPER SEEDS (*Piper nigrum* L.)**

ABSTRACT

The establishment of a black pepper crop is hampered by fusariosis presence, manifested by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Protocols of disinfections are

developed to provide disinfection, plant quality and increase the plant production. Thus, in vitro propagation from seed presents a viable way of producing in an attempt to produce healthy plants without pathogens. The purpose of this work was to develop protocols of disinfestations of seeds of black pepper aiming its introduction in vitro by seeds. The disinfestations treatments tested varied according to the agent disinfest type and concentration. Satisfactory germination rates were achieved when seeds were submitted in 70% ethanol for 1 minute, 100% sodium hypochlorite for 15 minutes and Cercobin fungicide for 10 minutes and subsequent washing in sterile water. This condition also was observed the lowest levels of contamination, not the presence of fungi were observed, which demonstrates the effectiveness of these agents in obtaining aseptic seeds. The seeds disinfected by sodium hypochlorite at a concentration of 100% and 1.0 g L⁻¹ Cercobin fungicide for 10 minutes had smaller percentages of contamination by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

KEYWORDS: *Fusarium solani*, sodium hipoclorite, pathogens

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma planta do tipo trepadeira originária da Índia, pertencente à família Piperaceae e ao gênero *Piper*, o qual apresenta várias espécies, dentre elas, a *Piper nigrum* L. é a mais importante. Possui grande valor econômico no ramo de especiarias, sendo o Brasil um dos países de maior produção e exportação (SILVA PINHO et al., 2009).

Em 2011 sua produção alcançou aproximadamente 6,6 mil toneladas, com maior concentração produtiva nos estados do Pará e no norte do Espírito Santo (IBGE, 2011). A produção de mudas para plantio em larga escala é realizada basicamente por propagação vegetativa em forma de estacas herbáceas contendo de 2 a 3 nós e uma folha segmentada em um dos nós. Contudo essa prática acarreta riscos de se propagar doenças oriundas do material de origem (DUARTE, 2004).

Na tentativa de produzir plantas sadias livres de patógenos, a propagação *in vitro*, a partir de sementes, apresenta-se como forma viável de produção, no entanto, diversos fatores podem afetar o potencial germinativo das sementes promovendo a formação de plântulas anormais, dentre eles, a presença de microrganismos, como fungos. Sendo assim, para que a propagação *in vitro* torne-se fonte confiável de material asséptico, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, proporcionando a ausência de agentes patológicos.

Um dos empecilhos na produção da pimenta-do-reino é a doença fusariose, manifestada por meio do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Também conhecida como podridão-das-raízes é a principal doença da cultura, por ocasionar redução no ciclo de vida da planta e significativas perdas de produção. A doença inicia-se a partir das raízes ou da parte aérea, quando iniciada pelas raízes as folhas amarelecem e murcham, provocando a queda prematura (SILVA et al., 2011), o sistema radicular apresenta apodrecimento das raízes mais grossas, e ao ser completamente atingido, a planta morre, ficando com as folhas presas aos ramos. Quando iniciada pela parte aérea, plantas vigorosas apresentam ramos amarelados entre a folhagem verde escura.

O sistema de propagação tem grande influência nas medidas de controle e prevenção de agentes patológicos, sendo importante a determinação de um protocolo de estabelecimento. Segundo SILVA et al. (2005), as substâncias mais

utilizadas nos processos de desinfestação são os compostos a base de cloro e etanol.

Protocolos de desinfestação de sementes são criados para proporcionar, assepsia, qualidade das plantas e aumento na cadeia produtiva. A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta vantajosa, por ser uma forma rápida de multiplicar uma determinada planta que apresente características desejáveis como, por exemplo, elevada produtividade, elevada qualidade de sementes ou frutos, tolerância a pragas ou doenças, entre outras (MAMEDES et al., 2010).

Dessa forma, objetivou-se no presente trabalho testar diferentes agentes de desinfestação desenvolvendo um protocolo para a germinação *in vitro* de sementes de pimenta-do-reino visando o estabelecimento da cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de sementes de plantas de *P. nigrum* L. da variedade Bragantina, foram estabelecidos e testados diferentes tratamentos de desinfestação, sob condições assépticas, as quais foram cultivadas *in vitro*, visando a propagação de plântulas livres de contaminação, tendo em vista, que a pimenta-do-reino é vulnerável ao fungo *fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose.

Foram utilizados frutos de pimenta-do-reino da variedade Bragantina, no estágio maduro de coloração amarelo e vermelho coletados de áreas produtoras do município de São Mateus, norte do Estado do Espírito Santo. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro Universitário Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo.

A primeira parte do experimento foi realizada visando avaliar a taxa de contaminação por fungos em relação ao despulpamento do fruto antes da primeira desinfestação. Amostras de frutos despulpados e não despulpados foram lavados em água corrente e detergente neutro, imersos em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5 e 1,5%, respectivamente e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período, os frutos que permaneceram com a polpa foram então despulpados. Em ambiente asséptico, foram incubados em álcool 70% por 1 minuto, imersão em hipoclorito de sódio 50 e 100% por 15 minutos, fungicida Cercobin 700 WP[®] (0,0 e 1,0 g L⁻¹) por 10 minutos, sendo posteriormente submetidas a enxágues em água destilada e estéril, o controle foi obtido pelo mesmo processo, porém, com a imersão em hipoclorito de sódio 100% na ausência do fungicida Cercobin 700 WP[®]. Cada tratamento continha 30 repetições, sendo cada repetição constituída de um tubo de ensaio. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, mantidos em BOD a 20°C e avaliado aos 6, 15 e 30 dias.

Considerando os resultados positivos alcançados com o fungicida Cercobin 700 WP[®], desenvolveu-se a segunda parte do experimento, no qual as sementes foram submetidas a uma pré-assepsia com Cercobin 700 WP[®] um fungicida sistêmico, nas concentrações (0,0; 1,0; 2,0 e 5,0 g L⁻¹) por 5 minutos. Em seguida, foram colocadas em hipoclorito de sódio 50% (v/v) por 2 minutos, imersas novamente em hipoclorito de sódio a 0,5% e incubadas em estufa a 37°C por 14 horas. Em seguida, em condições de fluxo laminar, as sementes foram incubadas com álcool 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio na concentração de 50 % durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Foram utilizadas 30 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado,

mantidos em BOD a 20°C. Os tratamentos foram avaliados aos 0, 6, 15 e 30 dias quanto à taxa de contaminação (fungos e bactérias). Após 30 dias, os tubos que não apresentaram contaminações foram divididos em duas partes, metade foi levada à sala de cultivo sob iluminação artificial com luz branca (fluorescente), com fluência de 1,6 W/m², fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C e a outra metade levada à BOD a 20°C, avaliando-se o desenvolvimento das plântulas de pimenta-do-reino submetidas a diferentes temperaturas.

As sementes foram novamente submetidas ao mesmo tratamento realizado na primeira parte, com finalidade de observar a porcentagem de contaminação com aumento do número de repetições. Foram utilizadas 200 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio. Os tubos foram mantidos em sala de cultivo sob iluminação artificial com luz branca (fluorescente), com fluência de 1,6 W/m², fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. As avaliações de porcentagem de germinação foram avaliadas aos 0, 6, 15 e 30 dias após inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações da primeira parte do experimento foram realizadas aos 30 dias. As maiores porcentagens de contaminações por fungos foram verificadas no tratamento contendo 0,0 g L⁻¹ do fungicida Cercobin 700 WP[®] (26,7%), o resultado obtido, quanto à contaminação, foi superior quando comparada com o tratamento contendo 1,0 g L⁻¹ do fungicida, o qual apresentou porcentagem de contaminação de 3,3% (Figura 1).

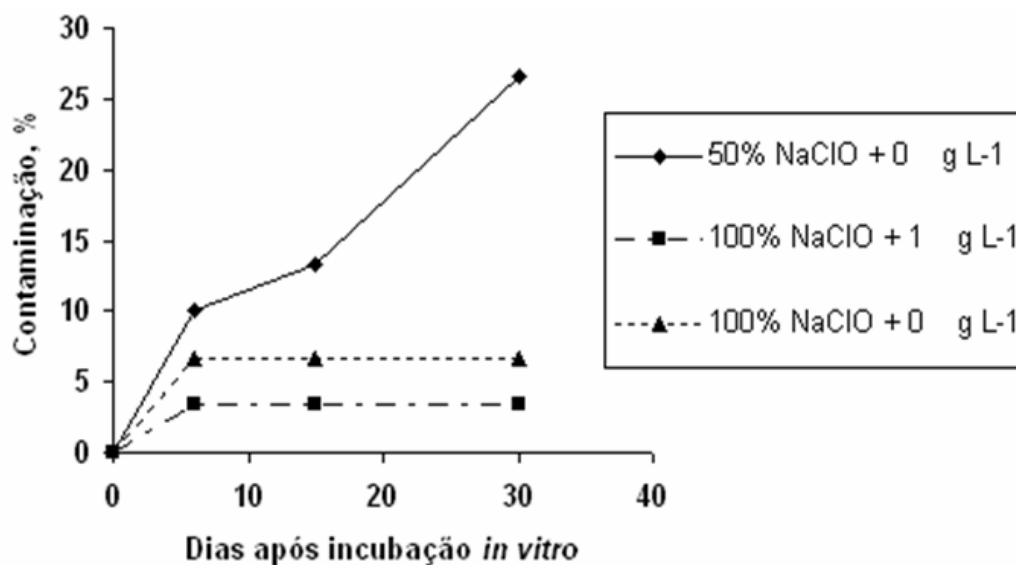


FIGURA 1. Porcentagem de contaminação por fungos de sementes de pimenta-do-reino cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de fungicida, n = 30.

Observa-se na figura 1 que o tratamento contendo 100% NaClO e 1 g L⁻¹ do fungicida apresentou porcentagem de contaminação inferior ao tratamento 100% NaClO e 0,0 g L⁻¹ do fungicida, por outro lado, o tratamento 50% NaClO na ausência do fungicida não foi eficaz no controle da doença, apresentando valores crescentes nos níveis de contaminação com tendência de aumento com mais de 30 dias após a inoculação *in vitro*.

Este fato demonstra que a baixa concentração de hipoclorito de sódio (50%), a ausência de fungicida ($0,0 \text{ g L}^{-1}$) e a permanência da polpa na semente favoreceu a presença de agentes patológicos. Segundo CID & ZEMMERMANN (2006) os fungicidas estão destinados à proteção das plantas, destruindo o inoculo antes que se espalhe e forme micélio pela planta, o qual dá origem à doença, quando a mesma já se apresenta na planta o fungicida pode atuar, também, como bloqueia da mesma, seja de forma local ou sistêmica. Em estudo com sementes de ipê-roxo, BOTELHO et al., (2008) detectaram de forma expressiva, a incidência de fungos em todas as amostras avaliadas, quando as sementes não foram submetidas ao tratamento com substâncias desinfestantes.

Os produtos químicos mais comumente utilizados na desinfestação são os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaClO) em várias concentrações de cloro ativo (1 a 2,5%) (CAMOLESI et al., 2007; PEREIRA et al., 2011). Em outro estudo utilizando sementes de calêndula, BEVILACQUA et al. (2011) conseguiram a desinfestação das sementes usando hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos, o mesmo foi observado por COUTO et al. (2004) que testando a desinfestação de sementes de *Swietenia macrophylla*, verificaram 89 % de contaminação quando as sementes não eram submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio, demonstrando a importância desse agente na assepsia de sementes.

Quando as sementes foram submetidas a diferentes concentrações do fungicida Cercobin 700 WP[®], os resultados obtidos foram bem semelhantes ao apresentado pela testemunha (Figura 2).

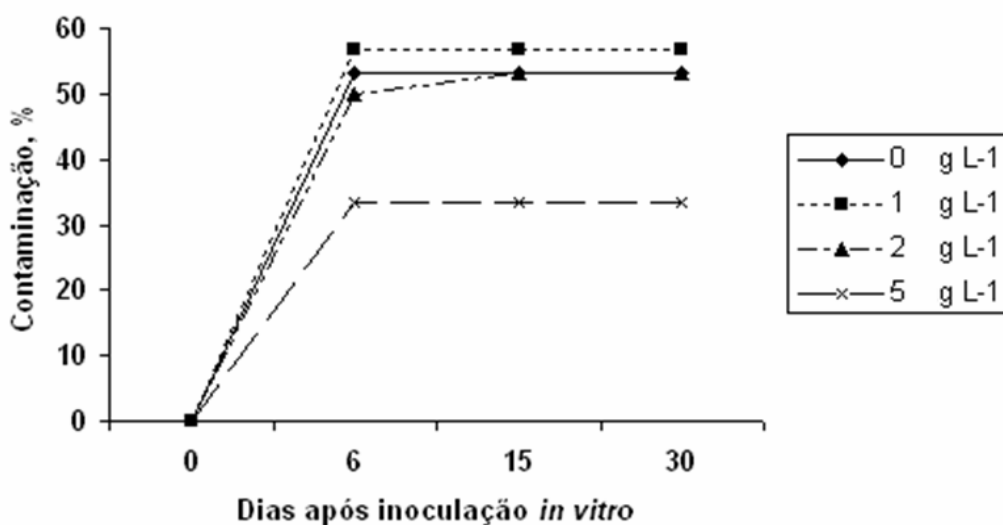


FIGURA 2. Percentagem de contaminação por fungos de sementes de pimenta-do-reino, utilizando diferentes doses de fungicida, n = 30.

Observa-se na figura 2 que quando comparado somente o efeito do fungicida, o tratamento que se destacou com menores taxas de contaminação por fungos foi o com o uso de $5,0 \text{ g L}^{-1}$ do fungicida Cercobin 700 WP[®], o qual apresentou aproximadamente 33 % de contaminação. Os demais tratamentos apresentaram comportamento similar com contaminação em torno de 55 %. A maior contaminação fúngica apresentada pelo tratamento $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ deve-se, posteriormente, a forma de

manuseio das sementes durante o processo de desinfestação, tendo em vista, que a primeira parte do experimento (100% NaClO e 1,0 g L⁻¹) apresentou menor taxa de contaminação.

Os tubos que não apresentaram contaminações e foram mantidos em BOD e em sala de cultivo apresentaram ausência de agentes patológicos após 30 dias incubados. No entanto, os tubos presentes em sala de cultivo a 25°C, apresentaram germinação o que não foi observado nos tubos presentes em BOD a 20°C. Em um trabalho com sementes de *Hyptispectinata* SANTOS NETOS et al. (2008), verificaram que temperaturas elevadas contribuíram para o aumento da velocidade de germinação. Para as sementes de *Myracrodruon urundeuva* (GUEDES et al., 2011) e de *Parkia pendula* (ROSSETO et al., 2009), estes autores recomendaram a temperatura de 30 °C, por proporcionar alta germinação e produção de plântulas mais vigorosas. A temperatura influencia na absorção de água pela semente e as reações bioquímicas que regulam o metabolismo necessário para iniciar o processo de germinação (CARVALHO & NAKAGAWA, 1988). O comportamento das sementes em relação à temperatura ótima é bastante variável entre as espécies florestais. A maioria das espécies tropicais apresenta bom desempenho germinativo na faixa de 20 a 30 °C, podendo variar de acordo com as temperaturas encontradas em sua região de origem. Durante o período de germinação observou-se que as sementes contaminadas por fungos não foram capazes de germinar, demonstrando que estes microrganismos atuaram como fator limitante desse processo.

Após a avaliação aos 30 dias das sementes submetidas ao mesmo tratamento da primeira parte do experimento as mesmas apresentaram baixa taxa de contaminação 8,5%, devido a maior concentração do hipoclorito (100%) e a presença de fungicida (Figura 3). Desse modo, é possível observar que a porcentagem de contaminação por fungos foi inferior quando comparada com os demais tratamentos realizados no experimento. Demonstrando que a maior concentração de hipoclorito de sódio (100%) associada a 1,0 g L⁻¹ do fungicida Cercobin 700 WP[®], apresentou-se eficaz no controle da doença, não sendo necessária a utilização de maiores concentrações do fungicida.

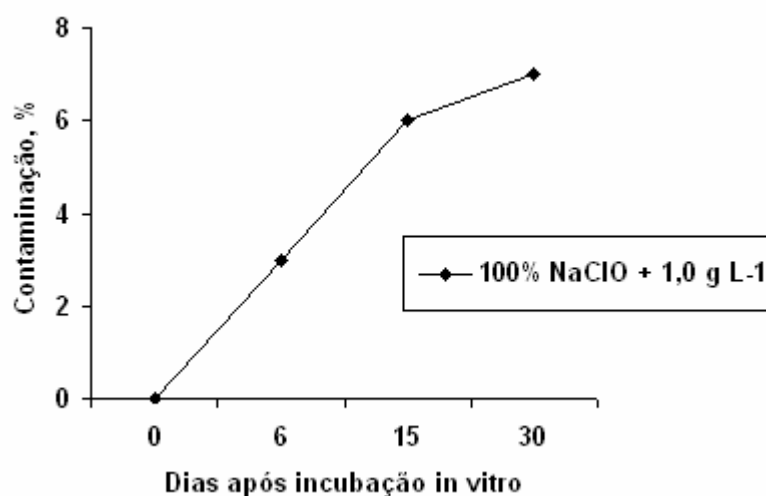


FIGURA 3. Percentagem de contaminação fúngica das sementes de pimenta-do-reino, n = 200.

A germinação começou após 15 dias de inoculação *in vitro* das sementes (Figura 4). Em estudos com germinação *in vitro* de *Amburana acreana* (cerejeira), FERMINO Jr et al. (2007), registraram a germinação *in vitro* após 8 dias de inoculação, apresentando 78% de germinação após 30 dias.



FIGURA4. Cultivo *in vitro*. Cultivar Bragantina aos 30 dias. Fonte: Carla Effegem

CONCLUSÃO

As sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio na concentração de 100% e 1 g L⁻¹ de fungicida Cercobin por 10 minutos favoreceram as menores porcentagens de contaminação fúngica.

REFERÊNCIAS

BEVILACQUA, C. B. ; REINIGER, L. R. S. ; GOLLE, D. P. ; DA ROSA, F.C. . Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v. 41, p. 761-766, 2011.

BOTELHO, L. S; MORAES, M.H.D., MENTEN, J. O. M. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeitos na germinação e transmissão para as plântulas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.343-348, 2008.

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed., Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

COUTO, J. M. F.; OTONI, W. C.; PINHEIRO, A. L.; FONSECA, E. P. 2004. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 633-642.

CID, L. P. B.; ZIRMMERMANN, M. J. A Contaminação *in vitro* de plantas. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Brasília: 2006. 20 p.

DUARTE, M. L. R. ; ALBUQUERQUE, Fernando Carneiro de ; CONCEIÇÃO, Heraclito Eugênio Oliveira da . Produção de mudas de pimenteira-do-reino. **Documentos**. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, n.192, p. 01-20, 2004.

ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 1227 2014

FERMINO JUNIOR, P.C.P.; PEREIRA, J.E.S.; NAGAO, E.O.; GUEDES, R.S. Calogênese e organogênese *in vitro* a partir de segmentos nodais de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Sm.) da Amazônia Ocidental: estabelecimento e regeneração de brotos. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.13, supl., p.811-815, 2007.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; COLARES, P. N. Q.; MEDEIROS, M. S.; VIANA, J. S. Germinação e vigor de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Alemão em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 975-982, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000600003>

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/http>. Acesso em: 26 de set. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, volume especial, p. 222-226, 2011.

SANTOS NETO, A. L. S.; MEDEIROS FILHO, S.; TEÓFILO, E. M.; GUIMARÃES, R. M.; BLANK, A. F.; SILVA-MANN, R. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de sambacaitá (*Hyptispectinata* (L.) Poit). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 14, n. 4, p. 19-26, 2008.

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

SILVA, P. C.; DIAS, J. M. M.; NEVES, J. C. L.; SALOMÃO, L. C. S.; COUCEIRO, M. A. **Protocolo para desinfestação de sementes de tangerineira Cleópatra (Citrusreshni Hort. Ex Tan.)**. Pelotas. Disponível em <http://www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/fitotecnia/317.htm/>. Acesso em: mar. 2005.

SILVA PINHO, J.V.; LEMOS, O. F. ; OLIVEIRA, H.S. Clonagem *in vitro* via cultivo de meristema de pimenteira-do-reino: assepsia e estabelecimento de cultura. In: **Seminário de Iniciação Científica** da UFRA e 13º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 2009, Belém - Pará. Programa de instituição de bolsas de iniciação científica, 2009.

ROSSETO, J.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; RONDON NETO, R. M.; SILVA, I. C. O. Germinação de sementes de *Parkia pendula* (Willd.) Benth. exWalp. (*Fabaceae*) em diferentes temperaturas. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2009.