**INFLUÊNCIA DE FITOREGULADORES
NA MICROPROPAGAÇÃO
DA PIMENTEIRA-DO-REINO(*Piper nigrum* L.)**

JOÃO CHADDAD JUNIOR
Engenheiro agrônomo

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
FEVEREIRO - 1995

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Chaddad Junior, João
C432i Influência de fitoreguladores na micropropagação
da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). Piracicaba, 1995.
82p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Hormônio vegetal em pimenta-do-reino 2. Pimenta-do-reino - Melhoramento 3. Pimenta-do-reino - Propagação "in vitro" I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.84

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela orientação e a oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez pela motivação.

Ao Prof. Dr. Antonio Roque Dechen pela atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo pelo incentivo.

À minha querida irmã Reggiane Chaddad Schiavuzzo pelo apoio.

À Prof. Dra. Helaine Carrer pelo pronto auxílio.

À Prof. Dra. Maria Cristina Stolf Nogueira pelas orientações nas análises estatísticas.

À Dra. Vera L. M. Romani pela assessoria na utilização da técnica de micorrização.

Ao Sr. Romeu A. Rocha pelos desenhos artísticos.

Aos colegas de trabalho: Miguel Egídio Campagnol, Pedro Perin, Antonio F.C. Amaral, Enio T. de Oliveira, Romeu A. Rocha, pelo companheirismo.

Aos colegas de pós-graduação: Maria T. Groethe, Sandra Tabai, Jeanete Miachir, Vasco Altafin, Carlos Corsato, Erionaldo Chagas da Silva, Ricardo Nevares, Rogério Cuzzuol, Marco Perencin, Daniela Ferrão, pela amizade.

Aos estagiários do CEBTEC: Renata, Margarete, Giovana, e em especial à Fabiana F. do Prado, pela colaboração.

Aos funcionários do CEBTEC: Luciana, Joaquina, Sandra, Aparecida, Raquel, Carlos e Ralf, pelo convívio.

Aos funcionários da Biblioteca Central: Kátia, Eliana, Fátima, Ronaldo, Ayrton e Sonia, pela ajuda.

Ao CPATU, em especial na pessoa do Sr. Dilson Capucho Frazão, pelas sementes cedidas.

Ao CNPQ e à FINEP pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos espirituais por "quase tudo".

Ao Bom Deus, por tudo.

4.3. Enraizamento das "micromudas"	42
4.3.1. Comportamento das cultivares em comprimento médios de raízes por planta em relação às auxinas ácido indol- acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).....	42
4.3.2. Comportamento das cultivares em número de raízes por planta em relação às auxinas ácido indol-acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).....	43
4.3.3. Comportamento das cultivares em massa de matéria seca de raízes por planta em relação às auxinas: ácido indol-acético (IAA) ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).....	43
4.4. Aclimação.....	47
4.4.1. Sobrevivência das plantas micropropagadas.....	47
4.4.2. Porcentagem de colonização de raízes por fungos endomicorrízicos (MVA) nas cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally'.....	48
4.4.3. Massa da matéria fresca da parte aérea após a aclimação em função de fungos endomicorrízicos (MVA).....	53
4.4.4 Massa da matéria fresca da raiz e a influência dos fungos endomicorrízicos.....	56
4.5. Considerações finais.....	59
5. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE.....	72

LISTA DE FIGURAS

figura	página
1. Fluxograma das fases da micropropagação utilizadas.....	21
2. Representação esquemática das fases de multiplicação e enraizamento.....	22
3. Médias de altura (cm) da cv. 'Kudaravally' submetida à 6 doses (μM) das citocininas KIN, 2iP e BAP, aos 40 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	34
4. Médias de altura (cm) da cultivar 'Kuthiravally' submetida à 6 doses (μM) das citocininas KIN, 2iP e BAP, aos 40 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	35
5. Médias de altura (cm) das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 53 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	35
6. Médias de altura (cm) das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 75 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	36
7. Médias de altura (cm) da cultivar 'Kudaravally' em duas idades 53 e 75 dias, submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM . Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	36
8. Médias de altura (cm) da cultivar 'Kuthiravally' em duas idades 53 e 75 dias, submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM . Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	37
9. Médias de número de brotos axilares das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 75 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....	38

10. Médias de brotos adventícios por planta das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 90 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....41
11. Médias de número de brotos totais por planta das cvs. 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 90 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....41
12. Número de brotos totais das cvs 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM , aos 90 dias. As médias estão ajustadas às equações de regressão polinomial.....42
13. Médias de comprimento (cm) de raízes por planta da cultivar 'Kudaravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 μM , das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....44
14. Médias de comprimento médio de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 μM , das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....45
15. Médias de número de raízes por planta da cultivar 'Kudaravally' submetida à 6 doses, de 0 à 10 μM , das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....45
16. Médias de número de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally' submetida à 6 doses, de 0 à 10 μM , das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....46

17. Médias de massa de matéria seca de raízes por planta da cultivar 'Kudaravally' submetidas à 6 doses, de 0 à 10 μ M, das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....46
18. Médias de massa de matéria seca de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally' submetida à 6 doses, de 0 à 10 μ M, das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).....47
19. Porcentagem de sobreviventes após a aclimação "in vivo" de plantas da cultivar 'Kudaravally' inoculadas na ocasião do transplante com fungos MVA, aos 50 dias. Fungos MVA: A. App., *Acaulospora appendiculata*; A.mor., *A. morrowae*; A. scr., *A. scrubiculata*; A.lon., *A. Longula*; G.cla.; *Glomus clarum*; G. Mac., *G. macrocarpum*; G. Etu., *G. etunicatum*; G. Mar., *Gigaspora margarita*; E.col., *Entrophora colombiana*; S. Het., *Scuttilospora heterogama*; Test., testemunha.....51
20. Porcentagem de sobreviventes após a aclimação "in vivo" de plantas da cultivar 'Kuthiravally' inoculadas na ocasião do transplante com fungos MVA, aos 50 dias. Fungos MVA: A. App., *Acaulospora appendiculata*; A.mor., *A. morrowae*; A. scr., *A. scrubiculata*; A.lon., *A. longula*; G.cla.; *Glomus clarum*; G. mac. *G. macrocarpum*; G. etu., *G. etunicatum*; G. Mar., *Gigaspora margarita*; E.col., *Entrophora colombiana*; S. het., *Scuttilospora heterogama*; Test., testemunha.....52.

LISTA DE TABELAS

tabela	página
1. Sais componentes e suplementação para composição do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962).....	24
2. Tratamentos do experimento 1 constituído de doses das citocininas cinetina (KIN), 2-isopentenil-adenina (2iP) e benzil-amino-purina (BAP).....	25
3. Tratamentos do experimento 2, constituído de doses de benzil-amino- purina (BAP).....	27
4. Tratamentos do experimento 3 constituído de doses das auxinas IBA, IAA e NAA.....	28
5. Espécies de fungo MVA e as quantidades de esporos inoculados na ocasião do plantio "in vivo" para aclimação em casa de vegetação.....	30
6. Solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) e as concentrações utilizadas (mg/l).....	32
7. Porcentagem de sobreviventes após a aclimação "in vivo", considerando apenas o tamanho das raízes das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', aos 50 dias.....	48
8. Médias de porcentagem de colonização de raízes da cultivar 'Kudaravally' por fungos MVA aos 50 dias após a inoculação.....	49
9. Médias de porcentagem de colonização de raízes da cultivar 'Kuthiravally' por fungos MVA aos 50 dias após a inoculação.....	50

10. Médias de massa de matéria fresca da parte aérea (g) de plantas aclimatadas "in vivo" da cultivar 'Kudaravally' inoculadas nas raízes com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras minúsculas representam comparações na horizontal, maiúsculas comparações na vertical (TUKEY 1%) (CV 41,942%).....54
11. Médias de massa da matéria fresca da parte aérea (g) de plantas aclimatadas "in vivo" da cultivar 'Kuthiravally' inoculadas nas raízes com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras maiúsculas representam comparações na vertical (TUKEY 1%), minúsculas horizontal (TUKEY 5%) letras iguais não diferem estatisticamente.....55
12. Médias de massa da matéria fresca da raiz (g) de plantas aclimatadas "in vivo" da cultivar 'Kudaravally' inoculadas com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras maiúsculas comparação vertical (TUKEY 1%), minúsculas comparação horizontal (TUKEY 5%).....57
13. Médias de massa de matéria fresca da raiz (g) de plantas aclimatadas "in vivo" da cultivar 'Kuthiravally' inoculadas com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras maiúsculas comparação vertical, minúsculas comparação horizontal (TUKEY 1%).....58

**INFLUÊNCIA DE FITOREGULADORES
NA MICROPROPAGAÇÃO
DA PIMENTEIRA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)**

Autor: JOÃO CHADDAD JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

RESUMO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é a especiaria de maior importância econômica no Brasil e no Mundo. Entretanto, a produção comercial desta planta vem enfrentando problemas fitossanitários e de propagação, sendo que o método convencional de multiplicação tem se mostrado anti-econômico.

O presente trabalho procurou estabelecer um protocolo de propagação "in vitro" (micropropagação) que permite a multiplicação de um material selecionado para se obter plantas clonadas isentas de patógenos, determinando-se as dosagens de fitorreguladores a serem utilizados nas fases de: multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimação "ex vitro" das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthirravally'.

Na fase de multiplicação "in vitro" determinou-se que a presença de 16 μ M de benzil-amino-purina (BAP) foi mais efetiva para ambas as cultivares.

O alongamento da cultivar 'Kudaravally' foi mais efetivo em presença de 10 μM de BAP até a idade de 75 dias. Já a cultivar 'Kuthiravally' alongou-se melhor na presença de 6 μM de BAP, aos 75 dias.

As duas cultivares enraizam melhor "in vitro" na presença da auxina ácido naftaleno-acético (NAA) do que das auxinas ácido indol-acético (IAA) e ácido indol-butírico (IBA), sendo que a dose de 10 μM é a que produz maior número de raízes, mais longas e de massa de matéria seca mais elevada.

As plântulas com raízes induzidas por NAA aclimatam melhor do que as enraizadas sem auxinas.

Dos fungos endomicorrízicos testados *Glomus macrocarpum* mostrou ser vantajoso na aclimação de plantas da cultivar 'Kudaravally' com raízes induzidas por NAA.

**INFLUENCE OF PHYTOREGULATORS IN
BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) MICROPROPAGATION**

Author: JOÃO CHADDAD JUNIOR

Adviser: Dr. OTTO JESU CROCOMO

SUMMARY

Black pepper (*Piper nigrum* L.) has a great economical importance all over the world, including Brasil. However, the commercial production of the species is facing nowadays phytosanitary problems as well as propagation challenges. The conventional method of its propagation is showing to be anti-economical.

The present research work was aimed to establish an "in vitro" protocol allowing to multiply selected black pepper cultivars to obtain pathogen-free cloned plants, through the use of phytormones in the following phases of the biotechnological

process: multiplication, elongation, rooting and "ex vitro" acclimatization, of the cultivars 'Kudaravally' and 'Kuthiravally'.

For "in vitro" multiplication phase, 16 μ M benzilamine purine (BAP) has been the most effective for both cultivars. For the cv. 'Kudaravally', the better elongation was obtained when 10 μ M BAP was present up to 75 days. On the other hand, in same period, better elongation of cv. 'Kuthiravally' was achieved with 6 μ M BAP.

The auxin naphtalene acetic acid (NAA) at 10 μ M promoted high number and long roots with high fresh weight when both cultivars were rooted "in vitro". Plants in which roots induced by NAA had a better "ex vitro" behavior.

During acclimatization the endomycorrhizal fungi *Glomus macrocarpum* showed enhanced plants of the cv. 'Kudaravally' with NAA-induced roots.

LISTA DE ABREVIATURAS

MS - meio de MURASHIGE & SKOOG (1962)

BAP - benzil-amino-purina

2iP - 2-iso-pentenil-adenina

KIN - cinetina

ZEA - zeatina

NAA - ácido naftaleno-acético

IAA - ácido indol-acético

IBA - ácido indol-butírico

2,4-D - ácido 2,4-dicloro-fenóxi-acético

GA₃ - ácido giberélico

MVA - micorríza-vesículo-arbúscular

PE - probabilidade de erro

1. INTRODUÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é uma trepadeira perene da família *Piperaceae*. Originária do sudoeste da Índia, foi primeiramente introduzida na Bahia por colonizadores portugueses, no século XVII, como pimenta da terra. Posteriormente, em 1933, imigrantes japoneses trouxeram para o Pará, no município de Tomé-Açu, a cultivar 'Kuching', mas com o nome de 'Cingapura' (VENTURA & MILANEZ, 1983).

Em 1955, a produção brasileira atingia o nível da demanda nacional. Em 1956 o país efetivara as primeiras exportações, e em 1966 o Brasil era o 4º produtor mundial de pimenta-do-reino (ALBUQUERQUE & CANDURU, 1971;).

O Brasil detém cerca de 15% do mercado mundial. Nos anos de 1986 e 1987, a receita advinda de suas exportações tem proporcionado divisas de, aproximadamente, 100 milhões de dólares anuais, com uma produção em torno de 40 mil toneladas (PLANO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO, 1988-1992). Os dados mais recentes indicam que a produção de pimenta-do-reino duplicou de 1987 à 1990, sendo a produção deste último ano de 83,755 mil toneladas (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1993).

A cultura é considerada um agente desencadeador da agricultura moderna na Região Amazônica, requerendo uso intensivo de fertilizantes químicos e orgânicos, de defensivos e mecanização agrícola, sendo hoje uma das alternativas mais rentáveis do trópico. Nas condições brasileiras os níveis de produtividade têm sido dos mais

elevados do mundo, com rendimentos variando de 2 mil a 4 mil quilos por hectare (PLANO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO, 1988-1992).

A pimenta-do-reino é a especiaria mais usada nas preparações culinárias, no processamento de alimentos e perfumaria (PHILIP et alii, 1992), além disso, supõe-se que seja a de uso mais antigo, a que se encontra em maior dispersão, e aquela que atinge maior importância econômica, embora não seja a mais cara por unidade de massa (FERRÃO, 1993).

O gênero *Piper* compreende mais de 1200 espécies, ocorrendo em diversos países, em vários continentes (FERRÃO, 1993). Da espécie *Piper nigrum* L. a maior parte das cultivares conhecidas são de origem indiana, atualmente, são sessenta e quatro identificadas na Índia, dos quais a 'Karimunda' é a mais abundante (PHILIP et alii, 1992).

Há cultivares de *Piper nigrum* L. que se comportam como monóicas ou dióicas, conforme o tipo de flores que produzem, se hermafroditas ou unissexuadas. As cultivares comerciais são naturalmente selecionadas pelas flores hermafroditas (FERRÃO, 1993). Há, também, cultivares com elevada autogamia, como a 'Aipiriam', que tem 95% de autofecundação; e há aquelas com elevada alogamia, como a 'Pannyiur-1', com 9% de autofecundação (SASIKUMAR et alii, 1993).

Para manter as características agronômicas da planta a propagação tem de ser vegetativa. Entretanto, a produção de mudas deve ser feita a partir de ramos ortotrópicos, que têm crescimento vertical, constituídos de 2 à 6 nós por estaca, podendo produzir-se no máximo 50 mudas por ano por planta matriz, a qual deve ter pelo menos 4 anos, o que limita bastante o potencial de produção (MILANEZ & VENTURA, 1982).

Na implantação de um hectare o número ideal de plantas é de 2750 (KATO et alii, 1987), e para isso seriam necessárias 55 matrizes, no mínimo, para produzir tais mudas.

Segundo PHILIP et alii (1992) podem ser produzidas até 15 mil plantas por ano a partir de um ápice de broto através da micropropagação "in vitro" da pimenteira-do-reino.

As técnicas de cultura de tecidos, quando devidamente aplicadas, poderão micropropagar eficientemente plantas com qualidades superiores, bem como o melhoramento clonal, pela limpeza de vírus e micoplasmas, os quais podem infectar a cultura reduzindo a produtividade de grãos. Além disso, as técnicas de cultura de tecidos da pimenteira-do-reino poderão auxiliar no melhoramento genético desta, através do resgate de embriões híbridos os quais seriam abortados "in vivo" pela planta mãe, da cultura de antéras utilizável na obtenção de linhagens, da embriogênese somática e da fusão de protoplastos úteis na criação de novas combinações gênicas.

Para contribuir na elucidação da abordagem biotecnológica para a propagação da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', foi realizado o presente trabalho cujo objetivo é o de determinar os melhores níveis de fitormônios a serem aplicados nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento "in vitro" , bem como a aclimação "in vivo" com fungos endomicorrízicos (MVA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Regeneração de plantas "in vitro"

Segundo TISSERAT (1987) o termo cultura de tecidos vegetais é convenientemente usado para descrever todos os procedimentos usados na cultura estéril de materiais como: protoplastos, células, órgãos, embriões e plântulas.

A morfogênese "in vitro" como um evento de regeneração de plantas pode ser expressa por um destes três métodos: cultura de embriões, embriogênese somática e organogênese.

Os embriões zigóticos são excisados da semente e inoculados num meio nutritivo regenerando plantas na condição estéril (TISSERAT, 1987).

A embriogênese somática é a produção de estruturas semelhantes a embriões zigóticos nas células somáticas. O embrião somático é uma estrutura bipolar independente, não sendo ligado fisicamente ao tecido de origem, posteriormente, estes podem germinar e desenvolver em plântulas (TISSERAT, 1987).

O desenvolvimento das plantas por organogênese é a formação e o crescimento de brotos de calos ou outros tecidos não meristemáticos, estes brotos são estruturas unipolares e fisicamente são conectados ao tecido de origem (TISSERAT, 1987).

2.1.1 Material inicial

Na escolha do explante para introduzir o material vegetal nas condições estéreis leva-se em consideração, principalmente: o tipo de cultura que será iniciada, os objetivos propostos para a cultura e o estado fisiológico e sanitário da espécie vegetal (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Além disso, as condições de pré-cultura da planta podem influenciar grandemente no crescimento dos explantes no cultivo "in vitro". Tecidos e órgãos imaturos são invariavelmente morfogeneticamente mais plásticos "in vitro" (TISSERAT, 1987).

Existem vantagens e desvantagens quanto a utilização da propagação sexual ou assexual. Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), os embriões de sementes são uma fonte muito conveniente de explantes. Estes, dentre os tecidos da planta, são os que apresentam índice de contaminação mais baixo. Depois de esterilizadas externamente, as sementes são dissecadas e os embriões de pequenas dimensões podem ser retirados (BHOJWANI & RAZDAN, 1986).

Os explantes nucelares, ovulares e embrionários não costumam ter problemas sérios de contaminação microbiana, por não haver conexão vascular com o tecido materno ao redor, portanto a desinfecção superficial, normalmente, é suficiente para esterilizá-los (LITZ & JAISWAL, 1991)

Os embriões imaturos necessitam de um manejo cuidadoso, e uma rápida transferência para a cultura para não serem danificados nem oxidados (BHOJWANI & RAZDAN, 1986).

Entretanto, a regeneração de plantas a partir de sementes é desvantajosa para as culturas que são necessariamente propagadas vegetativamente, uma vez que do ponto de vista econômico e agrônomico não serão mais os mesmos cultivares originalmente utilizados na produção comercial. Assim, novas combinações gênicas

podem ser formadas, e as características individuais da planta mãe poderão ser alteradas (GEORGE & SHERRINGTON, 1984)

Plantas como a pimenteira-do-reino, devem ser propagadas vegetativamente por diversos motivos: apresentam elevada poliploidia e grandes variações no número de cromossomos (Kumar & Subramanian¹, citado por BHAT et alii, 1992), e a ocorrência de plantas dióicas (FERRÃO, 1993) que em plantio comercial teriam produção nula de grãos. São aspectos que indicam a utilização da propagação sexual da pimenteira-do-reino apenas para fins de melhoramento genético (BOAVENTURA, 1983).

As plantas oriundas de sementes apresentam, ainda, a desvantagem de terem de ser podadas a 30 cm do solo, do contrario, somente se ramificariam à 1,5 m de altura ficando mais fáceis de se despregar do tutor pela ação do vento (BOAVENTURA, 1983; FERRÃO, 1993).

A pimenteira-do-reino é hospedeira de diversas bactérias no campo (ROBBS, 1959; FERRÃO, 1993), e conseqüentemente nas culturas de tecidos desta espécie (MATHEWS & RAO, 1985; FITCHET, 1990, 1992; PHILIP et alii, 1992).

Segundo TISSERAT (1987), em brócoli culturas de bactérias podem coexistir com as culturas de plantas e permanecer indetectáveis visualmente por diversas passagens de meio, e às vezes, reduzir as taxas de multiplicação e outras respostas de crescimento. Bactérias não patogênicas presentes em plantas de *Begonia* foram capazes de sobreviver "in vitro" por até 7 meses sem se tornarem visíveis, isto é, permaneceram endógenas ao tecido vegetal (HANNINGS & LANGHANS, 1974).

¹ KUMAR, V.; SUBRAMANIAM, B. Chromosome Atlas of Flowering Plants of Indian Subcontinent. Calcutta, Botanical Survey of India. 1986. vol. 1.

As contaminações bacterianas e fúngicas, normalmente, são detectáveis de 1 à 14 dias do plantio no meio (TISSERAT, 1987). Para se detectar a presença de bactérias endógenas são necessárias amostragens de tecidos em diversas fases de crescimento da cultura, fazendo-se um macerado de células das amostras, plaqueando-os em meios específicos para cultura de bactérias (TISSERAT, 1987).

FITCHET (1990) constatou que a manifestação de bactérias endógenas, não identificadas, foi gradativa desde o primeiro dia de inoculação dos explantes nodais, de plantas maduras, até os 90 dias decorrentes.

FITCHET (1988) utilizou pré-tratamentos com antibióticos no meio para o controle de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sulfato de Polimixina B e Estreptomicina, respectivamente, além destes foi utilizado o antibiótico Rifampicina, como "banho", na inoculação e entre as subculturas, mas sem sucesso.

MATHEWS & RAO (1985) também não tiveram sucesso na descontaminação bacteriana dos explantes originados de plantas maduras, desenvolvendo seu trabalho a partir de sementes da cv. 'Pannyiur-1' tratadas e germinadas "in vitro". O mesmo procedimento foi tomado por LAMEIRA et alii (1992).

Diferentemente, PHILIP et alii (1992) germinaram sementes esterilizadas de três cultivares e desenvolveram plantas isoladas em casa de vegetação controlada, obtendo exemplares "in vivo" livres de bactérias, como fontes doadoras de explante. Entretanto, apesar de não utilizarem sementes como explante, as plantas crescidas em casa de vegetação ainda são fisiologicamente imaturas e geneticamente segregantes.

Plantas propagadas por ápice de broto, geralmente, têm o comportamento fisiológico da forma adulta da planta, da qual estes foram derivados, embora haja casos em que uma rápida e continuada micropropagação tenha induzido a reversão à juvenilidade (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Fica incerto se a extrapolação dos resultados obtidos com material fisiologicamente juvenil possa ser feita para os maduros. Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984) os brotos juvenis têm uma taxa de multiplicação e enraizamento mais elevada do que os maduros, além disso, a proliferação de calos de material juvenil também é mais rápida do que a de material maduro.

2.2 Micropropagação

A mais frequente aplicação das técnicas de cultura de tecidos é a propagação assexual de plantas economicamente importantes. Em virtude do tamanho do propágulo em cultura ser tão pequeno, o termo "micropropagação" é referido para a técnica de propagação assexual "in vitro" (HU & WANG, 1983).

Desse modo, muitas culturas economicamente importantes são melhoradas do ponto de vista sanitário e multiplicadas, às vezes, aos milhares para então irem ao campo como matrizes primárias.

As plantas micropropagadas podem estar livres de contaminações, até viroses, desde que, no início as plantas tenham sido obtidas por cultura de meristemas e/ou termoterapia, e indexadas. Podem ser multiplicadas aos milhares, num pequeno espaço físico, a partir de um pequeno tecido de um clone geneticamente superior (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Segundo HU & WANG (1983), há, basicamente, três rotas disponíveis para a multiplicação do propágulo: (a) aumentando a liberação de gemas axilares; (b) produzindo brotos adventícios através da organogênese; e (c) pela embriogênese somática.

A multiplicação dos explantes por gemas axilares utiliza: a cultura de meristemas, a cultura de ápices de brotos, de meristemas florais e de sementes; além da cultura de nós (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Na produção de brotos adventícios através da organogênese, estes podem ser obtidos diretamente dos tecidos explantados ou indiretamente em calos oriundos dos tecidos explantados. Os embriões também podem ser produzidos diretamente no tecido explantado ou indiretamente através de calos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984)

O uso da proliferação de gemas axilares oriundos de meristemas, ápices de brotos ou de gemas, é preferível devido à melhor qualidade e confiabilidade das plantas regeneradas e, posteriormente desenvolvidas "in vivo" (HU & WANG, 1983).

Se uma fase de calos for mediadora na regeneração de plantas, via organogênese ou embriogênese, a frequência de variações genéticas é aumentada; especialmente na forma de poliploidização e aneuploidização resultantes de anormalidades mitóticas (HU & WANG, 1983).

Segundo METSENAERE (1991), a multiplicação "in vitro" objetivando a clonagem de plantas selecionadas, é uma extensão da propagação vegetativa tradicional "in vivo", que é baseada na ramificação axilar. Portanto, espera-se uma frequência de mutação comparável àquela que ocorre nos métodos clássicos "in vivo".

As chances de variações genéticas e epigenéticas ocorrerem são grandes se o sistema de multiplicação é baseado na formação de brotos adventícios, e ainda maiores, com embriogênese, calos e sistemas celulares (METSENAERE, 1991).

Em *Carica papaya*, LITZ (1984) encontrou uma frequência de 5% de plantas "machos" no campo, a partir de clones hermafroditas micropropagados in vitro. Segundo LITZ (1984) a multiplicação das plantas de mamão se baseia na proliferação simultânea de gemas adventícias e axilares. Na base dos ápices em cultura forma-se uma massa de gemas, semelhante a calo, formando continuamente brotos adventícios (LITZ & JAISWAL, 1991).

SWARTZ (1991), afirma que a quantidade de variação genética das plantas derivadas de cultura de tecidos é dependente da origem dos explantes, se de

meristemas organizados ou de algum tipo de organogênese. As taxas "in vivo" e "in vitro" de variantes genéticos de plantas de violeta (*Saintpaulia ionanda*), são semelhantes porque em ambos está envolvida a produção de brotos adventícios (Preil¹, citado por SWARTZ, 1991).

2.2.1 A Micropropagação Através de Brotos Axilares

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984) a produção de plantas de brotos axilares tem provado ser, para a maioria dos casos, o método mais adequado para a propagação "in vitro", a qual se utiliza da cultura de ápice de brotos e de nós. Os explantes utilizados podem ser brotos, gemas laterais ou meristemas destes. A cultura de meristemas se justifica quando a eliminação de viroses faz parte do objetivo (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). O uso de explantes grandes é preferível pela facilidade em dissecar e pela maior taxa de sobrevivência e de crescimento, destes em relação aos menores, como os meristemas (HU & WANG, 1983).

2.2.2 Estágios da Micropropagação

MOREL (1960) foi o pioneiro na aplicação da cultura de ápices de brotos como ferramenta de multiplicação clonal, obtendo com sucesso a clonagem de orquídeas do gênero *Cymbidium*.

¹PREIL, W. In vitro propagation and breeding of ornamental plants: advantages and disadvantages of variability. In: SEMAL, J. (Ed.), **Genetic Manipulation in Plant Breeding**. Dordrecht. Martinus Nijhoff. 1986. p.377-403.

Outra figura dominante no contexto histórico da biotecnologia vegetal foi MURASHIGE (1974), postulando os conceitos de estágios de desenvolvimento das culturas "in vitro". No estágio 1, ocorre o estabelecimento do explante; no estágio 2, a multiplicação do propágulo; e no estágio 3, o enraizamento e rustificação das plantas para o plantio no solo.

Segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), são reconhecidos, atualmente, também, os estágios 0 e 4, nos quais haveria o tratamento e preparação das plantas doadoras de explantes, no estágio 0, e o tratamento das plantas transferidas para o meio externo, no estágio 4.

2.2.2.1 Estágio 0

No estágio 0 há a seleção e preparação da planta doadora dos explantes, em aspectos como: fotoperíodo, temperatura, umidade, os quais devidamente ajustados propiciam boas respostas em crescimento em cultura (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). Ou para contornar problemas de contaminação, realiza-se a manutenção das plantas doadoras sob condições mais higiênicas, podendo desse modo reduzir algumas contaminações, principalmente, aquelas relacionadas a fungos, essas condições seriam: temperatura relativamente elevada (25°C, ou acima), umidade relativa do ar pouco baixa (75%) e irrigação apenas no solo, não na parte aérea (DEBERG & READ, 1991).

Neste estágio também devem ser feitas aplicações preventivas de pesticidas, quando as plantas doadoras são saudáveis; ou aplicações curativas contra infecções sistêmicas de fungos e/ou bactérias, ou ainda, contra infestações sistêmicas de nematóides e insetos (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

PHILIP et alii (1992), obtiveram plantas de pimenteira-do-reino isentas de patógenos à partir de sementes esterilizadas e cultivadas isoladamente em casa de vegetação e mantidas com tratamento preventivo.

Os processos de esterilização destroem apenas os organismos saprófitos na superfície da planta, mas não as infecções do tecido vegetal (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

2.2.2.2. Estágio 1

O primeiro passo no processo é a obtenção da cultura aséptica do material vegetal selecionado, ou seja, os explantes devem ser transferidos ilesos para o ambiente de cultura, sem danos físicos, fisiológicos ou sanitários. Após o que, este deve ter seu apropriado crescimento (GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Em geral, neste estágio se utiliza uma baixa concentração de citocininas para o crescimento de ápices e gemas (HU & WANG, 1983).

As auxinas são outros fitoreguladores que podem ser requeridos para o crescimento do broto no meio para o crescimento de ápices e gemas, são exigidos em concentrações baixas, variando de 0,045 mM a 10,0 mM, dependendo da cultura (HU & WANG, 1983). Por outro lado, auxina mais usada é o NAA, seguido pelo IBA, IAA e o 2,4-D (HU & WANG, 1983).

As giberilinas são incluídas no meio de cultura no estágio 1 na concentração de 0,29 μ M ou menos (HU & WANG, 1983).

2.2.2.3 Estágio 2

O principal objetivo deste estágio é produzir o número máximo de unidades vegetais, para muitas plantas é possível ter um estágio 2 mais especializado, e limitar

esta função ao aumento e manutenção do estoque de plantas. Sob estas condições o tecido pode permanecer no estágio 2 por diversas gerações sem produzir broto que possa ser enraizado diretamente, havendo necessidade de um estágio 3 especializado em alongação, e um estágio 4 para enraizamento (DEBERG & READ, 1991).

Segundo DEBERG & READ (1991), para a maioria das espécies o método de multiplicação de maior facilidade e eficiência seria o da caulogênese adventícia, ou seja a multiplicação por brotos adventícios, porque esta propicia um maior número de plantas por propágulo. Mas para cada espécie, entretanto, é necessário determinar se o sistema de gemas adventícias produz plantas do tipo original. Variantes genéticas são indesejáveis para orquídeas, reflorestamento, fruticultura e outros plantios intensivos.

Na proliferação axilar de brotos as citocininas são utilizadas para contornar a dominância apical e aumentar a ramificação lateral das gemas axilares (HU & WANG, 1983).

A efetiva concentração da citocinina exógena requerida varia com o sistema de cultura, inicialmente, pode-se ter uma taxa de multiplicação axilar menor do que a taxa de multiplicação adventícia, mas para diversas plantas em cada passagem, ou subcultivo, o número de brotos pode aumentar progressivamente (BHOJWANI & RAZDAN, 1986).

DEBERG & READ (1991) constataram que utilizando o mesmo meio de cultura no estágio 2, havia uma produção inicial de brotos axilares, passando a produzir, após um número de subculturas, a produzir muitos brotos adventícios. Portanto, o modo de multiplicação num dado sistema não é necessariamente fixo.

LITZ & CANOVER (1978) obtiveram um aumento na taxa de multiplicação com o aumento do número de subculturas, iniciando com uma taxa de seis plantas por explante, no primeiro subcultivo e de cerca de dez no terceiro, ficando próximo de seis nos subcultivos de 4 à 9.

Uma dose excessiva de citocinina ou a escolha de uma citocinina não apropriada pode ser responsável por variações epigenéticas, que normalmente só podem ser avaliadas no produto final, muitas vezes no campo. Por essas razões, o material precisa ser continuamente monitorado quanto à resposta da planta à dose de citocinina utilizada, e se esta não induz à multiplicação adventícia.

Em *Fragaria x ananassa* um número ilimitado de subculturas resulta em desordens na produção de campo, tal como: raízes fracas, excessiva formação de flores, frutos de tamanho pequeno e/ou deformados e plantas heterogêneas (Rancillac et alii ¹, citado por DEBERG & READ, 1991).

Segundo HU & WANG (1983), tem sido utilizadas citocininas numa dose próxima de 4,5 μ M. Dentre os tipos de citocininas utilizadas a mais usada é BAP, seguida por KIN, 2iP e ZEA.

As auxinas não promovem a proliferação de brotos axilares, até podem inibir, mas a presença destas pode melhorar o crescimento da cultura (HASEGAWA, 1980). A mais utilizada tem sido NAA, seguida por IBA e IAA.

2.2.2.4. Estágio 3

Fundamentalmente há duas opções neste estágio: produzir mudas sem raízes ou plântulas (DEBERG & READ, 1991).

¹RANCILLAC, M.; NOURRISSEAU, J. G.; NAVATEL, J. C.; ROUDEILLAC, P.

Influence de la multiplication in vitro sur le comportement du plant de fraisier in France. In: BOXUS, P.; LARVOR, P. (Eds), **In Vitro Culture of Strawberry Plants**. CEC Directorate General, Report EUR 10871, p.55-73, 1987.

Várias combinações podem ser feitas entre estágios. Para algumas espécies como *Lycopersicum* e *Santpaulia*, plântulas podem ser liberadas para aclimação saindo do estágio 2, pois muitas já alongam e enraizam. Outras como *Spathiphyllum* podem ser alongados no estágio 2, e entrariam no estágio 3 para enraizar (DEBERG & READ, 1991).

Para a maioria das plantas, a alongação combinada com o enraizamento ou não, é obtida pela transferência dos brotos pequenos para um meio com uma citocinina apropriada numa dose "baixa" (DEBERG & READ, 1991). Em alguns casos o alongamento dos brotos pode ser inibido por "altas" doses de citocinina no estágio 2, entrando no estágio 3 para alongamento, em "baixas" doses de uma citocinina apropriada. Um exemplo disso é o *Sassafras* que micropropagado no estágio 2 com 264 μM de BAP, foi colocado para alongar, num estágio 3, com 22 μM de BAP, e depois transferido para enraizar num estágio 4 (HU & WANG, 1983).

2.2.2.5. Estágio 4

Em algumas espécies o tamanho das plântulas pode ser crítico para o enraizamento e/ou aclimação (PREECE & SUTTER, 1991). Possivelmente, existe um determinado tamanho a ser alcançado *in vitro* que propicie uma maior sobrevivência das plântulas na aclimação no meio externo.

Plântulas de *Cordyline terminalis* enraizam melhor se estas tiverem 2,5 à 5,0 cm de altura. Aquelas que possuíam mais de 5,0 cm de altura tinham uma menor porcentagem de enraizamento mas possuíam uma maior taxa de sobrevivência, após a aclimação, devido principalmente a uma maior área foliar em relação às raízes (MAENE & DEBERG, 1983).

O requerimento hormonal da fase de enraizamento é, praticamente, oposto do balanceamento usado no estágio 2 (HU & WANG, 1983). Frequentemente, a dose de

citocininas utilizadas no estágio 2 inibe a formação de raízes (HU & WANG, 1983; GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

Para o repolho, demonstrou-se que uma proporção exógena de citocinina : auxina maior que 1 foi necessária para o bom crescimento dos brotos, e que a proporção citocinina : auxina menor que 1 foi bom para o crescimento de raízes (KUO & TSAY, 1977). Normalmente, há um resíduo de citocinina do estágio 2, por isso pouca ou nenhuma citocinina é necessária no estágio 3 (HU & WANG, 1983).

Segundo HU & WANG (1983), as auxinas mais frequentemente adicionadas ao meio são: NAA, seguida por IBA, IAA e 2,4-D.

As doses mais frequentemente usadas, segundo GEORGE & SHERRINGTON (1984), são: NAA de 0,05 à 1,0 mg/l, IBA de 0,5 à 3,0 mg/l e IAA de 0,1 à 10,0 mg/l.

Em geral o NAA é melhor para o enraizamento que o IBA e o IAA, e o IBA é melhor do que o IAA (HU & WANG, 1983). Mas para *Prunus cerasifera* o IAA, no escuro, foi significativamente superior ao IBA na luz e no escuro, para promover o enraizamento (HAMMERSCHLAG, 1982).

Para *Artocarpus heterophyllus* o IAA foi significativamente superior ao IBA, e este superior ao NAA em número de raízes. Mas em comprimento de raízes o IBA foi significativamente superior ao IAA, e este último inferior ao NAA (RAHMAN & BLAKE, 1988).

No caso da *Elea europeia* (oliveira) o NAA foi significativamente superior na porcentagem de enraizamento em relação ao IBA e IAA, sendo o IBA superior ao IAA (RUGGINI & FONTANAZZA, 1981).

Os meios solidificados com ágar provêm um menor crescimento de raízes em certas espécies, e devido a sua baixa aeração formam-se poucos pêlos radiculares (GEORGE & SHERRINGTON, 1984; PREECE & SUTTER, 1991). As raízes formadas em plântulas de *Rubus sp* foram delicadas e com pêlos radiculares finos,

comparadas às raízes com múltiplas camadas peridérmicas formadas no solo (DONNELLY et al., 1985).

As raízes formadas em plântulas "in vitro" frequentemente morrem, após a remoção da cultura, em seguida novas raízes adventícias são formadas durante a aclimação (PREECE & SUTTER, 1991). Para plantas com raízes frágeis, a fase inicial do enraizamento, o manuseio por ocasião do transplante de raízes de menor comprimento poderia ocasionar menores danos às plantas, além de facilitar a lavagem do meio, conseguindo assim o menor enovelamento e a maior facilidade de se acondicionar as raízes em bandejas coletivas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

2.3. Aclimação

A maioria das plantas crescidas "in vitro" requerem um processo de aclimação para garantir que um número suficiente destas sobrevivam e cresçam vigorosamente quando transferidas para o solo, nas condições ambientais normais à cultura (PREECE & SUTTER, 1991).

Depois de enraizadas as plantas regeneradas são transferidas para recipientes assépticos, com substratos ou misturas de solo esterilizados com umidade elevada, temperatura amena e luminosidade adequada à cultura (HU & WANG, 1983).

Plântulas crescendo num meio suplementado com açúcar "in vitro" produzem uma pequena quantidade de carboidrato através da fixação do CO_2 . Quando retiradas da cultura estas têm de mudar totalmente para a nutrição autotrófica (GEORGE & SHERINGTON, 1984).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), além do estresse de carbono a planta sofre um estresse hídrico passando de um ambiente com reduzido fluxo transpiratório para um totalmente oposto e que exige um reforço na camada de

cera cuticular e uma absorção mais elevada de água. Além disso, ocorre estresse nutricional, uma vez que a planta estava acostumada à alta disponibilidade de nutrientes e passa para um ambiente que exige um rápido aumento na absorção destes. Além disso, há o estresse microbiológico, uma vez que a planta não tinha contato com microorganismos saprófitos, simbioses e patogênicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

2.4. Micorrização

A inoculação de fungos micorrizo-vesículo-arbuscular (MVA) na ocasião do transplante para as condições "in vivo" pode ser uma alternativa para aumentar a taxa de sobrevivência. CHANG (1986) obteve um aumento de 30% na taxa de sobrevivência com a micorrização de *Fragaria x ananassa* Duch. cv 'Harunoka', com os fungos *Glomus fasciculatum*, *G. etunicatum* e *G. mosseae*.

CORSATO (1993) obteve, com a aclimação e micorrização simultâneas de plântulas de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivares 'Campinas', 'AGF' e 'Sequóia', taxas de sobrevivência diferenciadas em função do tamanho e da cultivar. Plantas de tamanho "grande", tiveram taxas de sobrevivência significativamente superior em relação as plantas de tamanho "médio" e "pequeno" (CORSATO, 1993). Estes resultados confirmam as observações de DESJARDINS et alii (1987) e MAENE & DEBERGH (1983), de que plantas de maior tamanho, e conseqüentemente, com maior quantidade de material de reserva, teriam maiores chances de sobrevivência após a aclimação.

As cultivares 'Campinas' e 'AGF' de *Fragaria x ananassa* Duch. tiveram taxas de sobrevivência após a aclimação significativamente superiores em relação à cultivar 'Sequóia', entretanto a micorrização não mostrou efeito significativo na taxa de sobrevivência das plantas aclimatadas (CORSATO, 1993).

Para a pimenteira-do-reino não foram encontrados trabalhos de inoculação de fungos MVA na ocasião da aclimação "in vivo" das plantas de cultura de tecidos. Entretanto GAVASSONI (1990) e SIVAPRASAD et alii (1993), trabalharam com a inoculação de fungos MVA em mudas enraizadas in vivo e constataram significativo desenvolvimento de raízes e parte aérea em relação à testemunha, além disso, eles também determinaram que as plantas micorrizadas mostravam alguma tolerância ao nematóide *Meloidogine incognita*, por apresentarem aumentos significativos da matéria seca e reduções das podridões radiculares, em relação às plantas não micorrizadas infestadas com o nematóide.

A porcentagem de colonização do fungo MVA nas raízes pode ser uma boa indicação da ocorrência da afinidade fungo-planta, através da correlação do nível de colonização com aumentos significativos de alguma variável.

GAVASSONI (1990) obteve aumentos de até 600% na altura de plantas obtidas de mudas estaquiadas, aos 180 dias após a inoculação, com o fungo MVA *Glomus etunicatum* na cultivar 'Cingapura' de pimenteira-do-reino, obtendo uma porcentagem de colonização de 80 à 95%.

Segundo RAVOLANIRINA et alii (1989) em raízes de porta enxerto de *Vitis vinifera* L. 'SO₄- 102' o fungo MVA *Gigaspora margarita* continha formas de fragmentos ineficazes, os quais conferiram às plantas crescimento em altura não significativos, em relação à testemunha. Ao contrario, *Glomus caledonicum* e *G. fasciculatum*, aumentavam o crescimento em altura em 172% e 291%, respectivamente, em relação à testemunha. Tinham uma porcentagem de colonização de 83%, 95% e 75%, *Glomus caledonicum*, *G. fasciculatum* e *Gigaspora margarita*, respectivamente (RAVOLANIRINA et alii, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Departamento de Química-ESALQ, no Campus da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo.

As sementes da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), utilizadas no trabalho foram obtidas através do Centro de Pesquisas Agropecuárias do Trópico Úmido, CPATU, Belém, PA.

3.1. Germinação das Sementes

As sementes da pimenteira-do-reino das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', foram lavadas com solução de detergente neutro e enxaguadas em água corrente. Após a lavagem as sementes foram esterilizadas superficialmente, em câmara de fluxo laminar, utilizando uma solução contendo hipoclorito de sódio comercial (Q-BOA), 20% e Tween-20, 0,1%, permanecendo em agitação durante vinte minutos. Em seguida foram enxaguadas em água deionizada estéril e imediatamente inoculadas em tubos de ensaio com meio semi-sólido de MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tabela 1). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 14 / 10 horas (luz / escuro). As plantas germinadas foram separadas de suas raízes e multiplicadas no meio MS suplementado com BAP $10 \mu\text{M}$ (Figura 1).

Figura 1 : Fluxograma das fases da micropropagação utilizadas.

Figura 2: Representação esquemática das fases de multiplicação e enraizamento.

Para utilização nos experimentos foram selecionadas linhagens de plantas oriundas de uma única semente, de cada cultivar, para a homogeneização genética dos ensaios. Lotes de plantas de cada linhagens das duas cultivares foram mantidos nesse meio de multiplicação do qual foram retiradas, regularmente, gemas e "micromudas" para a montagem dos experimentos (Figura 1).

3.2. Micropropagação

Nestes ensaios foram retirados explantes de um nó, com apenas uma gema tendo, cada um cerca de 1 cm de comprimento, tomados de plantas estéreis, como descrito anteriormente, e retirados da porção mediana das plantas, excluindo as gemas das regiões apical e basal, pela possibilidade de terem comportamentos distintos. Como as células basais têm mais reservas poderiam brotar mais rápido, e as ápicas menos diferenciadas poderiam brotar mais lentamente. Ou seja, este procedimento visa tentar homogeneizar fisiologicamente as gemas explantadas.

O meio básico constitui dos sais e suplementações normais do meio MS (Tabela 1).

Os tratamentos constituíram, numa primeira fase, de diferentes doses de três fitoreguladores da classe das citocininas: KIN, 2iP e BAP (Tabela 2). Foram feitas 5 repetições por cultivar, e avaliando-se as alturas aos 45 dias.

TABELA 1: Sais componentes e suplementação para constituição do MS
(MURASHIGE & SKOOG, 1962).

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mg)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
K_2HPO_4	170
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	23,8
HBO_3	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6
KI	0,83
$\text{Na MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CoSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2 \text{O}$	0,025
SUPLEMENTOS	
Ácido nicotínico	0,5
Tiamina	0,1
Piridoxina	0,5
Glicina	2,0
I-inositol	100,0
Sacarose	30,0

TABELA 2 : Tratamentos do experimento 1, constituído de doses das citocininas:
 cinetina (KIN), 2-isopentenil-adenina (2iP) e benzil-amino-purina
 (BAP).

1. Testemunha
2. KIN - 2 μ M (0,43 mg/l)
3. KIN - 4 μ M (0,86 mg/l)
4. KIN - 6 μ M (1,29 mg/l)
5. KIN - 8 μ M (1,72 mg/l)
6. KIN - 10 μ M (2,15 mg/l)
7. 2iP - 2 μ M (0,407 mg/l)
8. 2iP - 4 μ M (0,81 mg/l)
9. 2iP - 6 μ M (1,22 mg/l)
10. 2iP - 8 μ M (1,63 mg/l)
11. 2iP - 10 μ M (2,03 mg/l)
12. BAP - 2 μ M (0,45 mg/l)
13. BAP - 4 μ M (0,90 mg/l)
14. BAP - 6 μ M (1,35 mg/l)
15. BAP - 8 μ M (1,80 mg/l)
16. BAP - 10 μ M (2,25 mg/l)

Em um segundo ensaio os tratamentos consistiram de doses mais elevadas da citocinina BAP, uma vez que no experimento anterior esta citocinina não alcançou o ponto máximo da curva de crescimento em altura. Além disso, foi acrescentada mais uma idade de medição, aos 75 dias, ou seja, após um subcultivo, no qual a planta desenvolveu-se por mais 30 dias.

O número de repetições foi de 6 por cultivar, sendo utilizados, novamente as cultivares 'Kudavally' e 'Kuthiravally'.

Os tratamentos estão descritos na Tabela 3.

A primeira quantificação da altura das plantas foi feita aos 45 dias, na ocasião do primeiro subcultivo. Uma segunda quantificação da altura foi feita aos 75 dias de idade. Também, nessa mesma idade foram quantificados o número de nós da planta principal, isto é, aqueles originados por multiplicação axilar; e posteriormente, aos 90 dias de idade as plantas foram repicadas com seccionamento, num segundo subcultivo, e então foram contados o número total de plantas oriundas do nó original, e que corresponde ao número de plantas de origem axilar somados às de origem adventícia.

3.3. Enraizamento

Nestes ensaios utilizaram-se tres tipos de auxinas, em cinco diferentes doses , além da testemunha, para se avaliar o efeito promotor do enraizamento desta auxinas em relação aos cultivares: 'Kudaravally' e 'Kuthiravally'. As auxinas utilizadas foram: IBA, IAA e NAA (Tabela 4).

O meio utilizado foi o MS, com as suplementações padrões.

O material adotado para iniciar o experimento foram caules de plantas com 4 nós, sendo os dois superiores com folhas e os dois inferiores desfolhados (Figura 2), retirados de plantas multiplicadas com 10 μ M de BAP (Figura 1).

TABELA 3: Tratamentos do experimento 2, constituído de doses de benzil-amino-purina (BAP).

1. Testemunha
2. BAP - 2 μ M (0,45 mg/l)
3. BAP - 4 μ M (0,90 mg/l)
4. BAP - 6 μ M (1,35 mg/l)
5. BAP - 8 μ M (1,80 mg/l)
6. BAP - 10 μ M (2,25 mg/l)
7. BAP - 12 μ M (2,70 mg/l)
8. BAP - 14 μ M (3,15 mg/l)
9. BAP - 16 μ M (3,60 mg/l)
10. BAP - 18 μ M (4,05 mg/l)
11. BAP - 20 μ M (4,51 mg/l)
12. BAP - 22 μ M (4,96 mg/l)

TABELA 4: Tratamentos do experimento 3, constituído de doses das auxinas IBA, NAA e IAA.

1. Testemunha
2. IBA - 2 μ M (0,41 mg/l)
3. IBA - 4 μ M (0,81 mg/l)
4. IBA - 6 μ M (1,22 mg/l)
5. IBA - 8 μ M (1,63 mg/l)
6. IBA - 10 μ M (2,03 mg/l)
7. NAA - 2 μ M (0,37 mg/l)
8. NAA - 4 μ M (0,75 mg/l)
9. NAA - 6 μ M (1,12 mg/l)
10. NAA - 8 μ M (1,49 mg/l)
11. NAA - 10 μ M (1,86 mg/l)
12. IAA - 2 μ M (0,35 mg/l)
13. IAA - 4 μ M (0,70 mg/l)
14. IAA - 6 μ M (1,05 mg/l)
15. IAA - 8 μ M (1,40 mg/l)
16. IAA - 10 μ M (1,75 mg/l)

3.4. Aclimação de plantas em relação à micorrização

Para serem aclimatadas "in vivo" as plantas necessitam de condições físicas adequadas, entre estas um sistema radicular efetivo.

Foram testados para as duas cultivares, 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', duas formas de sistema radicular: um de poucas raízes, finas e, aparentemente, mais longas, denominadas de tipo "fina", obtidas num meio sem fitoreguladores; outro de numerosas raízes, curtas e grossas, obtidas através da adição de NAA, denominadas tipo "grossa", ambas as formas desenvolvidas em meio semi-sólido.

Um parâmetro avaliado foi a micorrização das plantas com a inoculação de fungos MVA nas raízes, para se testar a maior viabilidade das plantas no processo de aclimação. Foram utilizados 10 fungos MVA. Cada conjunto de plantas, das duas cultivares, inoculadas com fungos MVA estavam isolados em bandejas individuais, inclusive uma bandeja para testemunhas, para evitar-se a contaminações. Dentro de cada bandeja haviam 40 plantas, vinte de cada cultivar, sendo 6 plantas com raízes do tipo "grossa" e 14 de tipo "fina". As espécies de fungo MVA e as quantidade de esporos do estoque e do inóculo são apresentadas na Tabela 5.

Os esporos dos fungos MVA misturados com areia foram colocados no fundo de "mini-covas" de plantio, com 2 cm de diâmetro por 3 de profundidade, feitas em areia autoclavada, colocada dentro de copos de PVC de 200 ml de capacidade. As quantidades de inóculo são apresentadas na Tabela 5.

As bandejas foram cobertas com plástico transparente nos primeiros 15 dias após o plantio, para manter a umidade. Posteriormente, foram descobertas gradativamente, em 3 dias. As plantas foram irrigadas com a solução de HOAGLAND & ARNOLD (1950), 25% da concentração normal (Tabela 6), na ocasião do plantio e repetidas a cada 20 dias.

TABELA 5: Espécies de fungo MVA e as quantidades de esporos inoculados na ocasião do plantio "in vivo" para aclimação em casa de vegetação.

Fungo MVA	No. de esporos em 50ml de estoque	Volume de inóculo (ml)	No. de esporos no inóculo
1. <i>Acaulospora appendiculata</i>	4068	1,0	81,36
2. <i>A. morrowae</i>	2700	1,0	54,00
3. <i>A. scrubiculata</i>	1770	1,0	35,40
4. <i>A. longula</i>	1800	1,0	36,00
5. <i>Glomus clarum</i>	624	1,0	12,48
6. <i>G. macrocarpum</i>	366	5,0	36,60
7. <i>G. etunicatum</i>	1404	2,0	56,16
8. <i>Gigaspora margarita</i>	342	4,0	27,36
9. <i>Entrophospora colombiana</i>	16200	0,5	162,00
10. <i>Scuttillospora heterogama</i>	540	3,0	32,40

A contagem de sobreviventes foi feita aos 30 dias após o plantio. Aos 60 dias as plantas foram retiradas e colhidos os seguintes dados: porcentagem de colonização, massa da matéria fresca da parte aérea e massa da matéria fresca da raiz.

3.4.1. Metodologia para a coloração das raízes (PHILIPS & HAYMAN, 1970)

Segmentos de raízes fixados em formaldeído-ácido-acético (FAA), foram lavados com água destilada e aquecidos em solução de KOH (10%) à 90°C por uma hora em banho maria, para remoção do conteúdo citoplasmático, sendo então lavados com água destilada. A seguir as raízes foram lavadas em solução de HCl (5%) por 5 minutos para remoção dos resíduos de KOH, e em seguida, imersas na solução corante e aquecidas em banho maria à 90°C por 20 minutos. Após esse tempo removeu-se as raízes da solução corante mantendo-as em solução de lacto-glicerol até o momento da avaliação.

3.4.2. Avaliação da porcentagem de infecção das raízes (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980).

Foram distribuídas 500 mg de raízes coradas numa placa de Petri quadriculada (raio= 4,75 cm), separando-as uniformemente por toda a superfície. Observando-se à lupa estereoscópica, procedeu-se apenas à contagem das raízes que cruzavam as linhas verticais, calculando a porcentagem de infecção segundo a relação:

Número Total de Raízes Colonizadas

$$\frac{\text{Número Total de Raízes Colonizadas}}{\text{Número Total de Raízes Observadas}} \times 100 = \%$$

Número Total de Raízes Observadas

Considerou-se como colonizada todas aquelas raízes que, quando observadas à lupa, cruzavam as linhas verticais e apresentavam qualquer estrutura característica do fungo MVA, podendo ser : vesículas, hifas, esporos ou arbúsculos. Sendo amostradas 3 plantas por tratamento.

3.4.3. Massa da matéria fresca da parte aérea e da raiz

A massa da matéria fresca (MMF), em gramas, da parte aérea e da raiz, foram obtidas imediatamente após a remoção da planta do substrato de crescimento.

TABELA 6: Solução Nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950), e as concentrações utilizadas (mg/l).

SAIS	CONCENTRAÇÃO (mg/l)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	28,750
MgSO_4	123,250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	177,000
KNO_3	101,000
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	8,300
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7,225
H_3BO_3	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,423
$\text{CuSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,020
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,055
H_2MoO_4	0,005

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fase de Alongamento

4.1.1. Comportamento das cultivares em altura com relação à três citocininas: cinetina, 2-isopentenil-adenina e benzil-adenina.

Neste experimento as cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' foram submetidas à 3 citocininas KIN, 2iP e BAP, isoladamente, em seis doses (0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ M). As plantas foram avaliadas pela altura (em cm) aos 40 dias.

As cultivares comportaram-se de forma similar nas doses utilizadas. Exceto a cultivar 'Kudaravally' que mostrou melhores respostas com o aumento das doses da citocinina BAP (Figura 3). Ao contrario, a cultivar 'Kuthiravally' não apresentou resposta positiva no crescimento em altura a nenhuma dose das citocininas (Figura 4).

4.1.2. Comportamento das cultivares em altura com relação ao aumento das doses de BAP.

Neste experimento as cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' foram submetidas à 12 doses da citocinina BAP, de 0 à 22 μ M, uma vez que no experimento anterior não foi alcançado um ponto máximo de crescimento em altura de plantas.

A altura das duas cultivares foi avaliada em duas idades, 53 e 75 dias, em ambas as idades a cultivar 'Kudaravally' foi numericamente maior do que a cultivar 'Kuthiravally' em todos os níveis excetuando a testemunha, no qual a cultivar 'Kudaravally' cresce muito pouco. Na idade 53 dias a cultivar 'Kudaravally' foi superior

estatisticamente à cultivar ‘Kuthiravally’ nas doses 10 e 12 μM de BAP (Figura 5). E na idade de 75 dias foi superior estatisticamente à cultivar ‘Kuthiravally’ na dose de 10 μM de BAP (Figura 6).

Foi feita uma comparação entre o crescimento nas idades 53 e 75 dias de cada cultivar. Constatando-se que para a cultivar ‘Kudaravally’ que ao se utilizar as doses de 6, 8, 10 e 12 μM de BAP, é vantajoso manter as plantas inoculadas em um desses tratamentos até 75 dias, sendo que o tratamento mais indicado é o de 10 μM de BAP (Figura 7). Quanto as demais doses (0, 2, 4, 14, 18, 20 e 22 μM de BAP) é indicado manter as plantas num desses tratamento por um período de 53 dias (Figura 7).

Para a cultivar ‘Kuthiravally’ constatou-se que ao se utilizar as doses de 6 e 16 μM de BAP é vantajoso manter as plantas inoculadas nesses tratamentos por um período de 75 dias (Figura 8), sendo mais indicada a dose de 6 μM . Nas demais doses (0, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 18, 20 e 22 μM de BAP) é mais indicado manter as plantas nesses tratamentos, por um período de 53 dias (Figura 8).

Figura 3: Médias de altura (cm) da cultivar ‘Kudaravally’ submetida à 6 doses (μM) citocininas KIN, 2iP e BAP, aos 40 dias. Letras iguais na mesma não diferem estatisticamente.

Figura 4: Médias de altura (cm) da cultivar 'Kuthiravally' submetida à 6 doses das citocininas KIN, 2iP e BAP, de 0 à 10 µM, aos 40 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 5: Médias de altura (cm) das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM, aos 53 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 6: Médias de altura (cm) das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM, aos 75 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 7: Médias de altura (cm) da cultivar 'Kudaravally' em duas idades 53 e 75 dias, submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 8: Médias de altura (cm) da cultivar 'Kuthiravally' em duas idades, 53 e 75 dias, submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

4.2. Fase de Multiplicação

4.2.1. Comportamento das cultivares em relação à produção de brotos axilares.

A cultivar 'Kudaravally' mostrou tendência para produzir um maior número de brotos axilares do que a cultivar 'Kuthiravally' (Figura 9).

Esperava-se que os tratamentos que induziam plantas mais altas produzissem um maior número de brotos axilares. A cultivar 'Kudaravally' esteve próximo disso, pois os tratamentos de 6 à 16 µM de BAP, que produziram plantas mais altas (Figura 7), estão entre os que produziram maior número de brotos axilares. Entretanto, a dose de 10 µM de BAP, que induz a produção de plantas mais altas aos 75 dias na cultivar 'Kudaravally' (Figuras 6 e 7), produziu menos brotos axilares do que a dose de 16 µM de BAP, isto se explica por ter havido um crescimento com a incidência maior do alongamento celular no tratamento de 10 µM de BAP e à 16 µM houve uma incidência maior da divisão celular, que resultou na produção de mais brotos axilares do que nos demais tratamentos (Figura 9).

Figura 9: Médias de número de brotos axilares das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP (µM), aos 75 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

4.2.2. Comportamento dos cultivares em relação a produção de brotos adventícios.

Ao contrário do que ocorreu com brotos axilares, a cultivar 'Kuthiravally' mostrou tendência a produzir mais brotos adventícios do que a cultivar 'Kudaravally' (Figura 10).

Na dose de 0 µM de BAP a cultivar 'Kudaravally' tem produção nula de brotos adventícios (Figura 10), produzindo uma média de 3 brotos axilares (Figura 9) e crescendo apenas 3 cm num período de 75 dias (Figura 7). Já a cultivar 'Kuthiravally' produz aproximadamente 2 brotos adventícios num período de 90 dias (Figura 10), 5 brotos axilares (Figura 9) e cresce, também 3 cm de altura num período de 75 dias (Figura 8), produzindo plantas de porte mais compacto.

Com esses resultados fica claro que o crescimento em altura, a produção de brotos axilares e de adventícios não podem ser considerados como eventos distintos, isto é, as curvas das três variáveis, embora sigam uma certa sequência, mencionada anteriormente, sobrepõem-se parcialmente, principalmente para a cultivar 'Kudaravally'.

Isto explica porque a dose de 16 μM de BAP é que produz mais brotos axilares (Figura 9) e adventícios (Figura 10) para a cultivar 'Kudaravally', e o ponto máximo das duas curvas praticamente coincidem numa mesma dose de BAP. No crescimento em altura a cultivar 'Kudaravally' tem seu crescimento máximo à 10 μM de BAP (Figura 7), também tem os maiores valores de produção de brotos axilares (Figura 9) e adventícios (Figura 10). Isto indica que a planta não direciona os produtos do seu metabolismo a um único destes eventos, e no intervalo de 10 à 16 μM de BAP ocorre um intenso estímulo do metabolismo da parte aérea "in vitro" da cultivar 'Kudaravally'.

Para a cultivar 'Kuthiravally' há uma sobreposição das curvas de altura, brotos axilares e adventícios mais espaçada, sendo o ponto máximo do crescimento em altura à 6 μM de BAP (Figura 8), o de número de brotos axilares à 12 μM de BAP (Figura 9) e o de brotos adventícios à 16 μM de BAP (Figura 10), portanto estas se sobrepõem menos do que na 'Kudaravally'.

4.2.3. Comportamento das cultivares em relação a produção de brotos totais

A cultivar 'Kuthiravally' produziu em todos os tratamentos um maior número de brotos totais do que a cultivar 'Kudaravally' (Figura 11).

O ponto de máxima produção de brotos totais foi à 16 μM de BAP para as duas cultivares (Figura 12).

A separação de brotos totais em axilares e adventícios pode ser necessária se for comprovado que brotos adventícios produzem uma proporção de variantes genéticas e epigenéticas comercialmente inviável em relação aos produzidos através de brotos axilares. Nesse caso seriam excluídos os brotos de origem adventícia produzidos na base da planta principal.

A frequência de variantes genéticas e epigenéticas pode variar conforme o cultivar. A cultivar 'Kuthiravally', por exemplo, com uma produção maior de brotos adventícios em relação à cultivar 'Kudaravally', provavelmente, terá uma frequência de variantes genéticas e epigenéticas nas plantas de origem adventícia também maior do que na 'Kudaravally'.

As maiores médias obtidas em número de brotos totais de aproximadamente 22 brotos para a cultivar 'Kudaravally' e 33 para a 'Kuthiravally' (Figura 12) estão próximos aos obtidos por PHILIP et alii (1992) com as cultivares 'Aravally',

'Pannyiur-1' e 'Karimunda'. Entretanto, o período utilizado por PHILIP et alii (1992) foi de 120 dias com 2 subcultivos, ao invés de 90 dias e apenas 1 subcultivo utilizado no presente trabalho, além disso, os brotos repicados por PHILIP et alii (1992) não eram constituídos de um nó mas 3 à 4 por broto, o dariam de 75 à 100 nós à cada 120 dias ou 17,5 à 25 brotos após cada subcultivo de 30 dias.

As duas cultivares podem ser diferenciadas entre si pelos hábitos característicos de multiplicação. A cultivar 'Kudaravally', por exemplo, na ausência de fitoreguladores, BAP no caso, tem um crescimento em altura inferior ao da 'Kuthiravally', produzindo 3 brotos axilares e nenhum adventício na ausência de BAP. Ao contrário, a cultivar 'Kuthiravally' produz, também, 3 brotos axilares (Figura 9) e 5 brotos adventícios (Figura 10). Na ausência de BAP esta cultivar comporta-se como se no meio de cultura ainda existissem resíduos de citocininas, mas o que tudo indica deve haver uma produção endógena de citocininas que proporcionam esta multiplicação independente, como determinado por MORRIS et alii (1986) com a chamada "Habituação Citocinínica" de calos de fumo, no qual o tecido do calo não exige citocinina exógenas "in vitro" para continuar crescendo.

As duas cultivares também apresentam outras características diferenciadoras. As folhas têm tons de coloração diferente, a 'Kudaravally' é de um verde mais escuro, já a 'Kuthiravally' é de um tom mais claro, parecendo o início de uma deficiência nutricional de nitrogênio, principalmente na fase de multiplicação. Provavelmente essa desnutrição esteja realmente ocorrendo em função do grande dispêndio de compostos orgânicos que esta cultivar emprega para produzir uma "massa" de brotos adventícios na base do broto principal. Essa grande produção de brotos adventícios é outro aspecto diferenciador entre as duas cultivares.

Outro aspecto que distingue uma cultivar da outra "in vitro" é a disposição das nervuras na parte superior do limbo foliar. Na cultivar 'Kudaravally' as nervuras ficam como que inseridas em "pequenos sulcos" observados no relevo da superfície superior do limbo foliar. Ao contrário, a cultivar 'Kuthiravally' tem o hábito de apresentar "in vitro" a superfície superior do limbo foliar plana, e as nervuras no nível desta superfície, ou às vezes, proeminentes em relação à superfície.

Figura 10: Médias de número de brotos adventícios por planta das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM, aos 90 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 11: Médias de número de brotos totais por planta das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 µM, aos 90 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 12: Número de brotos totais das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 12 doses de BAP, de 0 à 22 μM, aos 90 dias. As médias das duas cultivares estão ajustadas às equações de regressão polinomial. ** Significativo à 1%.

4.3. Enraizamento das micromudas

4.3.1. Comportamento das cultivares em comprimento médio de raízes por planta em relação às auxinas ácido indol-acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).

A cultivar 'Kudaravally' não respondeu em comprimento médio de raízes por planta, as auxinas IAA, IBA e NAA nas doses 0, 2, 4, 6, 8 e 10 μM (Figura 13).

Já a cultivar 'Kuthiravally' respondeu significativamente apenas a NAA, sendo a dose de 10 μM a que dá melhores resultados em comprimento médio de raízes, aos 66 dias (Figura 14).

4.3.2. Comportamento das cultivares em número de raízes por planta em relação às auxinas ácido indol-acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).

A cultivar 'Kudaravally' respondeu positivamente às auxinas NAA e IAA, sendo o NAA superior em número de raízes à IAA nas doses 4 e 10 μM . A auxina IBA não apresentou resposta em número de raízes por planta (Figura 15). Já na cultivar 'Kuthiravally' respondeu positivamente às auxinas NAA e IBA em todas as doses, sendo a dose de 10 μM mais indicada (Figura 16).

4.3.3. Comportamento das cultivares em massa da matéria seca de raízes por planta em relação às auxinas: ácido indol-acético (IAA), ácido indol-butírico (IBA) e ácido naftaleno-acético (NAA).

A cultivar 'Kudaravally' respondeu positivamente às auxinas NAA e IAA, não apresentando resposta em massa da matéria seca de raízes para o IBA. A auxina NAA mostrou superioridade sobre o IAA e IBA nas doses 4, 6, 8 e 10 μM , sendo a dose de 10 μM a mais indicada (Figura 17). A cultivar 'Kuthiravally' respondeu de forma positiva somente ao NAA, não respondendo, absolutamente às auxinas IAA e IBA (Figura 18).

O comportamento das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' submetidas ao NAA em relação ao comprimento, número e matéria seca de raízes parecem estar correlacionadas, excetuando o comprimento de raízes da cultivar 'Kudaravally' (Figura 13).

As auxinas NAA e IBA não apresentam proporcionalidade entre as variáveis. O IAA na cultivar 'Kudaravally' produz na dose de 8 μM em número (Figura 15) e em comprimento de raízes (Figura 13) equivalentes ao do NAA, mas produz menos da metade da massa de matéria seca que o NAA produz na mesma dose 8 μM (Figura 17). Isto mostra que estas variáveis podem ocorrer como eventos distintos.

Embora não tenham sido estudados aspectos referentes a parte aérea durante o enraizamento, foi observada se uma razão inversa entre o aumento da dose de auxina e o número de folhas produzidas no período, chegando ao ponto de nas doses de 10 μM

de NAA as plantas produziram somente 1 à 2 folhas em 66 dias, sendo que a testemunha da 'Kuthiravally' produziu de 5 à 6 folhas por planta.

Outro aspecto observado, também sem comprovação estatística foi uma razão inversa entre a auxina IBA e a citocinina BAP no desenvolvimento de raízes. Quando a auxina IBA foi adicionada a 1,0 mg/l (4,92 μ M) no meio com a cultivar 'Kudaravally', por um período de 80 dias, foram produzidas cerca de 20 raízes, com um comprimento médio de aproximadamente 5 cm. Em outro tratamento constituído de 1,0 mg/l de IBA e 0,1 mg/l de BAP (0,45 μ M) as plantas produziram cerca de 6 raízes por planta, com um comprimento médio de aproximadamente 5 cm. Em um terceiro tratamento manteve-se a dose de 1,0 mg/l de IBA e aumentou-se para 0,5 mg/l de BAP (2,26 μ M) obtendo-se 3 raízes de aproximadamente 6 cm. Este ensaio demonstrou haver uma razão inversa entre a auxina IBA e a citocinina BAP no número de raízes da cultivar 'Kudaravally'.

Figura 13: Médias de comprimento médio de raízes por plantas da cultivar 'Kudaravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 μ M, das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 14: Médias de comprimento médio de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 µM, das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 15: Médias de número de raízes por planta da cultivar 'Kudaravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 µM, das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 16: Médias de número de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally' submetida à 6 doses, de 0 à 10 µM, das auxinas IBA, IAA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 17: Médias de massa de matéria seca (g) de raízes por planta da cultivar 'Kudaravally', submetidas à 6 doses, de 0 à 10 µM, das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

Figura 18: Médias de massa de matéria seca (mg) de raízes por planta da cultivar 'Kuthiravally', submetida à 6 doses, de 0 à 10 μM , das auxinas IAA, IBA e NAA, aos 66 dias. Letras iguais na mesma dose não diferem estatisticamente (TUKEY 1%).

4.4. Aclimação

4.1.1. Sobrevivência das plantas micropropagadas

Não considerando o tipo de cultivar de pimenteira-do-reino ou a espécie de fungo MVA inoculado nas raízes quando utilizamos plantas de raízes "grossas" estas tendem a apresentar uma porcentagem de sobrevivência maior em relação às do tipo "finas".

A cultivar 'Kudaravally' embora seja pouco mais vigorosa do que a 'Kuthiravally' tende a apresentar uma porcentagem de sobrevivência menor durante a fase de aclimação (Tabela 7).

TABELA 7: Porcentagem de sobreviventes após a aclimação “in vivo”, considerando apenas o tipo de raízes de plantas das cultivares ‘Kudaravally’ e ‘Kuthiravally’, aos 50 dias.

CULTIVAR	RAIZES FINAS	RAIZES GROSSAS	TOTAL
’Kudaravally’	69,4%	88,64%	80,91%
’Kuthiravally’	96,1%	100,00%	97,27%
Total	86,36%	91,41%	91,61%

As plantas de raízes “grossas”, isto é, as induzidas com a auxina NAA, tendem a apresentar uma porcentagem de sobrevivência maior do que as raízes “finas”, enraizadas sem nenhum tratamento (Figuras 19 e 20), principalmente por conterem reservas nutricionais, como se referem DESJARDINS et al. (1987).

BABU et al. (1994) realizaram a aclimação “ex vitro” de plantas de pimenteiras de espécie *Piper betle* L., sendo que estas foram enraizadas num meio sem fitorreguladores, ou seja, equivalente ao tratamento de raízes “finas”, e obtiveram uma taxa de sobrevivência de 80%, aproximada ao obtido neste experimento que foi de 86,36%.

4.4.2. Porcentagem de colonização de raízes por fungos endomicorrízicos (MVA)

nas cultivares ‘Kudaravally’ e ‘Kuthiravally’.

Provavelmente, o principal motivo da baixa porcentagem de colonização pelos fungos endomicorrízicos tenha sido o curto período de desenvolvimento das plantas para análise, 50 dias após a inoculação dos esporos (Tabela 8 e 9). GAVASSONI (1990) e

RAVOLANIRINA et al. (1989) utilizaram um período de 180 dias após a inoculação dos esporos, o que nos indica que os fungos endomicorrízicos precisam de um tempo maior para conseguir proporcionar uma colonização efetiva. RAVOLANIRINA et al. (1989) somente encontraram significância nas plantas que colonizaram mais de 80% das raízes. O fungo MVA *Glomus macrocarpum* foi o que proporcionou a porcentagem de colonização mais elevada (Tabela 8) e respondendo significativamente em termos de aumento de massa da matéria fresca da raiz e da parte aérea no tipo “grossa” de raiz em relação à “fina” para a cultivar ‘Kudaravally’ (Tabelas 10 e 12).

Tabela 8: Médias de porcentagem de colonização de raízes da cultivar ‘Kudaravally’ por fungos MVA aos 50 dias após a inoculação

FUNGO MVA	TIPO DE RAIZ	
	“FINA”	“GROSSA”
Testemunha	00,00	00,00
<i>Glomus macrocarpum</i>	60,48	61,39
<i>G. clarum</i>	38,32	23,19
<i>G. etunicatum</i>	50,56	31,72
<i>Gigaspora margarita</i>	26,63	23,24
<i>Acaulospora scrubiculata</i>	23,00	18,25
<i>A. longula</i>	18,63	27,58
<i>A. appendiculata</i>	41,10	43,59
<i>A. morrowae</i>	29,21	41,96
<i>Scutellospora heterogama</i>	20,00	18,73
<i>Entrophora colombiana</i>	33,88	36,74

Tabela 9: Médias de porcentagem de colonização de raízes da cultivar 'Kuthiravally' por fungos MVA aos 50 dias após a inoculação.

FUNGO MVA	TIPO DE RAIZ	
	"FINA"	"GROSSA"
Testemunha	00,00	00,00
<i>Acaulospora appendiculata</i>	27,40	31,71
<i>A. morrowae</i>	49,39	13,22
<i>A. scrubiculata</i>	35,46	34,07
<i>A. longula</i>	19,63	20,38
<i>Glomus macrocarpum</i>	20,47	30,06
<i>G. clarum</i>	31,05	53,97
<i>G. etunicatum</i>	23,89	53,48
<i>Gigaspora margarita</i>	41,27	28,08
<i>Entrophora colombiana</i>	15,02	17,57
<i>Scuttilospora heterogama</i>	19,93	24,12

FIGURA 19: Porcentagem de sobreviventes após a aclimação “in vivo” de plantas da cv. ‘Kudaravally’, inoculados em dois tipos de ocasião do transplante com fungos MVA, aos 50 dias. Fungos MVA: A.app., *Acaulospora appendiculata*; A.mor., *A. morrowae*; A.scr., *A. scrubiculata*; A.lon., *A. longula*; G.cla., *Glomus clarum*; G.mac., *G. macrocarpum*; G.etu., *G. etunicatum*; G.mar., *Gigaspora margarita*; E.col., *Entrophora colombiana*; S.het., *Scuttilospora heterogama*; Test., Testemunha.

FIGURA 20: Porcentagem de sobreviventes após aclimação "in vivo" das plantas da cultivar 'Kuthiravally', inoculadas com fungos MVA na ocasião do transplante em 2 tipos de raízes aos 50 dias. Os fungos utilizados foram: A.app., *A. appendiculata*; A.mor., *A. morrowae*; A.scr., *A. scrubiculata*; A.lon., *A. longula*; G.cla., *Glomus clarum*; G.mac., *G. macrocarpum*; G.etu., *G. etunicatum*; G.mar., *Gigaspora margarita*; E.col., *Entrophora colombiana*; S.he., *Scuttilospora heterogama*; Test., Testemunha.

4.4.3. Massa da matéria fresca da parte aérea (MFPA) após a aclimação em função de fungos endomicorrízicos (MVA).

A testemunha mostrou superioridade para os tipos “grossa”, em relação a “fina”, para as duas cultivares. A testemunha, também apresentou diferença significativa entre tipos de fungos, mas apenas para a cultivar ‘Kudaravally’ do tipo “grossa” de raiz, sendo superior aos fungos *Glomus etunicatum*, *Acaulospora morrowae*, *A. appendiculata* e *Gigaspora margarita* (TUKEY 1%) [Tabela 10].

Glomus macrocarpum mostrou uma tendência a superioridade nos tipos “fina” e “grossa” de raiz, da cultivar ‘Kudaravally’, sendo o primeiro e o segundo na classificação, por peso (g), respectivamente (Tabela 10). *Glomus macrocarpum* foi superior estatisticamente aos fungos *Acaulospora morrowae*, *A. appendiculata* e *Gigaspora margarita* (Tabela 10).

Ao contrário, para cultivar ‘Kuthiravally’, o fungo *Glomus macrocarpum* apresentou uma tendência a inferioridade, para os dois tipos de raízes, sendo o último na classificação por peso (g) [Tabela 11].

As plantas da cultivar ‘Kudaravally’ inoculadas com os fungos *Glomus macrocarpum*, *Entrophora colombiana* e *Acaulospora scrubiculata*, do tipo “grossa” de raiz mostraram superioridade estatística sobre as do tipo “fina” (TUKEY 1%) [Tabela 10].

As plantas da cultivar ‘Kuthiravally’ não apresentaram diferença significativa entre fungos. Entretanto, nos tratamentos Testemunha e os fungos *Acaulospora longula*, *Entrophora colombiana*, *Acaulospora scrubiculata* e *Scutellospora heterogama*, as plantas do tipo “grossa” de raiz foram superiores às do tipo “fina” [Tabela 11].

Para a massa da matéria fresca da parte aérea a Testemunha mostrou tendência a superioridade sobre os tratamentos com fungos MVA no tipo “grossa” de raiz, para as duas cultivares (Figuras 10 e 11). Além disso, o tipo “grossa” de raiz foi estatisticamente superior à “fina” na Testemunha e nos tratamentos com os fungos *Acaulospora scrubiculata*, *A. longula* e *Entrophora colombiana*, na cultivar ‘Kuthiravally’ (Figura 11). Também o tipo “grossa” de raiz foi estatisticamente superior a “fina” para a Testemunha, *Glomus macrocarpum*, *Entrophora colombiana* e *Acaulospora scrubiculata*, na cultivar ‘Kudaravally’ (Figura 10).

TABELA 10: Médias de massa da matéria fresca da parte aérea (g) de plantas aclimatadas “in vivo” da cultivar ‘Kudaravally’, inoculada nas raízes com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliados aos 50 dias. Letras minúsculas representam comparações na horizontal, maiúsculas representam comparações na vertical (TUKEY 1%) [CV 41,942%].

FUNGOS	TIPO DE RAIZ	
	"FINA"	"GROSSA"
Testemunha	0,934 b A	2,559 a A
<i>Glomus macrocarpum</i>	1,274 b A	2,499 a A B
<i>Entrophora comlobiana</i>	1,012 b A	2,237 a A B
<i>Acaulospora scrubiculata</i>	0,853 b A	1,724 a A B
<i>A. longula</i>	1,196 b A	1,660 a B C
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,954 a A	1,653 a B C D
<i>Glomus clarum</i>	1,099 b A	1,564 a B C D
<i>G. etunicatum</i>	1,123 a A	1,344 a B C D
<i>Acaulospora morrowae</i>	1,231 a A	1,101 a B C D
<i>A. appendiculata</i>	0,794 a A	1,047 a C D
<i>Gigaspora margarita</i>	1,123 a A	1,018 a D

TABELA 11: Médias de massa da matéria fresca da parte aérea (g) de plantas aclimatadas da cultivar ‘Kuthiravally’, inoculadas com fungos MVA nas raízes na ocasião do plantio “in vivo” e avaliados aos 50 dias. Letras minúsculas comparação horizontal (TUKEY 5%), letras maiúsculas comparação vertical (TUKEY 1%); letras iguais não diferem estatisticamente. (CV 41,942%).

Fungos MVA	TIPO DE RAIZ	
	"FINA"	"GROSSA"
Testemunha	0,935 b A	1,861 a A
<i>Acaulospora longula</i>	1,201 b A	1,820 a A
<i>Entrophora colombiana</i>	0,999 b A	1,741 a A
<i>Acaulospora scrubiculata</i>	1,030 b A	1,686 a A
<i>A. appendiculata</i>	1,001 a A	1,502 a A
<i>Glomus etunicatum</i>	1,044 a A	1,426 a A
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,745 b A	1,378 a A
<i>Gigaspora margarita</i>	1,146 a A	1,368 a A
<i>Glomus clarum</i>	1,118 a A	1,313 a A
<i>Acaulospora morrowae</i>	1,080 a A	1,187 a A
<i>Glomus macrocarpum</i>	0,629 a A	1,189 a A

4.4.4. Massa da matéria fresca da raiz (MFR) e a influência dos fungos endomicorrízicos

As plantas da cultivar ‘Kudaravally’ com raízes do tipo “grossa” e inoculadas com o fungo *Scutellospora heterogama*, não diferiram Testemunha e de *Glomus macrocarpum*, mas foram superiores aos demais tratamentos com fungos MVA (TUKEY 1%) [Tabela 12].

As plantas do tipo “grossa” cultivar ‘Kudaravally’ dos tratamentos *Scutellospora heterogama*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora longula*, foram superiores às do tipo “fina” de raiz (TUKEY 5%) [Tabela 12].

Nas plantas da cultivar ‘Kuthiravally’ não houve diferença significativa entre fungos dentro de um mesmo tipo de raiz (TUKEY 1%) [Tabela 13]. Entretanto, as plantas do tipo “grossa” de raiz, inoculadas com fungos *Acaulospora scrubiculata*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus macrocarpum*, *G. clarum* e a Testemunha, foram superiores estatisticamente às do tipo “fina” de raiz (TUKEY 1%) [Tabela 13].

Para a massa da matéria fresca da raiz, *Scutellospora heterogama*, Testemunha e *Glomus macrocarpum* foram superiores à *Acaulospora morrowae* e *Entrophora colombiana* no tipo “grossa” de raiz da cultivar ‘Kudaravally’ (Figura 12). Além disso, nesses tratamentos anteriormente mencionados, acrescidos do tratamento com *Gigaspora margarita* e *Acaulospora longula*, apresentaram superioridade do tipo “grossa” de raiz sobre a “fina” (Figura 12).

Na cultivar ‘Kuthiravally’ não houve diferença entre os tratamentos para massa da matéria fresca da raiz, mas houve superioridade do tipo “grossa” de raiz sobre a “fina” nos tratamentos: *Acaulospora scrubiculata*, *Scutellospora heterogama*, *Glomus macrocarpum*, *Glomus clarum* e Testemunha (Figura 13).

TABELA 12: Médias de massa da matéria fresca da raiz (g) aclimatadas “in vivo” da cultivar ‘Kudaravally’, inoculadas com fungos MVA na ocasião do plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras minúsculas comparação horizontal (TUKEY 5%), maiúsculas comparação vertical (TUKEY1%).

FUNGOS	TIPO DE RAIZ	
	"FINA"	"GROSSA"
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,558 b A	3,200 a A
Testemunha	0,564 b A	2,406 a A B
<i>Glomus macrocarpum</i>	1,204 b A	2,374 a A B
<i>Acaulospora scrubiculata</i>	0,436 b A	2,102 a A B C
<i>A. appendiculata</i>	1,030 b A	1,765 a B C D
<i>G. clarum</i>	1,109 a A	1,683 a B C D
<i>Gigaspora margarita</i>	0,710 b A	1,660 a B C D
<i>Glomus etunicatum</i>	1,016 a A	1,619 a B C D
<i>Acaulospora longula</i>	0,487 b A	1,521 a B C D
<i>A. morrowae</i>	0,896 a A	1,018 a C D
<i>Entrophora colombiana</i>	0,904 a A	0,680 a D

TABELA 13: Médias de massa fresca da raiz (g) de plantas aclimatadas “in vivo” da cultivar ‘Kuthiravally’, inoculadas com fungos MVA na ocasião da plantio e avaliadas aos 50 dias. Letras minúsculas comparação horizontal, maiúsculas comparação vertical (TUKEY 1%).

FUNGOS	TIPOS DE RAIZ	
	“FINA”	“GROSSA”
<i>Acaulospora scrubiculata</i>	0,281 b A	1,347 a A
<i>Scutellospora heterogama</i>	0,269 b A	1,262 a A
<i>Glomus macrocarpum</i>	0,310 b A	1,211 a A
<i>G. clarum</i>	0,163 b A	1,115 a A
Testemunha	0,192 b A	1,114 a A
<i>Acaulospora morrowae</i>	0,165 a A	1,034 a A
<i>A. appendiculata</i>	0,406 a A	1,033 a A
<i>Entrophora colombiana</i>	0,311 a A	1,015 a A
<i>Acaulospora longula</i>	0,147 a A	0,924 a A
<i>Gigaspora margarita</i>	0,444 a A	0,815 a A
<i>Glomus clarum</i>	0,314 a A	0,687 a A

4.5. Considerações finais

O presente trabalho teve o objetivo de estudar o comportamento "in vitro" de duas cultivares da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) em diferentes fases do processo de micropropagação, desde a manipulação "in vitro" até a aclimação "ex vitro".

Sementes das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' foram esterilizadas e germinadas "in vitro". Posteriormente, foram multiplicadas, com a adição de 10 μ M de BAP, e em seguida foi selecionada uma linhagem de plantas de cada cultivar oriundas de uma única semente. Lotes dessas duas linhagens foram mantidos nesse meio de multiplicação, do qual foram retirados regularmente, gemas e "micromudas" para a montagem dos experimentos.

Os experimentos de multiplicação foram feitos em duas fases. Na primeira as duas cultivares foram submetidas a seis doses de 0 à 10 μ M, das citocinas 2iP, KIN e BAP, por 40 dias. Sendo que apenas a cultivar 'Kudaravally' respondeu com crescimento em altura e somente com a citocinina BAP.

Na segunda fase as duas cultivares foram submetidas à 12 doses da citocinina BAP, quando foram avaliados: crescimento em altura, aos 53 e 75 dias, o número de brotos axilares aos 75 dias, o número de brotos adventícios, aos 75 dias e o número de brotos totais, aos 90 dias.

A cultivar 'Kudaravally' mostrou melhor crescimento em altura, aos 75 dias com 10 μ M de BAP. Já a cultivar 'Kuthiravally' cresceu melhor com 4 μ M de BAP aos 75 dias.

Na multiplicação por brotos axilares, aos 75 dias, a cultivar 'Kudaravally' produz maior número de brotos à 16 μ M de BAP. A cultivar 'Kuthiravally' em nenhuma dose produz significativamente mais brotos axilares do que a testemunha. Já na multiplicação por brotos adventícios as duas cultivares produzem maior número de brotos à 16 μ M aos 75 dias.

Para a multiplicação através da variável número de brotos totais as duas cultivares respondem bem, sendo que ambas multiplicam melhor à 16 μ M de BAP.

No experimento de enraizamento as duas cultivares foram submetidas à 6 doses (0, 2, 4, 6, 8 e 10 μ M) das auxinas IAA, IBA e NAA. Foram avaliados o comprimento médio, número e a massa da matéria seca de raízes por planta aos 66 dias.

A auxina NAA é a que produz os melhores respostas para as duas cultivares, sendo a dose de 10 μ M a que dá os resultados mais significativos. No tratamento com a

auxina NAA a cultivar 'Kuthiravally' responde significativamente para as três variáveis: comprimento, número e massa de matéria seca de raízes por planta. Já a cultivar 'Kudaravally' no tratamento com a auxina NAA respondeu significativamente para as variáveis número e massa da matéria seca das raízes e não para comprimento médio de raízes.

Na aclimação das plantas "in vivo" foram avaliados: porcentagem de sobreviventes e as massas da matéria fresca da parte aérea e das raízes, com e sem fungos MVA.

Na porcentagem de sobreviventes a cultivar 'Kuthiravally' mostrou tendência à superioridade sobre a cultivar 'Kudaravally', com e sem fungos MVA. Nas duas cultivares também houve tendência à superioridade do tipo "grossa" de raiz sobre o tipo "fina".

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho levam as seguintes conclusões:

- Para as cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) é vantajosa a utilização das quatro fases da micropropagação: multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimação.
- As duas cultivares multiplicam melhor "in vitro" na presença de 16 μ M de BAP, no período de 90 dias.
- A cultivar 'Kudaravally' alonga melhor quando o BAP está presente na concentração de 10 μ M até 75 dias. Já com a cultivar 'Kuthiravally' é vantajoso o alongamento à 6 μ M de BAP até os 75 dias.
- A auxina NAA na concentração de 10 μ M produz o melhor enraizamento para as cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', aos 66 dias.
- A aclimação de plântulas das cultivares 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' com o enraizamento induzido pela auxina NAA (5,0 μ M) produz melhores resultados do que as enraizadas sem auxinas.
- O fungo endomicorrízico *Glomus macrocarpum* mostrou ser vantajoso para a aclimação das plantas "in vivo" de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) cultivar 'Kudaravally' do tipo raiz "grossa" (induzida com a auxina NAA), em termos de porcentagem de sobrevivência mais elevada e maior massa de matéria fresca da raiz e da parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL - 1993, Rio de Janeiro, **53**: 3-26, 1993.

ALBUQUERQUE, F. C., & CONDURU, J. M. P. Cultura da pimenteira-do-reino.
Série Fitotécnica IPEAN, Belém, **2**(3): 9-149, 1971.

BABU, K.N.; REMA, J.; PILLAI, G.S.; MINOO, D.; RAVINDRAN, P.; PETER, K.
V. Micropropagation of betel vine (*Piper betle* L.). **Journal of Spices and Aromatic Crops, Trichur**, **1** (2): 160-2, 1992. Apud **Plant Breeding Abstrats, Cambridge**, **64** (7): 1027, 1994 (Resumo).

BHAT, S. R.; KACKAR, A.; CHANDEL, K. P. S. Plant regeneration from callus cultures of (*Piper longum* L.) through shoot tip culture. **Plant Cell Reports, Berlim**, **12**: 41-4, 1992.

BHOJWANI, S. S. & RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture**. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1986. 502p.

BOAVENTURA, M. A. M. Pimenteira-do-reino pode expandir. **Casa da Agricultura, Campinas**, **5** (6): 24-6, nov./dez. 1983.

- CANER, J. Doença de vírus em pimenteira-do-reino. **O Biológico**, São Paulo, **35** (7): 185, jul. 1969.
- CANER, J. & IKEDA, H. Doença de vírus em culturas de pimenteira-do-reino no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, **38** (3): 93-4, mar. 1972.
- CHANG, D. C. N. Responses of micropropagated (cultivar) 'Hanuroka' strawberry (*Fragaria x ananassa*) to *Glomus* endomicorrhizal fungi. **HortScience**, Alexandria, **21**(3): 885, 1986.
- CHUA, B. K. Studies on in vitro propagation of black pepper (*Piper nigrum* L.). **MARDI Research Bulletin**, Selangor, **8**: 155-62, 1981.
- CHUA, B. K. & SITI, S. T. Effects of naphthelene acetic acid and two phenolic substances on rooting of pepper (*Piper nigrum* L.). **MARDI Research Bulletin**, Selangor, **13** (1): 108-10, 1985.
- CORSATO, C. E. Comportamento fisiológico do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) micropropagado e aclimatado na presença de fungos endomicorrízicos. Piracicaba, 1993. 55p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP).
- COSTA, A. S.; ALBUQUERQUE, F. C.; IKEDA, H.; CARDOSO, M. Moléstia da pimenteira-do-reino causada pelo vírus do mosaico do pepino. **Série Fitotécnica IPEAN**, Belém, **1**(1): 1-18, 1970.

- DEBERGH, P. C. & READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C. & ZIMMERMANN, R. H. ed. **Micropropagation**, technology and application. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. p.1-13.
- DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of "ex vitro" strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, 112(5): 846-51, 1987.
- DONNELLY, D. J. VIDAVERWER, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue culture red raspberry prior to after transfer to soil. **Plant Cell, Tissue & Organ Culture**, Oxford, 4: 43-50, 1985.
- DUARTE, M. L. R. & ALBUQUERQUE, F. C. de. Atividade sistêmica do Benomil em diferentes níveis de pH em pimenteira-do-reino. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, 23(1): 27-32, jan., 1988.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Plano Nacional de Pesquisa 1988-1992**. Brasília, DF. p. 280-2, 1988.
- FERRÃO, J. E. M. **Especiarias - cultura, tecnologia e comércio**. Lisboa, Portugal, Instituto de Investigação Científica Tropical. 1993, 413 p.
- FITCHET, M. Establishment of black pepper in tissue culture. **Information Bulletin, citrus and Subtropical Fruit Journal**, Nelspruit, **189**: 4, 1988. Apud **Plant Breeding Abstracts**, Cambridge, 59(11): 1069, 1989 (Resumo).

FITCHET, M. Establishment of *Piper nigrum* L. in vitro. **Acta Horticulturae**, The Hague, **275**: 285-91, 1990.

FITCHET, M. Succesfull establishment of *Piper nigrum* in vitro. Information Bulletin, Citrus and Subtropical Fruit Research Institute. Nelspruit, 212: 4-5, 1990. Apud **Horticultural Abstrats**, East Malling, **62(3)**: 289, mar., 1992 (Resumo).

GALLO, L. A.; ROMANI, V. L. M.; CARVALHO, R. N.; CHADDAD, JR., J.; KUERCH, R. C. Aclimação de plântulas de Abacaxi (*Ananas comosus* L., 'Perolera') inoculadas com fungos micorrízicos. IN: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BROMELIACEAE , 3. , Rio de Janeiro, 1992.

GAVASSONI, W. L. Interação entre *Glomus etunicatum* (Becker & Gardmann), *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Clitwood 1949 e níveis de fósforo em pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) Viçosa, 1990. 90p. (M. S. - Universidade Federal de Viçosa).

GEETHA, C. K.; GEORGE, J. K.; RAVINDRAN, P. N. Breeding behaviour of black pepper. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, Calicut, 52(1): 17-21, 1992. Apud **Plant Breeding Abstracts**, Cambridge, **63(8)**: 1173, 1993 (Resumo).

GEORGE, E. F. & SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley, Exegenetics Ltd., 1984. 709p.

- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring V. A. micorrizal infection in roots, **New Phytologist**, Cambridge, **84**: 489-500, 1980.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. & CALDAS, L. S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-169.
- HAMMERSCHAG, F. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of plum rootstock 'Myrobalan' (*Prunus cerasifera* Ehrh.), **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, **107**(1): 44-7, 1982.
- HANNINGS, D. W. & LANGHANS, R. W. In vitro propagation of the 'Rieger Elatior' begonia. **HortScience**, Saint Joseph, **9**: 271, 1974.
- HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from culture rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, **105**: 216-20, 1980.
- HOAGLAND, D. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil, Berkeley, California Agriculture Experimental Station, 1950. Circular, 347.

HU, C. Y. & WANG, P. G. J. Meristem, shoot tips and bud cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO P. V.; YAMADA, J. **Handbook of plant cell culture**. New York, Macmillan Publ., 1983. v. 1, p. 177-227.

KATO, O. R.; KATO, M. S. A.; KATO, A. K.; ALBUQUERQUE, F. C. Interação espaçamento x tamanho do tutor em pimenta-do-reino em terra roxa estruturada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, **22**(6): 607-12, jun. 1987.

KITO, S. L. & YOUNG, M. J. In vitro propagation of carozo citrange. **HortScience**, Saint Joseph, **16**: 305-6, 1981.

KUO, C. G. & TSAY, J. S. Propagation of chinese cabbage by axillary bud culture. **HortScience**, Saint Joseph, **12**: 459-60, 1977.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MOTA, M. G. C.; MENEZES, I. C. Propagação da pimenta-do-reino através de ápice caulinar. **ABCTP- NOTÍCIAS**, Brasília, **18**: 11, ago., 1992.

LITZ, R. E. Papaya. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. ed. **Handbook of plant cell culture**. New York, Macmillan Publ., 1984. v. 2, p. 349-68.

LITZ, R. E. & CANOVER, R. A. In vitro propagação of papaya. **HortScience**, Saint Joseph, **13**: 241-2, 1978.

- LITZ, R. E. & JAISWAL, V. S. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. In: DEBERGH, P. C. & ZIMMERMAN, R. H. (ed.). **Micropropagation, technology and application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. p. 247.
- MAENE, L. J. & DEBERGH, P. C. Rooting of tissue culture plants under in vitro conditions. **Acta Horticulturae**, The Hague, **131**: 201-8, 1983.
- MATHEWS, V. H. & RAO, P. S. In vitro responses of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Current Science**, Bombay, **53**(4): 183-6, feb., 1985.
- METSENAERE, R. E. A. S. de. Economic considerations. In: DEBERGH, P. C. & ZIMMERMANN, R. H. ed.. **Micropropagation; tecnologia and application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. p. 123-40.
- MILANEZ, D. & VENTURA, J. A. Produção de mudas de pimenta-do-reino. **Circular Técnica ENCAPA**, Cariacica, **1** : 5-14, ago. 1982.
- MOREL, G. M. Producing virus-free *Cymbidiums*. **American Orchid Society Bulletin**, Washington, **29** : 495-7, 1960.
- MORRIS, R. O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, **37**: 539-77, 1986.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, **25**: 135-66, 1974.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, **15**: 473-97, 1962.

PHILIPS, J. & HAYMA, M. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, **55**(1): 158-61, 1970.

PHILIP, V. J.; JOSEPH, D.; TRIGS, G. S.; DICKINSON, N. M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* L.) through shoot tip cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, **12**: 41-4, 1992.

PREECE, J. E. & SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. IN: DEBERG, P. C. & ZIMMERMANN, R. H. ed.. **Micropropagation; technology and application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991, p. 71-93.

RAHMAN, M. A. & BLAKE, J. Factors affecting in vitro proliferation and rooting of shoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). **Plant Cell, Tissue & Organ Culture**, Dordrecht, **13**(3): 179-200, 1988.

RAVOLANIRINA, B. B.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PERSON, V. Mise au point d'une méthode rapide d'endomycorhization de vitroplants. **Fruits**, Paris, **44**(3): 165-70, 1989.

ROBBS, C. F. Uma doença bacteriana da pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) nova para o Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, **34**(4): 263-6, dez., 1959.

RUGINI, E. & FONTANAZZA, G. In propagation of 'Dulce Agogia' olive. **HortScience**, Saint Joseph, **16**(4): 492-3, 1981.

SCHNABDRAUCH, L. S. & SINK, K. C. In vitro propagation of *Phlox subulata* and *Phlox paniculata*. **HortScience**, Saint Joseph, **14**: 607-8, 1979.

SASIKUMAR, B.; GEORGE, J. K.; RAVINDRAN, P. N. Breeding behaviour of black peper. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**. Calicut, **52**(1): 17-21, 1992. Apud **Plant Breeding Abstracts**, Cambridge, **63**(8): 1173, 1993. (Resumo).

SIVAPRASAD, R.; JACOB, A.; SULOCHANA, K. K.; VISALAKSHI, A.; GEORGE, B. Growth root-knot nematode infestation and phosphorus nutrition in *Piper nigrum* L. as influence vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PROTECTION IN TROPICS**, Genting Highlands, 1990. p. 20-3. Apud **Horticultural Abstracts**, East Mallng, **63**(6): 555, jun. 1993. (Resumo).

SWARTZ, H. S. Post culture behaviour: genetic and epigentic effects and related problems. In: DEBERGH, P. C. & ZIMMERMANN, R. H. ed. **Micropropagation; technology and application**. Dordrecht, Kluwer Academic Publ., 1991. p. 95-121.

TISSERAT, B. Embriogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: DIXON, R. A., ed. **Plant cell culture; a practical approach**. 2. ed. Oxford, IRL Press, 1987. p.79-105.

VENTURA, J. A. & MILANEZ, D. Fusariose da pimenteira-do-reino e seu controle. **Circular Técnica. EMBRAPA**. Vitória, 2: 5-23, ago., 1983.

APÊNDICE

Quadro 1: Quadrados médios da análise de variância (ANAVA) da altura no experimento 1, no qual as plantas foram submetidas à 6 doses de 2iP, BAP e KIN, aos 40 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q.M.
Cultivar	1	0,2333 ns
Citocinina	2	3,8347 **
Cultivar x Citocinina	2	28,4423 **
Dosagem	5	2,3720 **
Cultivar x Dosagem	5	2,9651 **
Citocinina x Dosagem	10	0,6990 ns
Resíduo	154	0,3757
TOTAL	179	

C.V. 29,57%

** Significativo ao nível de 1% de PE.

ns Não significativo.

Quadro 2: Quadrados Médios da Análise de Variância (ANAVA) da altura no experimento 1, no qual as plantas foram submetidas à 6 doses de 2iP, aos 40 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.
Cultivar	1	8,4075**
2iP	5	0,4717ns
Cultivar x 2iP	5	0,4959ns
Residuo	48	0,2901
TOTAL	59	

CV 28,846%

** Significativo ao nível de 1% de PE

ns Não significativo

Quadro 3: Quadrados médios da ANAVA da altura do experimento 1, no qual as plantas foram submetidas à 6 doses de BAP, aos 40 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.
Cultivar	1	35,0676**
BAP	5	2,7885**
Cultivar x BAP	5	5,4030**
Resíduo	48	0,3237
TOTAL	59	

CV 24,38%

** Significativo ao nível de 1% de PE

ns Não significativo

Quadro 4: Quadrados médios da ANAVA da altura no experimento 1, no qual as plantas, as quais foram submetidas à 6 doses de KIN, aos 40 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.
Cultivar	1	23,4013**
KIN	5	0,7583**
Cultivar x KIN	5	0,4011 ns
Resíduo	48	0,1779
TOTAL	59	

CV 22,269 %

** Significativo ao nível de 1% de PE

ns Não significativo

Quadro 5: Quadrados médios da ANAVA da altura (cm) no experimento 2, no qual as plantas foram submetidas à 12 doses de BAP, nas idades de 53 e 75 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.
Cultivar	1	78,6049**
BAP	11	13,2265**
Cultivar x BAP	11	8,2328**
Idade	1	92,5254**
Cultivar x Idade	1	3,0793 ns
BAP x Idade	11	0,7168 ns
Resíduo	251	1,0386
TOTAL	287	

C.V. 33,833%

** Significativo ao nível de 1% de PE

ns Não significativo

Quadro 6: Quadrados médios da ANAVA da variância brotos axilares no experimento 2, no qual as plantas foram submetidas à doze doses de BAP, aos 75 dias.

Causas da Variação	G.L.	Q.M.
BAP	11	5,1282**
Resíduo	132	1,5941
TOTAL	143	

C. V. 23,339%

** Significativo ao nível de 1% de PE

ns Não significativo

Quadro 7: Quadrados médios da ANAVA da variável número de brotos adventícios do experimento 2, no qual as plantas foram submetidas à doze doses de BAP, aos 90 dias.

Causas da Variação	G.L.	Q.M.
Cultivar	1	3258,5069**
BAP	11	590,7494**
Cultivar x BAP	11	148,6585**
Resíduo	120	46,6708
TOTAL	143	

C.V. 42,348%

** Significativo à 1% de PE

Quadro 8: Quadrados médios da ANAVA do número de brotos totais de plantas de pimenteira-do-reino das cvs. 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à doze doses de BAP, aos 90 dias.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.
BAP	11	657,8460**
Resíduo	132	72,2803
TOTAL	143	

C.V. 39,416%

* * Significativo à 1% de PE.

Quadro 9: Quadrados médios da ANOVA do comprimento médio (cm), do número e da massa da matéria seca de raízes (g) por planta de pimenteira-do-reino das cv. 'Kudaravally' e 'Kuthiravally', submetidas à 6 doses das auxinas NAA, IAA e IBA, aos 66 dias.

Causas da Variação	G.L.	Q. M.		
		Comprimento	Número	Matéria Seca
Cultivar	1	83,3968**	1166,4000**	0,0111**
Auxina	2	12,3476**	112251,8722**	0,0860**
Cult x Aux	2	22,0630**	1684,8250**	0,0085**
Dosagem	5	2,0306**	1260,1244**	0,0098**
Cult x Dos	5	5,1315**	227,5733**	0,0005 ns
Resíduo	344	0,3747	50,5646	0,0004
TOTAL	359			

C. V. para Comprimento de Raízes 29,472%

C. V. para Número de Raízes 56,089%

C. V. para Matéria Seca de Raízes 69,838%

** Significativo à 1% de PE

ns Não Significativo

Quadro10: Quadrados médios da ANAVA da massa da matéria fresca da parte aérea (g), da massa da matéria fresca da raiz (g) e da % de colonização de plantas de pimenteira-do-reino das cvs. 'Kudaravally' e 'Kuthiravally' em dois tipos de raiz ("fina" e "grossa"), submetidos a dez tipos de fungos endomicorrízicos acrescidos de uma testemunha, aos 50 dias.

C. V.	G. L.	Q. M.		
		MFPA	PFR	%COL
Cultivar	1	0,9312 ns	28,2155**	292,3090 ns
Fungos	10	0,6167 *	0,9166**	2063,8856**
Cult x Fun	10	0,7360 **	0,5211 ns	335,4461 ns
Tamanho	1	20,7755 **	52,7147**	1,6131 ns
Cult x Tam	1	0,2225 ns	0,8878 ns	46,4101 ns
Fun x Tam	10	0,9498 **	1,3212**	187,0278 ns
Resíduo	98	0,22993	0,3479	296,7814
TOTAL	131			

C.V. para PFPA 41,942%

C.V. para PFR 59,661%

C.V. para %COL 59,645%

* Significativo à 5%

** Significativo à 1%

ns Não Significativo