

RESGATE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum VISANDO À SUA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE
MELHORAMENTO GENÉTICO

RAFAEL WALTER

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO DE 2015

RESGATE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum VISANDO À SUA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE
MELHORAMENTO GENÉTICO

RAFAEL WALTER

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO DE 2015

RESGATE DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Capsicum VISANDO À SUA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE
MELHORAMENTO GENÉTICO

RAFAEL WALTER

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 17 de março de 2015

Comissão Examinadora:

Prof^a. Elizanilda Ramalho do Rêgo (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UFPB

Prof. Mailson Monteiro do Rêgo (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UFPB

Prof^a. Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

A todos os pesquisadores que doam parte de suas vidas à realização de seus trabalhos, contribuindo para o mundo científico,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me fizeram chegar até aqui.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar a formação acadêmica que me fez crescer no campo profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida.

À minha orientadora, professora Virginia Silva Carvalho, que contribuiu significativamente para a minha formação profissional e pessoal, pois acreditou em mim e, por estar sempre disponível, pela troca de experiência e aprendizado, pelo seu bom humor e alegria, contagia nosso ambiente de trabalho e o torna mais leve e agradável.

À professora Rosana Rodrigues, pelo grande incentivo e apoio neste estudo.

À professora Telma Nair Santana Pereira, por contribuir para enriquecer este trabalho.

Ao professor Eliemar e aos doutorandos Luciene e Jefferson, pela ajuda nas análises fisiológicas.

Aos professores Mailson Monteiro do Rêgo e Elizanilda Ramalho do Rêgo, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões dadas.

Aos meus pais Moacir e Neusa e a meus irmãos Carlos, Lucas e Maria Vitória que, mesmo longe, sempre torceram pelo meu sucesso e possibilitaram que eu realizasse meus estudos, de que tanto gosto, sempre me incentivado e acreditando no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos Rafael Rhuan, Andressa e Francielle, que participaram e disponibilizaram muitos momentos de diversão e aprendizado, favorecendo o meu amadurecimento e também pelo apoio e por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, tornando meus dias mais felizes.

Em especial à minha grande amiga Andressa, que me acompanhou ao longo desta caminhada, pelos momentos de descontração e de trabalho, com os quais pude contar sempre em todos os momentos, tornando a saudade mais suportável.

Às amigas que conquistei na UENF, Geovana, Rodrigo e Fernanda, pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, por toda a ajuda, convivência e amizade.

A todos os colegas do laboratório de melhoramento genético vegetal/laboratório 111, por estarem sempre à disposição quando precisei e por toda a ajuda, em especial à Cláudia Pombo e Cíntia, que não mediram esforços para me auxiliar.

A todos os docentes da pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos.

À minha orientadora da graduação, Maurecilne Lemes da Silva Carvalho, por ser a pessoa que mais me incentivou a fazer o mestrado e me indicou a UENF.

A José Daniel Valle de Almeida, funcionário da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plantas de *Capsicum annuum* sob diferentes concentrações de sacarose ao final do período de 45 dias. Concentrações de sacarose A) 0; B) 20 g L⁻¹; C) 30 g L⁻¹; D) 40 g L⁻¹.24
- Figura 2.** Porcentagem da germinação *in vitro* de. (A) e (B) Embrião globular e cordiforme de *Capsicum baccatum* e *C. frutescens*. (C) e (D) Embrião torpedo e cotiledonar. Meios para globular e cordiforme: M1-½ MS + 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M2-½ MS + 0,05 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M3-½ MS + 0,1 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M4-MS + 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M5-meio MS com 0,05 mg L⁻¹ de AIA e 0,05 mg L⁻¹ de GA₃; M6-MS + 0,1 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; meios para torpedo e cotiledonar: M1-sem sacarose e sem reguladores; M2- 20 g L⁻¹ de sacarose; M3- 40 g L⁻¹ de sacarose; M4-20 g L⁻¹ de sacarose com 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M5-40 g L⁻¹ de sacarose com 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃. Linhas sobre as barras indicam erro padrão da média. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, (p<0,01)29
- Figura 3.** Parte aérea e raízes após 45 dias de cultivo *in vitro* de plantas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, em diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹).32

- Figura 4.** Massa da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), da Raiz (MSR) e Total (MST) de quatro espécies de *Capsicum*: (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens* após 45 dias de cultivo *in vitro* em função da concentração de sacarose no meio de cultura. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$)33
- Figura 5.** Massa da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), da Raiz (MSR) e Total (MST) de plantas de quatro espécies de *Capsicum*: (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens* após 45 dias de aclimatização em função da concentração de sacarose no meio de cultura durante a etapa *in vitro*. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).34
- Figura 6.** Área foliar e Número de folhas de *Capsicum* ao final do cultivo *in vitro* de: (A-B) *C. annuum*, (C-D) *C. baccatum*, (E-F) *C. chinense* e (G-H) *C. frutescens*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$)37
- Figura 7.** Área foliar e Número de folhas de *Capsicum* ao final da aclimatização de: (A-B) *C. annuum*, (C-D) *C. baccatum*, (E-F) *C. chinense* e (G-H) *C. frutescens*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$)38
- Figura 8.** Índice SPAD (A) *Capsicum baccatum* e (B) *C. frutescens*. Relação Fv/Fm (C) *C. baccatum* e (D) *C. frutescens*. Índice fotossintético (PI) (E) *C. baccatum* e (F) *C. frutescens* ao final do cultivo *in vitro*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$)40
- Figura 9.** Volume radicular de plantas de (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens* ao final da aclimatização. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Origem e características dos acessos utilizados na presente pesquisa.....14
- Tabela 2.** Tratamentos com diferentes concentrações dos sais minerais de MS, AIA e GA₃ no resgate de embriões globulares e cordiformes de *C. baccatum* e *C. frutescens*16
- Tabela 3.** Tratamentos com diferentes concentrações de sacarose, AIA e GA₃ no resgate de embriões torpedos e cotiledonares de *C. baccatum* e *C. frutescens* ..17
- Tabela 4.** Germinação de embriões maduros de *Capsicum annum* var. *annuum* em diferentes concentrações de sacarose. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.....23
- Tabela 5.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), estágio de desenvolvimento (E), meio de cultura (M) e suas interações na eficiência da germinação *in vitro* de embriões globulares e cordiformes de duas espécies de *Capsicum*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.....25
- Tabela 6.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), estágio de desenvolvimento (E), meio de cultura (M) e suas interações na eficiência da germinação *in vitro* de embriões torpedos e

cotiledonares de duas espécies de *Capsicum*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.....25

Tabela 7. Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a germinação *in vitro* de embriões maduros de quatro espécies de *Capsicum*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.....30

Tabela 8. Comparação da eficiência na germinação de embriões isolados e sementes intactas de quatro espécies de *Capsicum* cultivadas em meio de cultura com ausência de sacarose. Campos dos Goytacazes, RJ, 201442

.
.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral.....	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. Aspectos Botânicos	5
3.2. Aspectos Econômicos.....	8
3.3. Hibridação em <i>Capsicum</i>	9
3.4. Cultura de Tecidos Vegetais.....	10
3.5. Sacarose.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Material Vegetal	14
4.2. Ensaio preliminar	15
4.3. Experimentos	15
4.3.1. Experimento 1 – Resgate de embriões imaturos.....	15
4.3.2. Experimento 2 – Cultivo de embriões maduros	18
4.3.3. Experimento 3 – Crescimento <i>in vitro</i>	18

4.3.3.1. Determinação da área foliar	19
4.3.3.2. Determinação da massa da matéria seca	19
4.3.3.3. Determinação da fluorescência da clorofila a, eficiência fotoquímica e índice fotossintético	20
4.3.3.4. Intensidade de Verde	20
4.3.4. Experimento 4 – Aclimatização	20
4.3.5. Experimento 5 – Eficiência do cultivo de embriões maduros...	21
4.4. Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1. Ensaio Preliminar.....	23
5.2. Germinação de embriões imaturos.....	24
5.3. Cultura de embriões maduros.....	29
5.4. Crescimento <i>in vitro</i> e aclimatização.....	31
5.5. Eficiência do cultivo de embriões maduros.....	42
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

WALTER, Rafael; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março de 2015; Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero *Capsicum* visando à sua utilização em programas de melhoramento genético; Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: Prof^a. Rosana Rodrigues e Prof. Telma Nair Santana Pereira.

Nos programas de melhoramento genético de *Capsicum* existem problemas como a incompatibilidade dos cruzamentos intra e interespecíficos, que podem causar o aborto de embriões. Uma técnica que pode ser empregada com a finalidade de recuperar estes materiais vegetais é o resgate de embriões. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer protocolos responsivos para o resgate de embriões maduros e imaturos nos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar das principais espécies do gênero *Capsicum*. Sementes maduras de acessos da coleção de germoplasma de *Capsicum* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (*C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) e de uma cultivar comercial (*C. annuum*) foram desinfestadas em laboratório. No primeiro experimento, foi verificado o resgate de embriões imaturos, que foram divididos em dois grupos - embriões globulares e cordiformes - nos quais foram testadas diferentes concentrações de ácido 3-indolacético (AIA) e ácido giberélico (GA₃) e de sais do meio MS; e embriões torpedos e cotiledonares, nos quais foram testados os fitorreguladores AIA e GA₃ e diferentes concentrações de sacarose (20 e 40 g L⁻¹). O segundo experimento avaliou o efeito da sacarose (0,

10, 20, 30 e 40 g L⁻¹) sobre a germinação de embriões maduros. No terceiro experimento, foi verificado o crescimento de plântulas, analisando o efeito da sacarose. Ao final de 45 dias de cultivo *in vitro*, foram feitas avaliações biométricas para as quatro espécies e apenas para *C. frutescens* e *C. baccatum* foram feitas avaliações fisiológicas. As plantas foram levadas para aclimatização na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF por um período de 45 dias quando foram avaliados a taxa de sobrevivência, a área foliar, a massa da matéria seca e o volume radicular, constituindo o quarto experimento. No quinto experimento, sementes intactas e embriões maduros isolados foram colocados em meio MS sem sacarose para verificar a eficiência da técnica. Para a germinação de embriões globulares e cordiformes, o meio mais indicado foi o suplementado com ½ MS, 0,05 mg L⁻¹ de GA₃ e 0,05 mg L⁻¹ de AIA e 40 g L⁻¹ de sacarose. O meio com ½MS e 0,01 mg L⁻¹ de GA₃ e 0,01 mg L⁻¹ de AIA ou sem fitorreguladores e 20 ou 40 g L⁻¹ de sacarose proporcionou as maiores taxas de germinação dos embriões torpedos e cotiledonares. A maior taxa de germinação de embriões maduros foi obtida em meio de cultura sem sacarose para todas as espécies trabalhadas, para *C. baccatum*, não houve diferença entre os tratamentos. As plântulas das quatro espécies cresceram *in vitro* na ausência de sacarose, porém, não sobreviveram durante a aclimatização, exceto *C. frutescens*, com uma taxa de sobrevivência de apenas 16,67%. Neste experimento, comparando a germinação de sementes intactas e embriões isolados, verifica-se que a germinação de embriões isolados foi significativamente maior que a germinação das sementes intactas para as quatro espécies. Os resultados deste trabalho são úteis para os geneticistas e melhoristas interessados na aplicação em *Capsicum* da técnica de germinação de embriões isolados.

ABSTRACT

WALTER, Rafael; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2015; Zygotic embryo rescue of species from genus *Capsicum* aiming their use in breeding programs; Adviser: Virginia Silva Carvalho; Committee members: Rosana Rodrigues and Telma Nair Santana Pereira.

In *Capsicum* breeding programs exist problems such as incompatibility of intra and interspecific crossing, which can cause abortion of embryos. A technique that can be used for recovering these plant materials is embryo rescue. The objective of this study was to establish protocols responsive to the rescue of mature and immature embryos in the globular, heart, torpedo and cotyledonary stage of the main species of the genus *Capsicum*. Mature seeds of accession from the *Capsicum* germplasm collection of Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (*C. baccatum*, *C. chinense* and *C. frutescens*) and a commercial cultivar (*C. annuum*) were disinfected at the laboratory. In the first experiment, it was checked the rescue of immature embryos that were divided into two groups - the globular and heart embryo - which was test in different concentrations of indole-3-acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA₃) and MS medium salts; torpedo and cotyledonary embryos in which were test the plants growth regulators IAA and GA₃ in different concentrations of sucrose (20 and 40 g L⁻¹). The second experiment evaluated the effect of sucrose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹) on the germination of mature embryos. In the third experiment, the growth of seedlings was verified by analyzing the effect of sucrose. At the end of 45 days of *in vitro*

culture, it was made biometric evaluations for the four species and only for *C. frutescens* and *C. baccatum* physiological assessments were made. The plants were taken to acclimatization at Unidade de Apoio a Pesquisa from UENF for a period of 45 days when were evaluated the survival rate, leaf area, dry matter and root volume, constituting the fourth experimente. In the fifth experiment, intact seeds and isolated mature embryos were placed on MS medium without sucrose to verify the efficiency of the technique. For germination of globular and heart embryos, the most appropriate medium was supplemented with $\frac{1}{2}$ MS, 0.05 mg L^{-1} GA₃ and 0.05 mg L^{-1} of IAA and 40 g L^{-1} sucrose. The medium with $\frac{1}{2}$ MS, 0.01 mg L^{-1} of GA₃ and 0.01 mg L^{-1} of IAA or without growth regulators and 20 or 40 g L^{-1} sucrose provided the highest germination rates to torpedo and cotyledonary embryos. The highest germination rate of mature embryos was obtained in culture medium without sucrose for all species, for *C. baccatum* there was no difference among treatments. Seedlings of the four species grown *in vitro* in the absence of sucrose, however, it did not survive during acclimatization, except *C. frutescens*, with a survival rate of only 16.67%. In this experiment, comparing the germination of intact seeds and isolated embryos, it is verify that the germination of isolated embryos was significantly higher than the intact seed germination for the four species. These results are useful for geneticists and breeders interested in applying for *Capsicum* technical germination of isolated embryos.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas e pimentões pertencem ao gênero *Capsicum*, família Solanaceae, com 35 espécies identificadas e apenas cinco domesticadas: *C. annuum* e suas formas botânicas, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e suas formas botânicas e *C. pubescens*. (Carrizo et al., 2013). Estas espécies têm grande importância econômica nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética e no mercado de plantas ornamentais, sendo amplamente cultivadas no mundo (Yamamoto e Nawata, 2005; Pozzobon et al., 2006; Moreira et al., 2006; Moscone et al., 2007).

Páprica e pimentas (*Capsicum* spp.) são hortaliças de grande importância mundial, sendo consumidas frescas ou como especiarias, abrangendo uma produção mundial de 30 milhões de toneladas e uma área plantada de 4.000.000 ha (FAOSTAT, 2011). No Brasil, a produção de pimentas é considerada de grande importância econômica, sendo um componente do mercado de hortaliças frescas e base para o desenvolvimento de condimentos, temperos e conservas em nível caseiro e industrial. Além disso, há a importância social por empregar muita mão de obra. Os principais Estados produtores do Brasil são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino e Penteado, 2006). O cultivo de hortaliças, no Brasil, ocupou, em 2011, uma área de, aproximadamente, 809 mil hectares, que produziram cerca de 19 milhões de toneladas (Embrapa, 2012).

O Brasil é considerado um dos mais importantes centros de diversidade do gênero *Capsicum*, abrigando espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres (Carvalho et al., 2003; Moscone et al., 2007). Essa grande diversidade pode ser muito útil aos programas de melhoramento genético de *Capsicum* (Rêgo et al., 2003; Blat et al., 2007).

Existe uma demanda por novas cultivares que associem resistência a pragas e doenças, melhor qualidade dos frutos, maior produtividade e boa capacidade de processamento industrial vem aumentando. O melhoramento genético tem por objetivo solucionar problemas referentes à cultura, destacando-se o uso de hibridações intra e interespecíficas (Hajjar e Hodgkin, 2007).

Porém, a hibridação normalmente é prejudicada por problemas de incompatibilidade entre as espécies e mesmo entre diferentes genótipos da mesma espécie, podendo ser pré-zigótica e pós-zigótica. Um dos problemas frequentes de incompatibilidade pós-zigótica é o aborto do embrião. Para evitar esse aborto, têm sido empregadas técnicas de cultura de tecidos, sendo uma delas o isolamento e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos, conhecida como resgate de embriões (Rappaport, 1954). Esta técnica é útil não só para obtenção de híbridos intra e interespecíficos, mas também para a superação de dormência ou esterilidade de sementes (Kott e Kasha, 1985; Chen e Adachi, 1996; Acebedo et al., 1997; Lotfi et al., 2003; Leng e Yamamura, 2006; Tamaki et al., 2011; Tang et al., 2011).

O estágio de desenvolvimento do embrião e a composição do meio de cultura são fatores de grande importância na germinação e crescimento das plântulas *in vitro* (Kapila e Sethi, 1993; Monnier, 1995; Bhojwani e Razdan, 1996; Haslam e Yeung, 2011).

O conhecimento da resposta *in vitro* de embriões zigóticos de *Capsicum* é ainda escasso. Além disso, as pimentas do gênero *Capsicum* são consideradas recalcitrantes para o cultivo *in vitro*, isto é, os explantes podem não apresentar resposta morfogênica quando cultivados *in vitro* (Benson, 2000; Kothari et al., 2010). Poucos trabalhos como os de Hossain et al. (2003), Yoon et al. (2006) e Manzur et al. (2013) relataram o estabelecimento de protocolos para o resgate de embriões de *Capsicum*. Assim, há uma grande carência de estudos detalhados sobre a resposta de embriões desse gênero *in vitro* (Manzur et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estabelecer protocolos responsivos para o resgate de embriões maduros e imaturos nos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar, visando à obtenção de mudas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*.

2.2. Específicos

- Avaliar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos excisados de sementes em diferentes estádios de desenvolvimento fisiológico (globular, cordiforme, torpedo, cotiledonar e maduro) das principais espécies do gênero *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose, sais minerais e fitorreguladores.

- Avaliar o crescimento *in vitro* de plântulas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose.

- Avaliar o crescimento na aclimatização de plantas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de sacarose.

- Analisar a eficiência dos protocolos desenvolvidos para a germinação de embriões maduros isolados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos Botânicos

O pimentão e as pimentas são angiospermas, divisão Spermatophyta, classe Magnoliopsida, ordem Solanales, família Solanaceae, gênero *Capsicum*, com 35 espécies identificadas, sendo cinco domesticadas: *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L., e *C. pubescens* Ruiz & Pav. (Carrizo, et al., 2013; Moscone, et al., 2007). Entre as espécies domesticadas, *C. pubescens* é a única que não tem registro de cultivo no Brasil (Barbieri e Neitzke, 2008).

As plantas de *Capsicum* são diploides, apresentando dois grupos de acordo com o número básico de cromossomos: um com $n=x=12$ e outro com $n=x=13$ cromossomos (Moscone et al., 2007).

No gênero *Capsicum*, são encontrados três complexos gênicos: o complexo *C. annuum*, o complexo *C. baccatum* e o complexo *C. pubescens*. Por definição, um complexo reúne espécies que apresentam cruzamentos compatíveis, embora existam dificuldades em obter alguns híbridos dentro destes complexos. O complexo *C. annuum* é formado pelas espécies *C. annuum* (variedades *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense* e *C. galapagoense*. O complexo *C. baccatum* reúne as espécies *C. baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. tovarii*. O complexo *C. pubescens* reúne as

espécies *C. pubescens*, *C. cardenasii* e *C. eximium* (Pickersgill, 1997; Tong e Bosland, 1999).

A espécie *C. annuum* foi domesticada nas terras altas do México, é a espécie mais cultivada e, possivelmente, a que representa a maior variabilidade do gênero, incluindo as variedades botânicas mais comuns *C. annuum* L. var. *annuum* (pimentão e pimentas) e *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (pimenta ornamental). Esta espécie abrange a maioria das pimentas mexicanas, pimentas da África e Ásia, e muitas das cultivares de pimenta doce cultivadas em países de clima temperado (Pickersgill, 1997).

A variedade *C. annuum* var. *annuum* tem como características flores solitárias, corola branca, anteras azuis, ausência de manchas na corola e de constrição anular na junção do cálice com o pedicelo. Por outro lado, *C. annuum* var. *glabriusculum* tem corola sem presença de manchas, brancas com bordas roxas ou totalmente arroxeadas, além de anteras roxas (Viñals et al., 1996).

C. baccatum é representada pelas pimentas dedo de moça e chapéu de frade, que são os tipos mais comuns cultivados desta espécie no Brasil. Esta espécie reúne as formas botânicas *C. baccatum* L. var. *pendulum*, *C. baccatum* L. var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *praetermissum*. *C. baccatum* var. *baccatum* tem ampla distribuição geográfica, indo desde a Colômbia até o norte da Argentina e no sul e sudeste do Brasil, enquanto *C. baccatum* var. *praetermissum* é endêmica do Brasil. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum* abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e sudoeste do Brasil (Bosland, 1996).

C. baccatum var. *baccatum* apresenta flores brancas com manchas de cor verde na base, duas a cinco flores por nó, e a cor da corola é paleácea ou branco esverdeada, é altamente ramificada. *C. baccatum* var. *praetermissum*, além das cores da outra variedade, apresenta faixas lilás-violeta na margem das pétalas (Bosland, 1996). *C. baccatum* var. *pendulum* tem corola branca com manchas amareladas, uma única flor por nó, anteras amarelas, caule ereto, fruto largo, alongado e persistente (Bosland, 1996; Tong e Bosland, 1999).

A espécie *C. chinense* foi originalmente encontrada na bacia do Rio Amazonas, porém devido a suas características como adaptabilidade a diferentes solos e climas e a seu popular aroma cítrico, está distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil. Dentro desta espécie é observada uma grande variabilidade de

tamanho, forma e cor, apresentando intensidades diferentes, desde o amarelo até o vermelho (Eshbaugh, 1993; Lannes et al., 2007).

A espécie *C. frutescens* tem distribuição por toda a América Central e planícies da América do Sul, além de regiões tropicais e subtropicais, como Ásia, África e ilhas do Pacífico. É representada pelas famosas pimentas malaguetas, que são extremamente picantes. Caracterizam-se por serem plantas perenes e de maturação tardia, a altura varia de 1,5 a 2,0 m, têm duas a cinco flores em cada nó, corola branco-esverdeada, anteras variando de azul a púrpura, às vezes, amareladas, frutos pungentes (Viñals et al., 1996; Yamamoto e Nawata, 2005).

C. pubescens não é cultivada no Brasil e é pouco conhecida no país. É típica de terras altas, relativamente tolerantes ao frio, podendo, contudo, ocorrer em baixas altitudes. Tem flores isoladas a cada nó, de corola roxa e, ocasionalmente, com zonas brancas, anteras roxas, frutos com formato de maçã e sementes pretas (Bosland, 1996).

As espécies domesticadas de *Capsicum*, em relação ao sistema reprodutivo, são autógamas, contudo existe uma possível taxa de alogamia que pode ser facilitada por alterações morfológicas na flor, pela ação de insetos polinizadores e por práticas de cultivo, entre outros fatores (Tanksley, 1984). Uma característica exclusiva do gênero *Capsicum* é a pungência, que é atribuída à presença de capsaicinoides. Tais alcaloides se acumulam na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho et al., 2003). Os capsaicinoides constituem um grupo de 12 ou mais alcaloides relacionados. A capsaicina [(*E*)-*N*-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metil-6-nonenamida] e a dihidrocapsaicina são responsáveis por mais de 90% da pungência. Os capsaicinoides são utilizados na composição de medicamentos para aliviar dores musculares, reumáticas, inflamações, queimaduras, nevralgias, lombalgia, torcicolo etc. (Bianchetti e Carvalho, 2005).

O Brasil é considerado um dos maiores centros de diversidade do gênero *Capsicum* (Carvalho et al., 2003; Moscone et al., 2007). Diversas pesquisas têm sido conduzidas, envolvendo, grande parte delas, a forma cultivada *Capsicum annuum* (pimentão), provavelmente pela sua importância econômica e pelos problemas que esta espécie apresenta, sendo as doenças um dos principais e, portanto, o alvo da maioria dos programas de melhoramento (Rêgo et al., 2003; Azevedo et al., 2006; Blat et al., 2007).

3.2. Aspectos Econômicos

O mercado de molhos de pimentas no Brasil cresceu 8,3% em volume, em 2010, atingindo 61,8 milhões de quilos ou R\$ 811,8 milhões (Ohara e Pinto, 2012). O cultivo de hortaliças no Brasil ocupou, em 2011, uma área de, aproximadamente, 809 mil hectares, que produziram cerca de 19 milhões de toneladas (Embrapa, 2012).

Entre as hortaliças, as pimentas são usadas preferencialmente para a produção de condimentos, por características como cor dos frutos e princípios ativos, que lhes conferem aroma e sabor (Carvalho et al., 2003). Do ponto de vista social, o agronegócio de pimenta tem importância, principalmente, em função de requerer grande quantidade de mão de obra, em especial, durante a colheita. Além disso, o mercado de pimenta abrange a comercialização de frutos para consumo *in natura* e conservas caseiras até a exportação de páprica, pó de pimentão ou pimenta doce madura vermelha. Os frutos de pimentas picantes podem ser desidratados e comercializados inteiros, em flocos (calabresa) e em pó (páprica picante) ou, ainda, em conservas e em molhos (Moreira et al., 2006; Ohara e Pinto, 2012).

Considerando o consumo dos frutos verdes e *in natura*, as pimentas e pimentões produzem frutos com altos teores de vitamina C, sendo ainda importantes fontes de vitaminas A e do complexo B1 e B2, e de minerais como cálcio, fósforo e ferro (Bosland, 1993). As pimenteiras também estão sendo utilizadas como plantas ornamentais, em razão da folhagem variegada, do porte anão e dos frutos com diferentes cores no processo de maturação (Moreira et al., 2006; Finger et al., 2012).

No mundo, de toda a área cultivada com pimentas, aproximadamente 89% está no continente Asiático, com as principais áreas de cultivo localizadas na Índia, Coreia, Tailândia, China, Vietnã, Srilanka e Indonésia. Os Estados Unidos e o México respondem por cerca de 7% do total mundial e, por último, 4% da área cultivada está nos países da Europa, África e Oriente Médio (Rufino e Penteado, 2006).

A produção de pimenta no Brasil abrange todas as regiões, sendo Minas Gerais o principal Estado produtor, seguido por São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino e Penteado, 2006; Ohara e Pinto, 2012).

No Brasil, as pimentas mais comumente cultivadas são: malagueta (*C. frutescens*), pimenta de cheiro, pimenta de bode e cumari do Pará (*C. chinense*), pimenta dedo de moça, pimenta chifre de veado e cambuci (*C. baccatum*) e pimentão (*C. annuum*) (Henz e Costa, 2005). No país, o mercado de pimentas é muito segmentado e diversificado, em razão da grande variedade de produtos e subprodutos, usos e formas de consumo (Henz e Ribeiro, 2008).

3.3. Hibridação em *Capsicum*

O cultivo de pimentas e pimentões no Brasil demanda novas cultivares mais produtivas e com melhor qualidade dos frutos, associadas à resistência a pragas e doenças e estresses ambientais (Bento et al., 2007). Assim, o melhoramento genético de plantas é muito útil, pois é uma ciência que pode contribuir no aumento, tanto em quantidade quanto em qualidade dos alimentos, uma vez que objetiva o desenvolvimento de novas cultivares, apresentando um maior potencial de rendimento, qualidade industrial e nutricional, resistência a doenças, adaptabilidade e estabilidade em diferentes regiões, além de outros fatores (Bosland e Votava, 2000).

Programas de melhoramento genético do gênero *Capsicum* são encontrados no Brasil em várias instituições de pesquisa, incluindo a Embrapa Hortaliças, Universidade Federal de Viçosa, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Federal de Lavras, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal-UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu e Universidade Federal da Paraíba.

A hibridação interespecífica é uma ferramenta muito importante para os programas de melhoramento genético, por permitir a combinação do potencial genético de diferentes espécies. É usada com o objetivo de transferir genes, principalmente de resistência a pragas e doenças, de uma espécie silvestre para a forma cultivada, complementando a forma cultivada com um ou mais fatores desejáveis (Rick e Chételat, 1995; Hajjar e Hodgkin, 2007).

Barreiras pré e pós-fertilização são, na maioria das vezes, limitantes no processo de hibridação intra e interespecífica. Barreiras de pré-fertilização são resultante da falta de germinação dos grãos de pólen e do retardamento ou

inibição do crescimento do tubo polínico. E como principais barreiras de pós-fertilização, estão a morte do embrião ocasionada pela degeneração do endosperma e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Prestes e Goulart, 1995).

A hibridação interespecífica se tornou uma ferramenta importante para introgridir genes de interesse entre espécies de *Capsicum*. Yoon et al. (2006), trabalhando com introgressão de genes de resistência da espécie de *Capsicum baccatum* para a espécie cultivada *Capsicum annuum*, observaram aborto dos embriões, primeiro fator responsável pela incompatibilidade interespecífica entre estas espécies, acontecendo no estágio de embrião globular, 15 dias após a polinização.

A obtenção de híbridos entre espécies de *Capsicum* é possível, porém com certas restrições, como produção de híbridos em apenas uma direção do cruzamento e produção de sementes híbridas viáveis restritas a cruzamentos entre determinados acessos, ocorrendo baixa porcentagem de formação de sementes viáveis (Bapa Rao et al., 1992; Campos, 2006; Martins et al., 2013). Na maioria dos cruzamentos interespecíficos, são produzidas sementes inviáveis como resultado de falha na formação do endosperma (Jansky, 2006). Pickersgill (1991) afirma que, após a fertilização, o aborto do embrião é um fenômeno comum em cruzamentos interespecíficos em *Capsicum*, sendo necessário o uso de outras técnicas para obter resultados consistentes.

3.4. Cultura de Tecidos Vegetais

Os avanços da biotecnologia vêm contribuindo para o aumento do potencial de produtividade da maioria das espécies agrônômicas (Borém e Miranda, 2013), pontificando, entre as inúmeras técnicas, a cultura de tecidos vegetais.

O princípio básico da cultura de tecidos é a aplicação da totipotência celular, isto é, a capacidade da regeneração de plantas oriundas de células isoladas não diferenciadas ou de órgãos e tecidos vegetais. Refere-se, assim, ao conjunto de técnicas empregadas no crescimento e multiplicação de células, tecidos e órgãos, denominados explantes, com a utilização de soluções nutritivas

em um ambiente asséptico e controlado (Loyola-Vargas e Vázquez-Flota, 2006; Borém e Miranda, 2013; Davey e Anthony, 2010).

Com o auxílio da cultura de tecidos, genótipos podem ser selecionados para que possam ser introduzidos nos programas de melhoramento genético (Kothari et al., 2010).

A técnica de cultura de embriões é empregada nos processos de crescimento de embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (Rappaport, 1954).

A técnica de resgate de embriões foi relatada pela primeira vez por Hannig (1904) em dois gêneros de Cruciferae, *Cochleira* e *Raphanus*, e, desde então, verificou-se ser muito útil não só para regenerar híbridos, mas também para a superação de dormência das sementes ou esterilidade e encurtar os ciclos de reprodução (Manzur et al., 2013).

O emprego da técnica de resgate de embriões no gênero *Capsicum* permite a obtenção de híbridos entre espécies pertencentes a complexos gênicos diferentes, como é o caso do híbrido F₁ entre *C. annuum* e *C. baccatum* (Yoon et al., 2006).

Vários fatores podem afetar o cultivo *in vitro*, sendo um deles a composição do meio de cultura, que tem grande efeito sobre a resposta dos explantes (Haslam e Yeung, 2011). O meio de cultura deve fornecer aos tecidos e células os níveis apropriados de nutrientes, fonte de carbono, minerais e fitorreguladores, entre outros compostos, para promover o seu crescimento (Murashige e Skoog, 1962; Monnier, 1995; Sharma et al., 1996). No resgate de embriões em *Capsicum*, Manzur et al. (2013) utilizaram o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade dos sais minerais e das vitaminas, com 0,01 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e 0,01 mg L⁻¹ de ácido 3-indolacético (AIA) e 40 g L⁻¹ de sacarose, porém, principalmente para os embriões mais jovens, este meio proporcionou taxas germinativas abaixo de 25%.

Outros fatores que podem afetar o cultivo *in vitro* de embriões são o genótipo e o estágio de desenvolvimento dos embriões, considerados fatores-chave para a resposta do cultivo *in vitro* (Kapila e Sethi, 1993; Monnier, 1995). Há relatos de regeneração de embriões de *Capsicum* na fase de torpedo e cotiledonar por Hossain et al. (2003), Yoon et al. (2006), Manzur et al. (2013 e 2014). O primeiro relato de regeneração de plantas oriundas de embriões

globulares e cordiformes de *Capsicum* foi de Manzur et al. (2013). Embora tenham sido obtidas taxas muito baixas de germinação, este trabalho mostra o potencial da técnica de resgate de embriões, uma vez que se acreditava ser impossível obter plântulas de embriões nessas fases (Yoon et al., 2006). Dessa forma, mais estudos se fazem necessários para obter maior taxa germinativa dos embriões imaturos, principalmente das fases mais iniciais, para que haja um aumento na eficiência desta técnica para o gênero *Capsicum*.

O domínio desta técnica permite que melhoristas que trabalham com *Capsicum* obtenham redução dos ciclos de reprodução e/ou resgatem híbridos interespecíficos potencialmente abortivos (Manzur et al., 2013; Manzur et al., 2014). Porém, o conhecimento da resposta de embriões zigóticos de *Capsicum* no cultivo *in vitro* é ainda escasso, com poucos relatos como os de Hossain et al. (2003), Yoon et al. (2006) e Manzur et al. (2013; 2014). Esta técnica foi aplicada para superar as barreiras genéticas de pós-fertilização em alguns cruzamentos entre *C. annuum* × *C. frutescens* (Hossain et al., 2003) e *C. annuum* × *C. baccatum* (Yoon et al., 2006).

As pimentas do gênero *Capsicum* são consideradas recalcitrantes para o cultivo *in vitro*, isto é, as células, tecidos e órgãos podem não apresentar respostas morfogênicas quando cultivadas *in vitro*, sendo os principais fatores de influência a fisiologia da planta doadora do explante, a manipulação *in vitro* e a fisiologia do estresse *in vitro* (Benson, 2000; Kothari et al., 2010). Portanto, apesar dos relatos de resgate *in vitro* de embriões oriundos dos experimentos de Hossain et al. (2003), Yoon et al. (2006) e Manzur et al. (2013), existe uma carência de estudos detalhados sobre a resposta de embriões do gênero *Capsicum* no cultivo *in vitro*.

3.5. Sacarose

No cultivo *in vitro*, o meio de cultura precisa fornecer todas as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos, que perdem parcial ou totalmente o autotrofismo, necessitando, assim, de uma fonte de carboidratos no meio de cultura. A fonte e a concentração dependem da espécie vegetal e da fase do processo *in vitro* (Caldas et al., 1998).

Os carboidratos são importantes moléculas fornecedoras de energia para a planta. A disponibilidade de açúcares é um importante direcionador do crescimento e desenvolvimento embrionário e na germinação de sementes, uma vez que estes compostos atuam tanto como substratos intermediários para o metabolismo quanto como moléculas sinalizadoras (Smeekens et al., 2010).

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, oligossacarídeos estruturais e todos os compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (Caldas et al., 1998). Assim, o carbono exógeno no meio de cultivo influencia a fisiologia da planta e a diferenciação de órgãos (George, 2008).

O tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento *in vitro* (Nicoloso et al., 2003, Moreira et al., 2007). A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos (Santos, 2003).

Durante o processo de cultivo *in vitro*, a adição de carboidratos ao meio de cultura, como fonte de carbono, é fundamental para a resposta morfogênica (George, 2008). Na maioria das plantas, a sacarose é o principal açúcar translocado e, portanto, a forma de carbono que a maioria dos tecidos não fotossintéticos importa, sendo considerada o verdadeiro substrato para a respiração vegetal (Taiz e Zeiger, 2013). Assim, os níveis de sacarose presentes no meio de cultura influenciam vários processos metabólicos, sendo importante na geração de energia ou como esqueleto de carbono, produzindo efeito sobre o crescimento e a diferenciação celular (Skrebsky et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Para o presente estudo, foram utilizadas sementes comerciais de *C. annuum* L. var. *annuum* e sementes de acessos de *Capsicum* da coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) de *C. baccatum* L. var. *pendulum*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Tabela 1). O trabalho foi desenvolvido no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Tabela 1. Origem e características dos acessos utilizados na presente pesquisa.

Espécie	Genótipo	Cultivar	Procedência	Cor do fruto
<i>Capsicum annuum</i>	Comercial	Pimentão casca dura IKEDA	TopSeed®	Vermelho
<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	UENF 1624	Dedo de moça	-	Vermelho
<i>Capsicum chinense</i>	UENF 2032	Airetama Biquinho	Isla®	Amarelo
<i>Capsicum frutescens</i>	UENF 1636	Malagueta	Miranda - MS	Vermelho

4.2. Ensaio preliminar

Sementes maduras de *C. annuum*, (Pimentão casca dura IKEDA), foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente, imersas em 80 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7% com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente, e deixadas de molho na quarta água por 12 horas antes do isolamento dos embriões maduros.

Com auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival[®]), pinça e bisturi, os embriões maduros foram isolados e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura composto por metade da concentração dos sais minerais do meio MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma[®], com pH ajustado para 5,7± 0,1 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro concentrações de sacarose (0, 20, 30 e 40 g L⁻¹) e seis repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultura com 10 embriões. Após 20 dias, os embriões que germinaram foram transferidos para frascos de (altura x diâmetro) contendo 40 mL do mesmo meio de cultura.

Os embriões foram mantidos no escuro por sete dias, posteriormente, expostos à luz e avaliados diariamente por um período de 45 dias, sendo verificadas as taxas de germinação e de sobrevivência, tendo sido consideradas germinadas apenas as plântulas que mostraram desenvolvimento de raiz e parte aérea. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 27± 2°C, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes OSRAM[®] luz do dia.

4.3. Experimentos

4.3.1. Experimento 1 – Resgate de embriões imaturos

Os experimentos tiveram como base os trabalhos de Hossain et al. (2003), Yoon et al. (2006) e Manzur et al. (2013). Os frutos de *C. baccatum* e de *C. frutescens* foram coletados a partir do 15º dia até o 45º dia após a autopolinização para identificação dos quatro estádios de desenvolvimento dos embriões (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar). Esses embriões foram extraídos em laboratório com auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®), pinça, bisturi e agulhas hipodérmicas esterilizadas.

Os frutos foram inicialmente lavados com detergente líquido comercial e enxaguados em água corrente. Em ambiente asséptico, os frutos foram imersos em álcool 70% por cinco minutos, 15 minutos em NaClO a 1,0% com duas gotas de Tween 20 em um volume de 80 mL e enxaguados em água desionizada e autoclavada por três vezes nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente. Logo em seguida, as sementes imaturas foram retiradas dos frutos para a excisão dos embriões.

O experimento com cultivo de embriões imaturos foi dividido em dois grupos. No primeiro grupo, foram utilizados embriões globulares e cordiformes. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 6x2x2, com seis meios de cultivo, dois genótipos e dois estádios de desenvolvimento dos embriões (Tabela 2). O meio de cultura base foi composto por sais minerais do MS e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma® e 40 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,7± 0,1.

Tabela 2. Meios de cultura utilizados no resgate de embriões globulares e cordiformes de *C. baccatum* e *C. frutescens*. MS: meio de cultura MS, AIA: ácido 3-indolacético, GA₃: ácido giberélico.

Tratamento	Sais de MS	AIA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)
M1	½ MS	0,01	0,01
M2	½ MS	0,05	0,05
M3	½ MS	0,10	0,10
M4	MS	0,01	0,01
M5	MS	0,05	0,05
M6	MS	0,10	0,10

No segundo grupo, foram utilizados embriões torpedos e cotiledonares. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 5x2x2, com cinco meios de cultivo, dois genótipos e dois estádios de desenvolvimento dos embriões (Tabela 3). O meio de cultura base foi composto pela metade da concentração dos sais minerais do MS ($\frac{1}{2}$ MS) e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma® e com pH ajustado para 5,7± 0,1.

Tabela 3. Meios de cultura utilizados no resgate de embriões torpedos e cotiledonares de *C. baccatum* e *C. frutescens*. AIA: ácido 3-indolacético, GA₃: ácido giberélico.

Tratamento	Sacarose (g L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)
M1	-	-	-
M2	20	-	-
M3	40	-	-
M4	20	0,01	0,01
M5	40	0,01	0,01

Os embriões foram mantidos no escuro por sete dias, posteriormente, expostos à luz. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 27± 2°C, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 μmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia.

A taxa de germinação das sementes foi avaliada durante 50 dias de cultivo *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos em DIC com quatro repetições, cada repetição constituída por uma placa de Petri (90 x 15 mm) com quatro embriões. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, ao teste de Tukey (p<0,01).

4.3.2. Experimento 2 – Cultivo de embriões maduros

Neste experimento, foram utilizadas sementes maduras de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. O processo de desinfestação foi conduzido em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar, em que as sementes maduras foram desinfestadas por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente imersas em 80 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7% com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente, e deixadas de molho na quarta água por 12 horas antes do isolamento dos embriões maduros.

Com auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival[®]), pinça e bisturi, os embriões maduros dos quatro genótipos foram isolados e colocados em placas de Petri com meio de cultura contendo metade da concentração dos sais minerais do MS e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma[®], com pH ajustado para 5,7± 0,1 e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão. O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 4x5 com quatro genótipos e cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹) e quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo 25 mL de meio de cultura com 10 embriões. Os dados foram submetidos à ANOVA e, posteriormente, ao teste de Tukey (p<0,05).

Os embriões foram mantidos no escuro por sete dias e, posteriormente, expostos à luz, tendo sido avaliados diariamente por um período de 15 dias, verificando-se a taxa de germinação, sendo consideradas germinadas apenas as plântulas que mostraram desenvolvimento de raiz e parte aérea. Os explantes foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 27± 2°C, sob fotoperíodo de 16:8 horas luz:escuro e irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ provida por lâmpadas fluorescentes OSRAM[®] luz do dia.

4.3.3. Experimento 3 – Crescimento *in vitro*

Neste experimento, foram utilizadas plântulas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, oriundas do experimento 2. Após 15 dias de cultivo *in*

vitro em meio $\frac{1}{2}$ MS com ausência de sacarose, as plântulas de cada genótipo, germinadas de embriões cotiledonares maduros isolados, foram colocadas em frascos contendo meio de cultura com metade da concentração dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma®, com concentrações distintas de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹), com pH ajustado para 5,7± 0,1, e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão.

O experimento foi conduzido em DIC, com cinco tratamentos constituídos pelas diferentes concentrações de sacarose, com cinco repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco (65 x 125 mm) com cinco plântulas, contendo 40 mL de meio de cultura.

A avaliação foi feita ao final de um período de 30 dias, tendo sido verificada a taxa de sobrevivência além de análises biométricas nos quatro genótipos e fisiológicas apenas em *C. baccatum* e *C. frutescens*, devido a problemas de contaminações endógenas nos demais. Os dados foram submetidos à ANOVA e, posteriormente, ao teste de Tukey (p<0,05).

4.3.3.1. Determinação da área foliar

As medidas de área foliar foram feitas com um integrador de área foliar LICOR® de bancada, modelo LI-3100, cujo funcionamento se dá em tempo real, ou seja, a área é medida ou tomada no momento em que a folha passa pelo sensor. Seu visor apresenta medidas de no mínimo 1mm² e resolução de até 0,1mm² (Li-Cor, 1996).

4.3.3.2. Determinação da massa da matéria seca

A parte aérea e as raízes das plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel identificados e secados em estufa de circulação forçada de ar, a 70°C, até atingirem massa constante. Posteriormente, foram pesadas em balança analítica para determinação da massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST).

4.3.3.3. Determinação da fluorescência da clorofila a, eficiência fotoquímica e índice fotossintético

As variáveis da fluorescência da clorofila a, a eficiência fotoquímica e o índice fotossintético (PI), foram determinadas por meio de um fluorímetro de luz não modulado, modelo *Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter* (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). A avaliação foi feita com uma folha plenamente expandida. Com o auxílio de uma pinça, ela foi adaptada ao escuro por 15 minutos para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos”, e a perda de calor fosse mínima (Bòlhar-Nordenkampf et al., 1989).

4.3.3.4. Intensidade de Verde

A intensidade da cor verde das folhas foi determinada por um medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 (Chlorophyll meter – Minolta, Japão). Foram feitas cinco leituras por folha e, em seguida obtidas as médias. O medidor portátil de clorofila tem sido usado como ferramenta para detectar estresses abióticos em diversas culturas, como o hídrico, o de nitrogênio e o salino. Este medidor apresenta simplicidade no uso e possibilita uma avaliação não destrutiva do índice de verde presente no tecido foliar (Torres Netto et al., 2002; Torres Netto, 2005; Peçanha, 2010; Castro, 2011).

4.3.4. Experimento 4 – Aclimatização

Na aclimatização, foram utilizadas 12 plantas oriundas de embriões maduros isolados de cada tratamento com sacarose da fase *in vitro* do experimento 3. As plantas foram colocadas em bandejas plásticas com capacidade de 300 mL, contendo substrato Vivatto Hortaliças[®].

As plantas foram pré-aclimatizadas em câmara de crescimento vegetal com temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 16:8 horas luz:escuro, por um período de 15 dias, e então transferidas para casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF, onde permaneceram por mais 30 dias.

Após este período, foram avaliados taxa de sobrevivência, área foliar, número de folhas e massa da matéria seca, conforme metodologia já mencionada. O volume radicular foi analisado com o auxílio do programa Winrhizo[®] acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 (Regent Instrument Inc., 2001).

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados com três repetições contendo quatro plantas por parcela. Os dados foram submetidos à ANOVA e, posteriormente, ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.5. Experimento 5 – Eficiência do cultivo de embriões maduros

O experimento foi composto por 200 sementes maduras de cada um dos quatro genótipos: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. Metade das sementes teve o embrião maduro isolado e o restante das sementes ficou intacto. A desinfestação seguiu o mesmo protocolo descrito no item 4.3.2. Os embriões e as sementes foram colocados para germinar em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 40 mL de meio de cultura com metade da concentrações dos sais minerais do MS, complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel Sigma[®], sem sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, e autoclavado por 15 minutos a 121°C e 1,1 atm de pressão.

O experimento foi conduzido em DIC, com dois tratamentos (embrião isolado e semente intacta) com 10 repetições constituídas por uma placa de Petri com 10 explantes cada. As placas de Petri foram mantidas por sete dias no escuro e oito dias em luz, sendo mantidas as mesmas condições de cultivo do item 4.3.2. A taxa de germinação foi avaliada diariamente por um período de 15 dias. Os dados foram submetidos à ANOVA e, posteriormente, ao teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4. Análise estatística

Primeiramente foram verificadas as pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos, respectivamente, pelos testes de Lilliefors e Cockram e Bartlet, para que então os dados pudessem ser submetidos a análise de variância (ANOVA). Em seguida, os dados foram submetidos à

comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% ou 1% de probabilidade. Os parâmetros foram analisados com o auxílio do programa SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio Preliminar

O início do desenvolvimento dos embriões ocorreu no quinto dia. O melhor resultado para a germinação dos embriões foi obtido no meio com ausência de sacarose, que apresentou 91,7% de formação de plântulas, diferindo significativamente dos tratamentos com 20, 30 e 40 g L⁻¹ (Tabela 4).

As plântulas apresentaram necrose de folhas após os 15 dias de cultivo em meio sem sacarose, sendo necessária, portanto, sua transferência para meio de cultura contendo sacarose.

Ao final de um período de 45 dias, houve 100% de mortalidade das plântulas nos tratamentos com sacarose, e as plântulas na ausência de sacarose não continuaram seu crescimento (Figura 1) (Walter et al., 2013).

Tabela 4. Germinação de embriões maduros de *Capsicum annuum* var. *annuum* em diferentes concentrações de sacarose. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Sacarose (g L ⁻¹)	Germinação (%)
0	91,7 a
20	43,3 b
30	35 b
40	45 b
C.V. (%)	17,22

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p<0,01

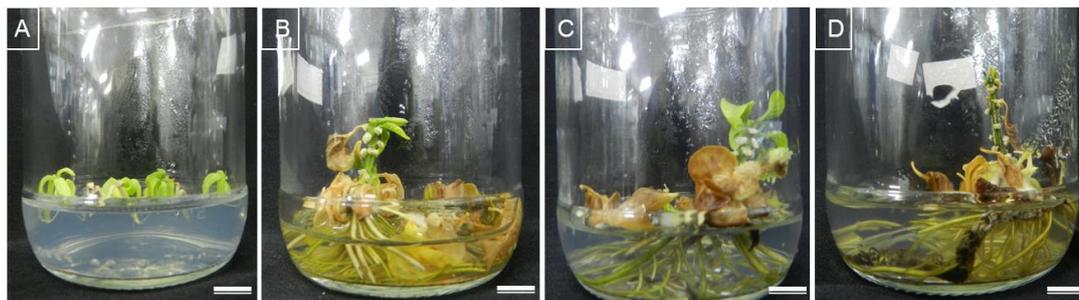


Figura 1. Plantas de *Capsicum annuum* sob diferentes concentrações de sacarose ao final do período de 45 dias. Concentrações de sacarose A) 0; B) 20 g L⁻¹; C) 30 g L⁻¹; D) 40 g L⁻¹. (barra = 1 cm).

5.2. Germinação de embriões imaturos

A análise de variância revelou que todos os fatores (genótipo, meio de cultura e estágio de desenvolvimento) contribuíram significativamente ($P > 0,01$) para as diferenças observadas nas taxas de germinação de embriões imaturos de *Capsicum* (Tabelas 5 e 6).

No entanto, com base nos quadrados médios, as maiores contribuições para a variação detectada para os embriões globular e cordiforme correspondem ao estágio de desenvolvimento (E), seguindo-se a composição do meio (M) e, em menor grau, o genótipo (G) (Tabela 5).

Para os embriões nos estádios torpeda e cotiledonar, o fator com maior contribuição foi a composição do meio (M), seguido pelo estágio de desenvolvimento (E) e, finalmente, pelo genótipo (G) (Tabela 6). Desta forma, embora o genótipo seja considerado um dos fatores de maior importância no cultivo *in vitro*, principalmente em *Capsicum* (Kothari et al., 2010), os resultados desta pesquisa sugerem que este fator pode ser menos importante que os demais, quando se leva em consideração a resposta específica dos embriões zigóticos de *Capsicum*, resultado corroborado por Manzur et al. (2013).

Em relação ao efeito de interações entre os fatores acima mencionados, apenas E x M contribuiu significativamente para a eficiência da germinação *in vitro* de embriões nos estádios globular e cordiforme, embora sua magnitude tenha sido inferior à dos principais fatores (Tabela 5). Estes resultados indicam que os embriões na mesma fase podem mostrar diferenças significativas nas taxas de germinação, dependendo do meio de cultura. Já para os embriões do

tipo torpedo e cotiledonar, houve contribuição de todas as interações dos fatores analisados, assim, os embriões no mesmo estágio podem responder de diferentes formas, dependendo do genótipo e do meio de cultura (Tabela 6).

Tabela 5. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), estágio de desenvolvimento (E), meio de cultura (M) e suas interações na eficiência da germinação *in vitro* de embriões globulares e cordiformes de *C. baccatum* e *C. frutescens*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Efeitos	GL	QM ^a
Genótipo (G)	1	319,0104 ^{**}
Estádio de desenvolvimento (E)	1	3444,0104 ^{**}
Meio (M)	5	1084,6354 ^{**}
Interações		
G x E	1	58,5938 ^{ns}
G x M	5	22,1354 ^{ns}
E x M	5	240,8854 ^{**}
G x E x M	5	11,7187 ^{ns}
Resíduo	69	31,6926

^a ns e ** indicam não significância ou significância em $P < 0,01$.

Tabela 6. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos do genótipo (G), estágio de desenvolvimento (E), meio de cultura (M) e suas interações na eficiência da germinação *in vitro* de embriões torpedos e cotiledonares de *C. baccatum* e *C. frutescens*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Efeitos	GL	QM ^a
Genótipo (G)	1	5695,3125 ^{**}
Estádio de desenvolvimento (E)	1	6570,3125 ^{**}
Meio (M)	4	20253,9063 ^{**}
Interação		
G x E	1	2257,8125 ^{**}
G x M	4	1339,8438 ^{**}
E x M	4	925,7813 ^{**}
G x E x M	4	636,7188 ^{**}
Resíduo	57	146,3816

** indica significância em $P < 0,01$.

Dos dois genótipos avaliados, *C. frutescens* obteve as maiores taxas germinativas para os embriões imaturos de todos os estádios. No entanto, neste trabalho, foi possível obter plântulas de embriões imaturos em qualquer fase de desenvolvimento para as duas espécies. Isto é de especial interesse porque, de acordo com a literatura revisada, os embriões globulares deste gênero só foram

germinados *in vitro* anteriormente em um único trabalho realizado por Manzur et al. (2013).

Embora a eficiência do cultivo tenha aumentado gradativamente com o estágio de desenvolvimento, tais aumentos diferiram entre os genótipos, mostrando a interação G x E detectada na análise de variância para os embriões mais maduros (Tabela 6). Neste sentido, as taxas de germinação *in vitro* mostraram um aumento acentuado na transição do estágio globular para o cordiforme para *C. baccatum* e *C. frutescens*, atingindo 31,25% e 37,5%, respectivamente (Figuras 2.A e 2.B).

Conforme detectado na ANOVA, a composição do meio foi um fator essencial para a germinação de embriões imaturos (Tabelas 5 e 6). Para os embriões globulares, em *C. baccatum* e *C. frutescens*, o meio M2 apresentou as maiores taxas germinativas, 12,5% e 18,75%, respectivamente (Figuras 2.A e 2.B) e foi o único que diferiu dos tratamentos que atingiram as menores porcentagens de germinação. No estágio cordiforme em *C. baccatum*, os meios M1 e M2 proporcionaram 31,25% de germinação, diferindo dos meios M3 e M6, com menor taxa (Figura 2.A). Em *C. frutescens*, destaca-se o meio M2, com germinação de 37,5% (Figura 2.B). De forma geral, para os embriões globular e cordiforme, M1 e M2 apresentaram as maiores taxas de germinação (Figuras 2.A e 2.B). Manzur et al. (2013), trabalhando com embriões imaturos de *Capsicum*, verificaram que as concentrações de 0,01 mg L⁻¹ de GA₃ e de AIA proporcionaram as maiores taxas germinativas. Embora as taxas de germinação não sejam altas, os resultados de germinação são muito satisfatórios quando comparados a outros trabalhos (Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2013). O uso do meio MS com metade da composição de sais foi mais eficiente para a germinação dos embriões nos estádios globular e cordiforme assim como no trabalho de Manzur et al. (2013) (Figura 2.A e 2.B).

Nos embriões no estágio torpedo, os meios M2, M4 e M5 propiciaram as maiores taxas germinativas para as duas espécies, com valores variando entre 37,5 e 43,75% para *C. baccatum* e entre 87,5 e 93,75% para *C. frutescens*. O meio com 40 g L⁻¹ de sacarose (M3) causou baixa taxa germinativa, porém quando acompanhado dos fitorreguladores (M5), houve aumento na germinação dos embriões torpedo para as duas espécies (Figuras 2.C. e 2.D).

Nos embriões cotiledonares, para *C. baccatum*, nos meios M2 e M5, foram obtidos resultados de 93,75 e 87,5% de germinação, respectivamente. O uso de 20 g L⁻¹ de sacarose sem fitorregulares (M2) e 40 g L⁻¹ com fitorregulares (M5) proporcionou as maiores taxas (Figura 2.C). Para *C. frutescens*, a taxa de germinação dos embriões coliedonares variou de 50 a 93,75%. Assim sendo, a sacarose, com ou sem os fitorreguladores, proporcionou boas taxas germinativas nos embriões cotiledonares desta espécie (Figura 2.D).

Estes resultados foram superiores aos descritos na literatura para todos os estádios de desenvolvimento das duas espécies (Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2013).

Pode-se evidenciar que, diferentemente dos embriões maduros, para a germinação, os embriões imaturos necessitam de sacarose como fonte exógena de carboidrato, uma vez que na ausência de sacarose não houve germinação destes embriões (Figura 2.C e 2.D). O uso de GA₃ e AIA para a germinação de embriões torpedo e cotiledonar proporcionou taxas germinativas semelhantes aos tratamentos com ausência destes fitorreguladores, assim, se verifica que pode ser alcançada boa eficiência no resgate destes embriões sem a utilização de GA₃ e AIA.

De modo geral, muitos autores relatam para várias espécies que embriões maduros e imaturos do tipo torpedo e cotiledonar crescem bem com conteúdo baixos de açúcar (20 a 30 g L⁻¹), enquanto embriões mais jovens normalmente requerem elevados níveis de sacarose (80 a 120 g L⁻¹) como fonte de energia, pela sua condição heterotrófica e/ou para manter um equilíbrio osmótico adequado (Fischer e Neuhaus, 1995; Monnier, 1995; Bhojwani e Razdan, 1996). Manzur et al. (2013) provaram que o uso de 40 g L⁻¹ de sacarose foi mais eficiente para a germinação de embriões globulares e cordiformes de *Capsicum* do que 80 g L⁻¹.

Além disso, a comparação entre os meios de cultura com a mesma concentração de reguladores revelou que ½MS pode aumentar a eficiência da cultura de embriões globulares e cordiformes em *Capsicum*, embora seu efeito tenha sido menor do que os fitorreguladores (Figura 2.A e 2.B). Este aspecto é mais perceptível comparando os meios para embriões globulares e cordiformes M1 e M2 com M4 e M5, já que os primeiros obtiveram maiores taxas germinativas, em qualquer fase embrionária com metade dos sais do meio MS

(Figuras 2.A e 2.B). Monnier (1995) relatou que os sais minerais que promovem o crescimento em embriões podem ser tóxicos e, conseqüentemente, diminuir a taxa de sobrevivência. Esse autor aumentou a frequência de sobrevivência de embriões de *Capsella bursapastoris* diminuindo alguns componentes da formulação MS original, reportando um efeito notável com a redução de ferro (adicionado como Fe-EDTA) e de nitrato. Portanto, parece que os níveis em que Fe-EDTA e/ou outros sais minerais incluídos na formulação do MS podem ser ligeiramente tóxicos para os embriões imaturos de *Capsicum*, diminuindo sua taxa de sobrevivência.

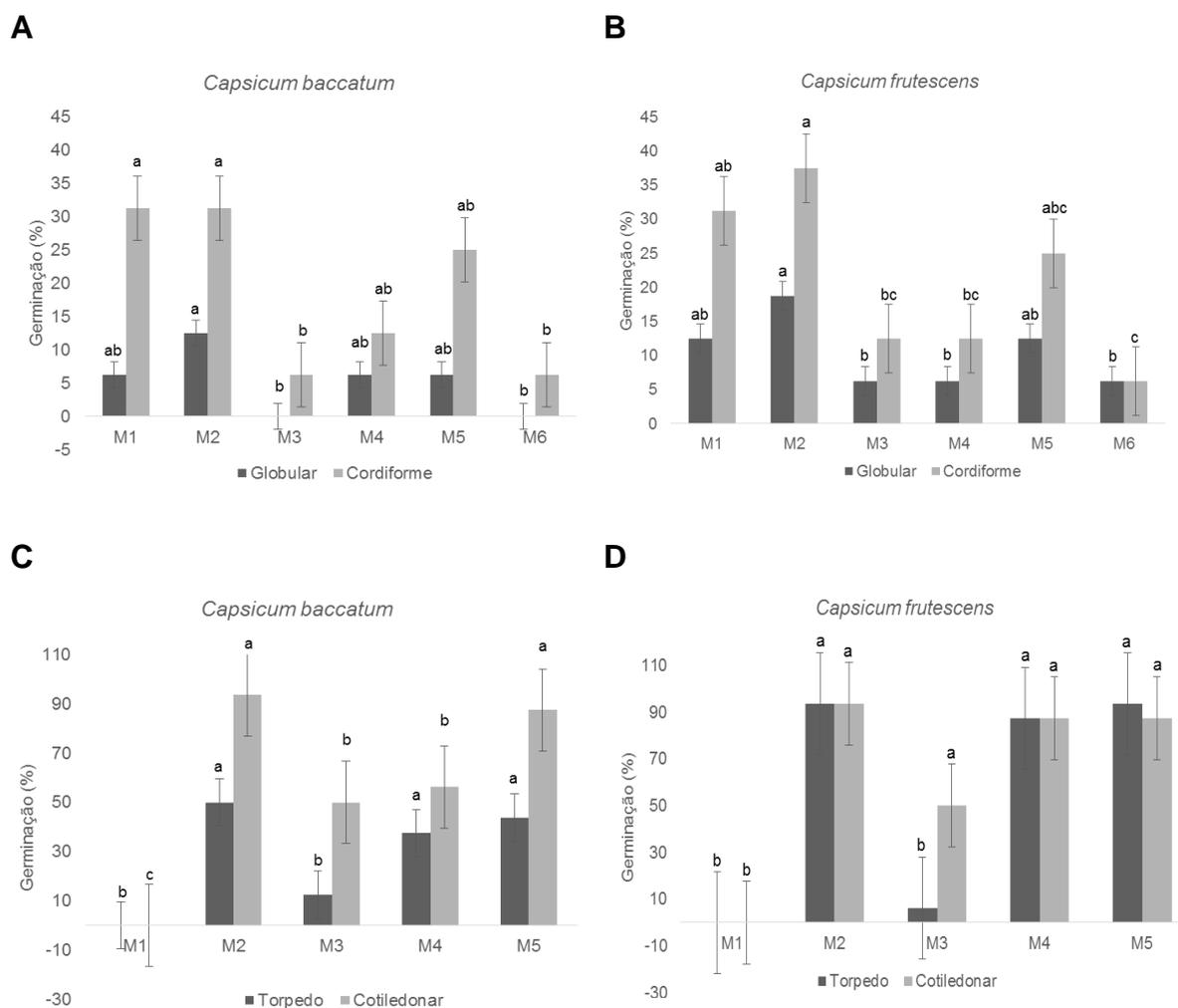


Figura 2. Porcentagem da germinação *in vitro* de (A) e (B) Embrião globular e cordiforme, (C) e (D) Embrião torpedo e cotiledonar. Meios para globular e cordiforme: M1- $\frac{1}{2}$ MS + 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M2- $\frac{1}{2}$ MS + 0,05 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M3- $\frac{1}{2}$ MS + 0,1 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M4-MS + 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M5-meio MS com 0,05 mg L⁻¹ de AIA e 0,05 mg L⁻¹ de GA₃; M6-MS + 0,1 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; meios para torpedo e cotiledonar: M1-sem sacarose e sem reguladores; M2- 20 g L⁻¹ de sacarose; M3-40 g L⁻¹ de sacarose; M4-20 g L⁻¹ de sacarose com 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃; M5-40 g L⁻¹ de sacarose com 0,01 mg L⁻¹ de AIA e GA₃. Linhas sobre as barras indicam erro padrão da média. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, (p<0,01).

5.3. Cultura de embriões maduros

Em *C. baccatum*, houve 100% de germinação em todos os tratamentos, já nas demais espécies, ausência e baixas concentrações de sacarose apresentaram os melhores resultados de germinação. Em *C. annum*, em meios

com sacarose abaixo de 20 g L⁻¹, obteve-se alta taxa de germinação, acima de 97%. Para *C. chinense* e *C. frutescens*, as concentrações de 0 e 10 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram germinação acima de 95% e foram as únicas que diferiram do tratamento com 40 g L⁻¹ com a menor taxa germinativa. Ainda na germinação de embriões maduros, destaca-se o meio de cultura com ausência de sacarose, sendo este o melhor meio para a germinação de embriões maduros, alcançando 100% em todas as espécies (Tabela 7). Manzur et al. (2013), trabalhando com embriões cotiledonares de *Capsicum*, estabeleceram que o meio suplementado com 0,01 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) e 0,01 mg L⁻¹ de ácido 3-indolacético (AIA) juntamente com 40 g L⁻¹ de sacarose foi o mais efetivo para a germinação. Para os embriões maduros testados, não houve necessidade de suplementação do meio de cultura com fitorreguladores e nem com sacarose.

A diminuição da porcentagem de germinação de embriões com o aumento da concentração de sacarose foi relatada por outros pesquisadores em razão da alteração no potencial osmótico do meio de cultura causada pela sacarose. Concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não tenha água disponível para a embebição, dificultando o processo de germinação (George, 1993; Reis et al., 2008). Pinheiro et al. (2001), em *Hancornia speciosa*, verificaram que, na ausência e na presença de 10 g L⁻¹ de sacarose, houve maior porcentagem de germinação, e concentrações mais elevadas promoveram redução na taxa germinativa.

Tabela 7. Efeito de diferentes concentrações de sacarose sobre a germinação *in vitro* de embriões maduros de quatro espécies de *Capsicum*. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Sacarose (g L ⁻¹)	Germinação (%)			
	<i>C. annuum</i>	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
0	100 a	100 a	100 a	100 a
10	100 a	100 a	95 a	97 a
20	97 a	100 a	69 ab	84 ab
30	59 b	100 a	69 ab	91 ab
40	63 b	100 a	59 b	66 b
C.V. (%)	16,12	-	18,36	16,08

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, (p<0,05).

5.4. Crescimento *in vitro* e aclimatização

As plântulas dos quatro genótipos germinadas na ausência de sacarose, derivadas de embriões isolados, foram levadas para o crescimento *in vitro* com concentrações distintas de sacarose e cresceram independentemente do tratamento (Figura 3). Houve diferença significativa para massa seca da parte aérea (MSPA) em todos os genótipos testados. O *C. annuum* obteve maior acúmulo de MSPA de 20 a 40 g L⁻¹ de sacarose, com valores de 0,0230 g a 0,0372 g (Figura 4.A). As plantas de *C. baccatum* e *C. chinense* produziram maior MSPA nos tratamentos que tinham sacarose no meio de cultura (10 a 40 g L⁻¹) (Figuras 4.B e 4.C). Em *C. frutescens*, o tratamento com 10 g L⁻¹ de sacarose produziu maior MSPA, com 0,0221 g (Figura 4.D).

Para matéria seca da raiz (MSR), o maior acúmulo em *C. annuum* foi obtido em 30 g L⁻¹ de sacarose, com 0,1016g. Em *C. baccatum* e *C. chinense*, os tratamentos com 20, 30 e 40 g L⁻¹ proporcionaram as maiores MSR, enquanto para *C. frutescens* o maior incremento de raiz foi obtido com 20 g L⁻¹ de sacarose, com 0,0235 g (Figura 4.D). Os valores mais elevados de massa da matéria seca total (MST) foram obtidos nos meios com sacarose, com destaque para *C. annuum*, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose, para *C. baccatum* e *C. chinense*, 20 a 40 g L⁻¹ e para *C. frutescens*, 10 a 40 g L⁻¹ (Figura 4).

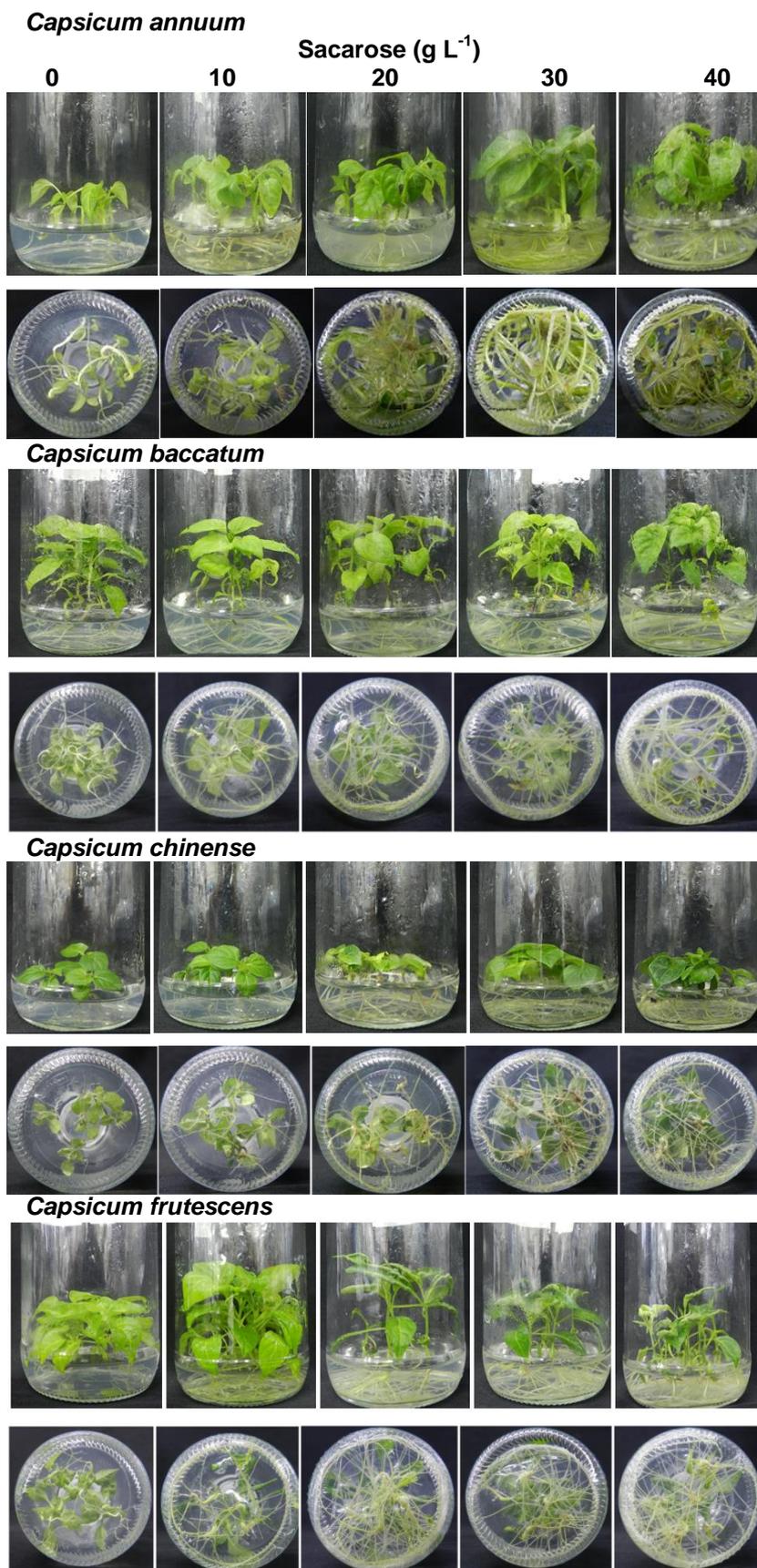


Figura 3. Parte aérea e raízes após 45 dias de cultivo *in vitro* de plantas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* em diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g L⁻¹).

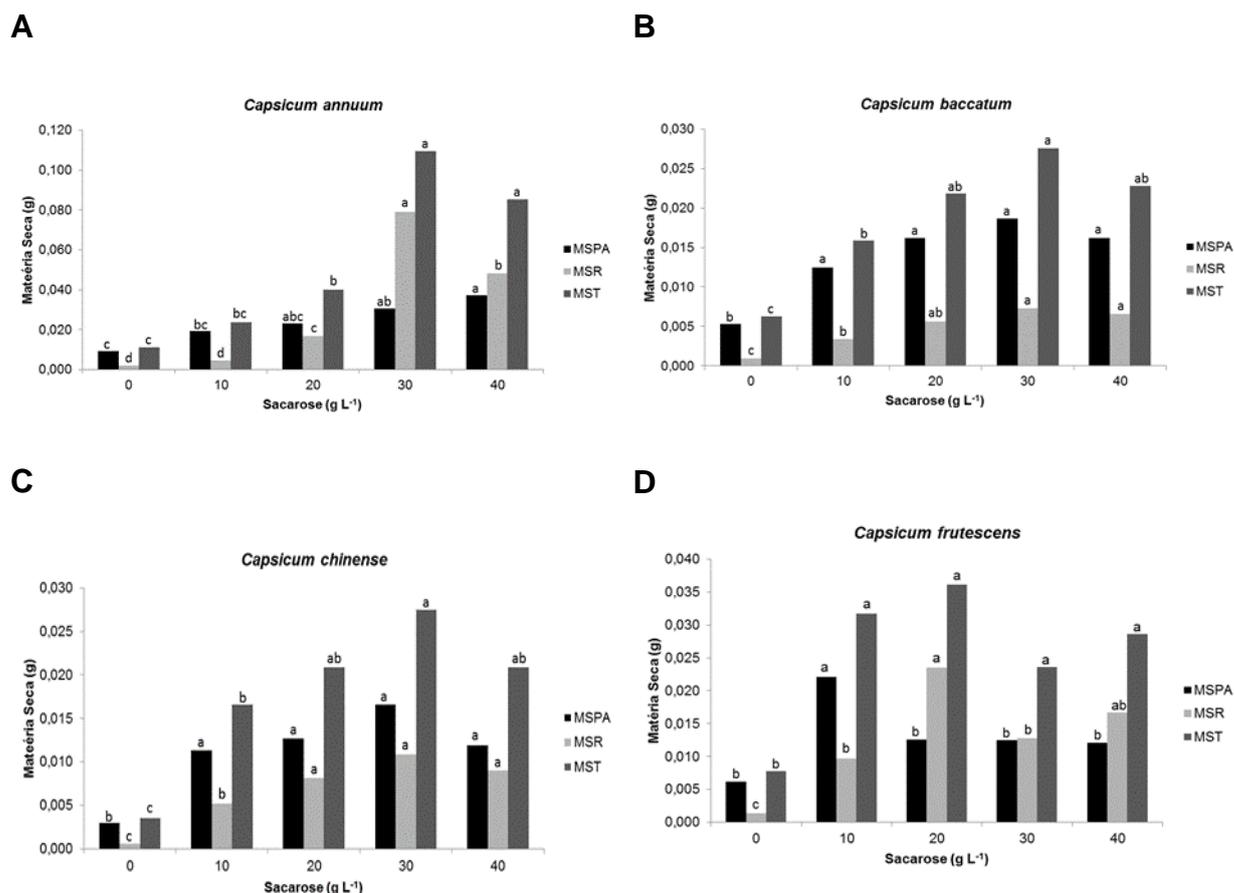


Figura 4. Massa da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), da Raiz (MSR) e Total (MST) de quatro espécies de *Capsicum*: (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens*, após 45 dias de cultivo *in vitro* em função da concentração de sacarose no meio de cultura. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Já na aclimatização, houve diferença significativa para MSPA, MSR e MST apenas para *C. frutescens*, destacando-se os tratamentos com 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose, com resultados para MSPA de 1,1190 e 0,9482 g, MSR de 0,9010 e 0,7941 g e MST com 2,0200 e 1,7423 g, respectivamente (Figura 5). As plantas cultivadas *in vitro* em meio sem sacarose não sobreviveram à aclimatização, exceto as de *C. chinense*, porém, com uma taxa de apenas 16,67%.

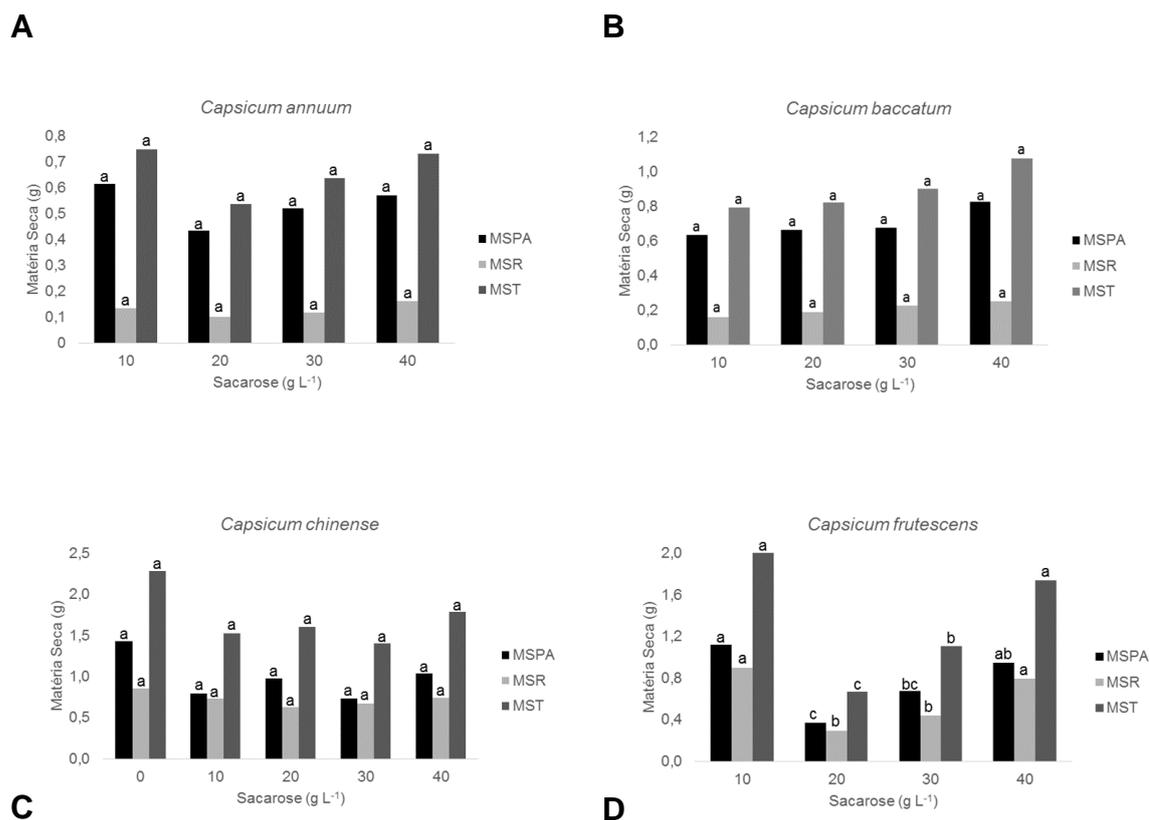


Figura 5. Massa da Matéria Seca da Parte Aérea (MSPA), da Raiz (MSR) e Total (MST) de plantas de quatro espécies de *Capsicum*: (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens*, após 45 dias de aclimatização em função da concentração de sacarose no meio de cultura durante a etapa *in vitro*. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Estudos mostraram que 75 a 85% da biomassa nos cultivos *in vitro* é devida à incorporação de carbono na forma de sacarose ao meio de cultura (De Riek et al., 1997; Stancato e Tucci, 2010). Neste trabalho, o uso de concentrações elevadas de sacarose no meio de cultura promoveu aumento na matéria seca de plantas de *Capsicum*. Crespo (2007) e Schmidt, (2010) constataram, em seus trabalhos com cana-de-açúcar e mamoeiro ‘Golden’, respectivamente, que com o aumento das concentrações de sacarose no meio de cultura, houve concomitantemente aumento na massa da matéria seca.

Houve diferenças significativas na área foliar das plantas cultivadas *in vitro* para os genótipos estudados, exceto para *C. baccatum*, com uma área entre

6,98 a 9,10 cm² (Figura 6.C). Em *C. annuum*, as maiores áreas foliares foram obtidas com 10, 20 e 40 g L⁻¹ de sacarose, com 6,44, 9,10 e 8,57 cm², respectivamente (Figura 6.A). Para *C. chinense*, nas concentrações de 10, 20 e 30 g L⁻¹, as áreas foram de 4,38, 5,03 e 4,74 cm², respectivamente, sendo maiores que na ausência e na maior concentração de sacarose (40 g L⁻¹) (Figura 6.E). Os maiores resultados em *C. frutescens* foram obtidos nos meios sem sacarose e com 10 g L⁻¹, com resultados de 9,84 e 13,25 cm², assim, para esta espécie, altas concentrações de sacarose prejudicaram o aumento de área foliar (Figura 6.G).

Em relação ao número de folhas das plantas *in vitro*, houve diferença significativa apenas para *C. frutescens*, cujas plantas dos tratamentos com ausência e 10 g L⁻¹ de sacarose tinham 6,5 e 8 folhas por planta, respectivamente (Figuras 6.B, D, F e H). Verifica-se que a redução da sacarose assim como sua ausência proporcionaram, em *C. frutescens*, as maiores áreas foliares e maior número de folhas. A redução de carboidrato no meio de cultura pode estimular a fotossíntese. Assim sendo, as plantas de *C. frutescens* provavelmente formaram maior quantidade de folhas e aumentaram a área foliar para aumentar as atividades fotossintéticas (Kozai et al., 1991; Calvete et al., 2002; George, 2008).

De forma geral, observa-se que, para número de folhas e área foliar em *Capsicum* ao final do cultivo *in vitro*, o tratamento com ausência de sacarose não diferiu dos demais, não causando alterações fisiológicas. Esperava-se que o crescimento dos órgãos da plântula ficasse comprometido com a ausência de carboidratos, uma vez que, em condições *in vitro*, a planta se apresenta heterotrófica (McCown, 1998). Contudo, à medida que se aumentou a concentração de sacarose no meio de cultivo, as plântulas atingiram um maior crescimento, principalmente do sistema radicular, enquanto na ausência de sacarose, houve baixa formação de raízes (Figuras 3, 4 e 6).

Na aclimatização, apenas a área foliar de *C. baccatum* não apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 7.C). Para *C. annuum*, os melhores resultados foram com 10 e 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7.A). Para *C. frutescens*, destacaram-se os tratamentos com 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7.G). Já para *C. chinense*, o tratamento com 30 g L⁻¹ teve o resultado com a menor área foliar, os demais não diferiram entre si (Figura 7.E). Na aclimatização, o número de folhas não apresentou diferença estatística para *C. annuum*, *C. baccatum* e *C.*

chinense. Já para *C. frutescens*, o maior número de folhas foi obtido com 10 g L⁻¹ de sacarose, 38,2 folhas (Figuras 7.B, D, F e H).

O aumento da concentração da sacarose causou perda de vigor, principalmente em *C. frutescens* durante o cultivo *in vitro*. Muitos autores têm demonstrado que o cultivo de plantas sob altas concentrações de sacarose, em torno de 20 a 30 g L⁻¹, geram acúmulo de açúcares solúveis na folha, que ocasiona inibição da síntese de Rubisco e clorofila, impedindo também a regeneração do substrato ribulose bifosfatoRuBP pela deficiência em fosfato inorgânico no estroma do cloroplastídeo, reduzindo, conseqüentemente, as taxas fotossintéticas (Capellades et al., 1991; Chenevard et al., 1997; Kanechi et al., 1998; Adelberg et al., 1999; Jackson, 1999).

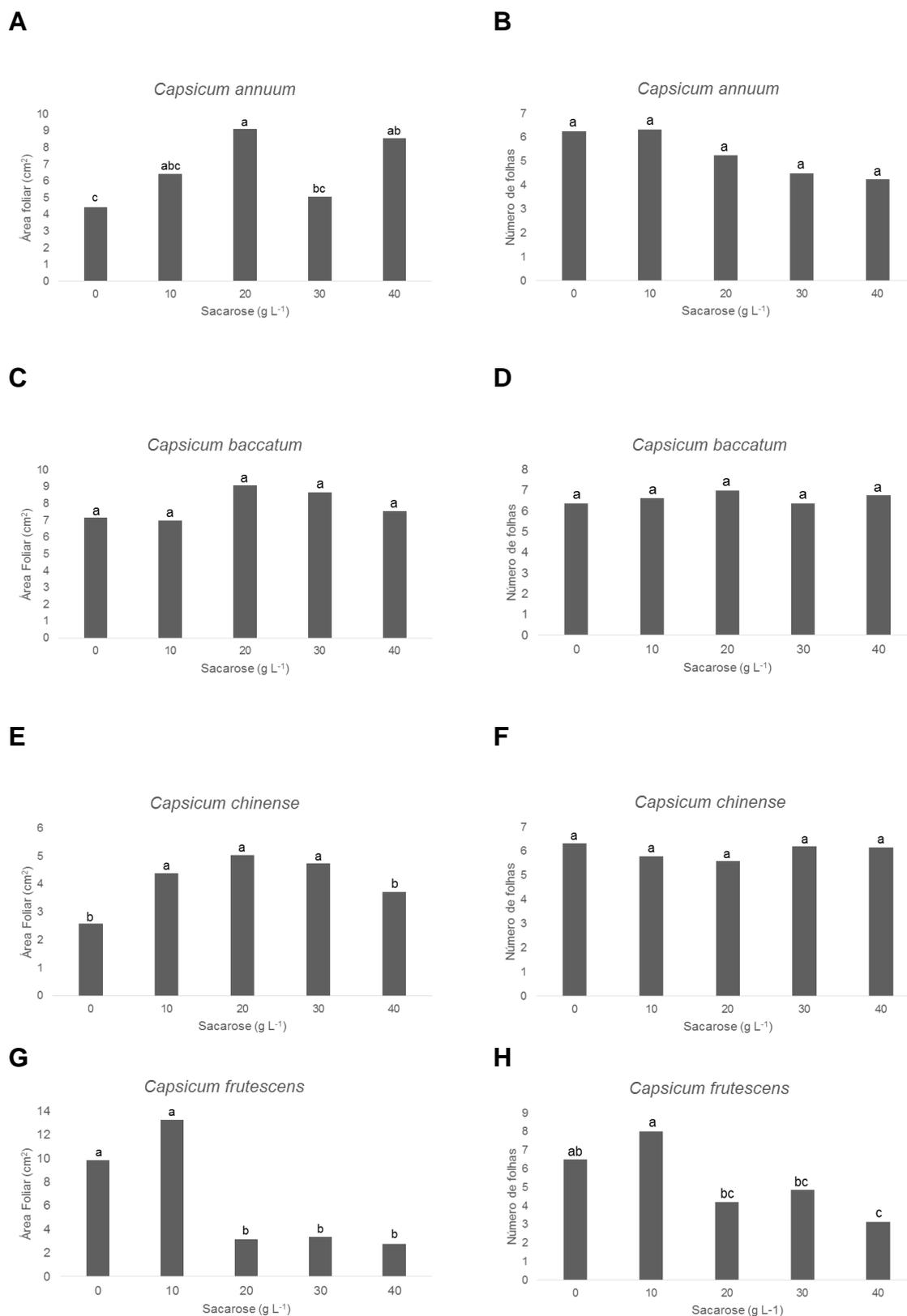


Figura 6. Área foliar e Número de folhas de *Capsicum* ao final do cultivo *in vitro* de: (A-B) *C. annuum*, (C-D) *C. baccatum*, (E-F) *C. chinense* e (G-H) *C. frutescens*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

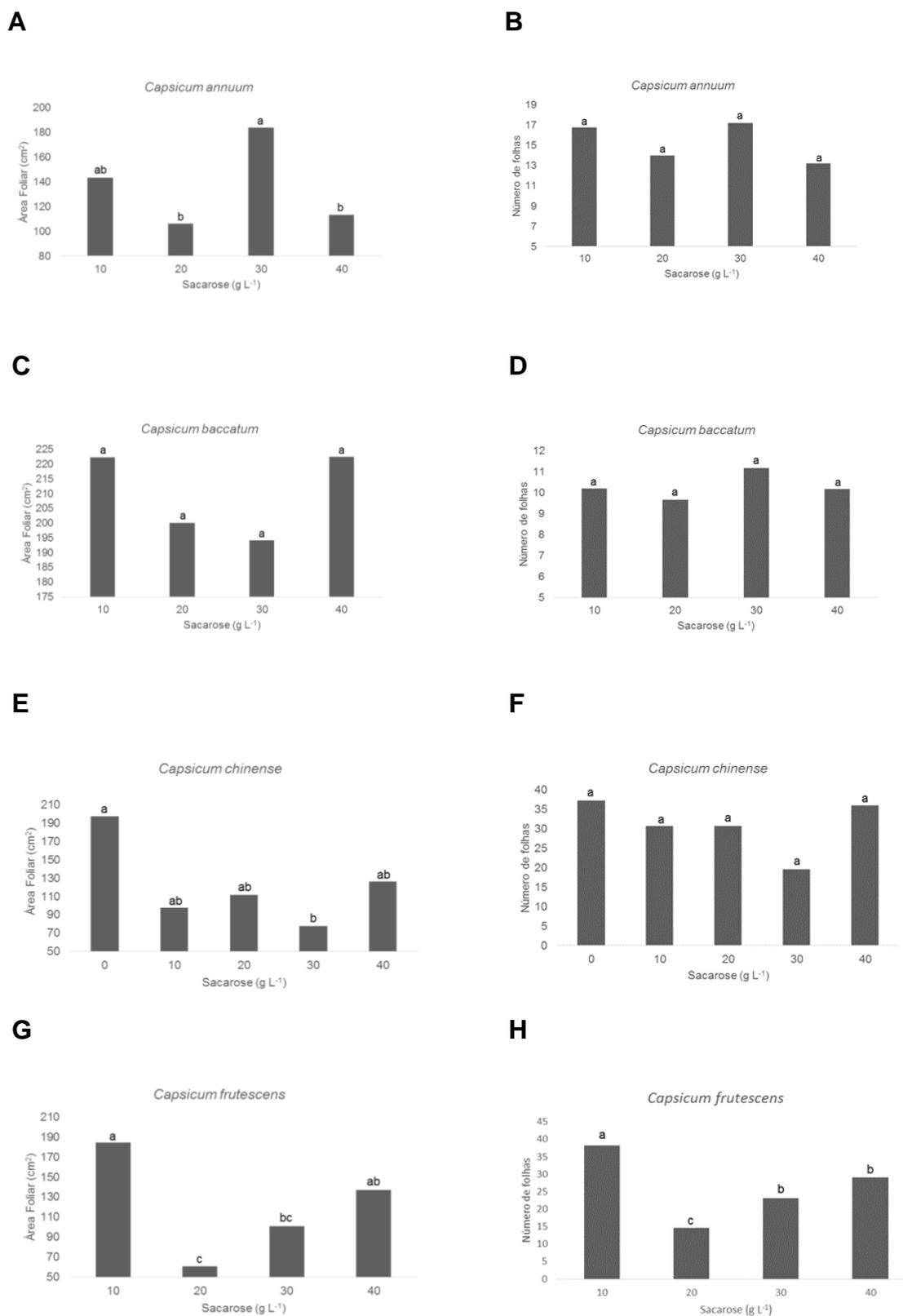


Figura 7. Área foliar e Número de folhas de *Capsicum* ao final da aclimatização de: (A-B) *C. annuum*, (C-D) *C. baccatum*, (E-F) *C. chinense* e (G-H) *C. frutescens*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

Na presente pesquisa, para *C. baccatum*, os tratamentos com ausência, 20, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram as maiores intensidades de verde no cultivo *in vitro*. Segundo Torres Netto et al. (2002), valores elevados indicam uma ótima disponibilidade de N no tecido foliar assim como excelente quantidade de pigmentos fotossintéticos (Figura 8.A). Já para *C. frutescens*, não houve diferença significativa entre os tratamentos para a avaliação de cor verde das folhas, isto pode indicar não ter ocorrido ganho no conteúdo de clorofila total com o uso de concentrações distintas de sacarose mostrada pelo índice de SPAD (Figura 8.B).

Com base nos dados de fluorescência da clorofila *a*, o rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m) nas duas espécies no cultivo *in vitro* apresentou médias entre 0,75 e 0,85, indicando que o fotossistema II estava em adequado funcionamento, independentemente da concentração de sacarose, uma vez que não houve diferença estatística entre as espécies (Figuras 8.C e 8.D). Segundo Ferreira (2014), a fluorescência é usada como indicador de estresse, quando fatores bióticos ou abióticos alteram a funcionalidade do fotossistema II (FSII).

O índice fotossintético (PI) para as duas espécies obteve resultados distintos da relação F_v/F_m . As plantas de *C. frutescens* cultivadas com 20 g L⁻¹ de sacarose *in vitro* apresentaram o maior índice fotossintético na aclimatização; para *C. baccatum*, isto ocorreu nos tratamentos de 20 a 40 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 8.E e 8.F). O índice fotossintético (PI) foi proposto por Strasser et al. (2000) e, na maioria dos estresses abióticos e em diferentes culturas, tem sido considerado uma variável mais sensível que o F_v/F_m (Jiang et al., 2006; Christen et al., 2007). Enquanto a relação F_v/F_m reflete a máxima capacidade fotoquímica e se relaciona com o número de complexos PSII ativos (Schreiber et al., 1986), a variável PI mostra a atividade do fotossistema I e II, tendo sido útil, na presente pesquisa, para detectar, de forma mais refinada, alterações no desempenho das plantas de *Capsicum* sob condições de estresse, que não causaram modificações na relação F_v/F_m (Strasser et al., 2004; Stirbet e Govindjee, 2011).

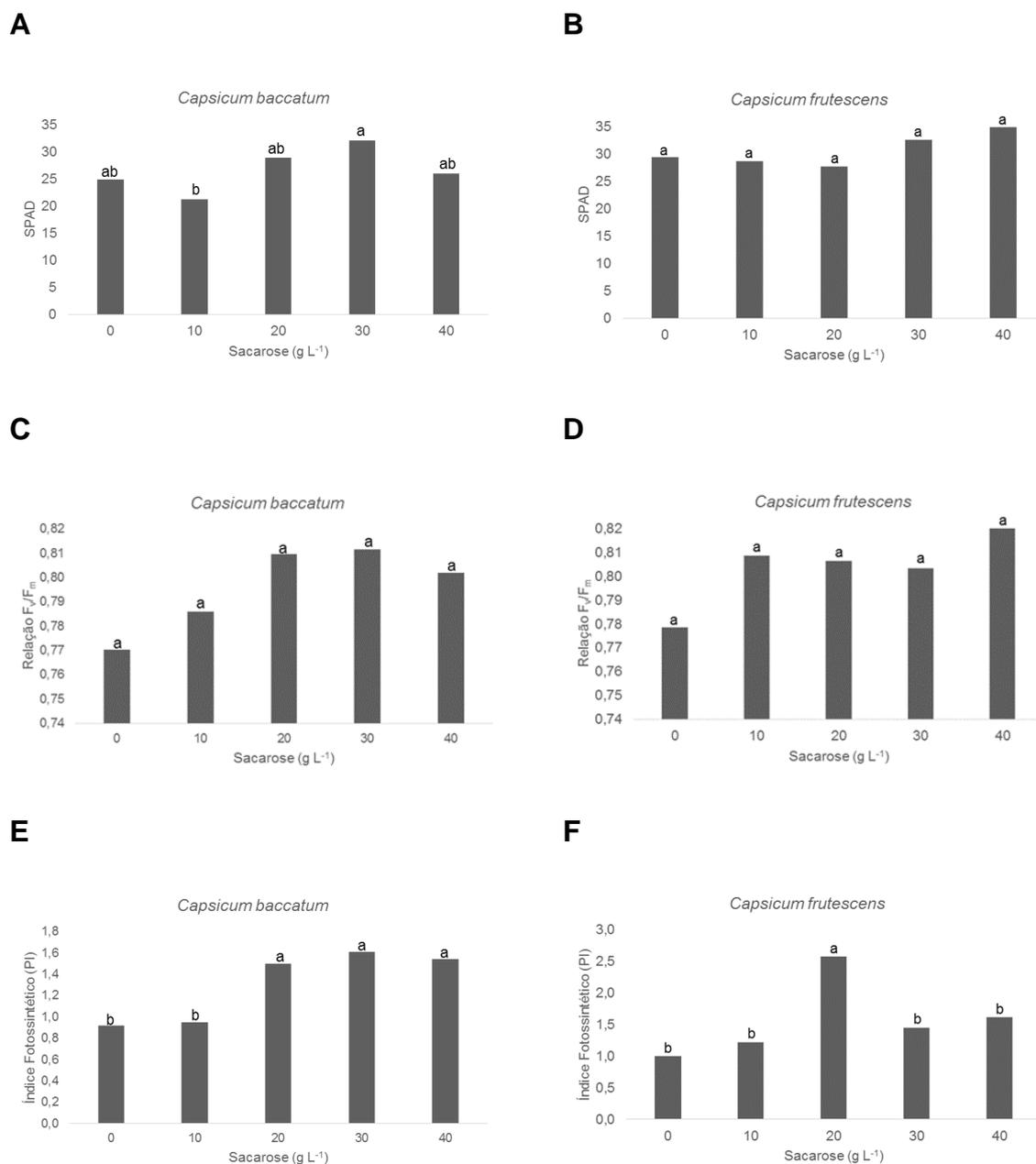


Figura 8. Índice SPAD (A) *Capsicum baccatum* e (B) *C. frutescens*. Relação F_v/F_m (C) *C. baccatum* e (D) *C. frutescens*. Índice fotossintético (PI) (E) *C. baccatum* e (F) *C. frutescens* ao final do cultivo *in vitro*. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, (p<0,05).

Em relação ao volume radicular das plantas aclimatizadas, apenas para *C. frutescens* observou-se diferença significativa, sendo que os tratamentos de 10 e 40 g L⁻¹ de sacarose com os maiores volumes não diferiram entre si, com 4,4 e 4,19 cm³, respectivamente, destacando-se a concentração de 10 g L⁻¹ por ser a mais baixa e assim diminuir os gastos (Figura 9).

O meio de cultura sem sacarose proporcionou crescimento de plantas de *Capsicum in vitro* não causando alterações fisiológicas nem morfológicas. O crescimento fotoautotrófico (sem açúcar) pode apresentar várias vantagens para a planta *in vitro*, como aumento do crescimento, redução do risco de contaminação microbiana, melhoria das características fisiológicas, redução do estresse durante a aclimatização, redução dos custos com reparos e manutenção (Erig e Schuch, 2005).

De forma geral, as diferentes concentrações de sacarose durante o cultivo *in vitro* de embriões maduros não interferiram na aclimatização de plantas do gênero *Capsicum*, verificando-se que as plantas tinham características muito semelhantes em todos os tratamentos. Embora tenha ocorrido crescimento de plântulas *in vitro* na ausência de sacarose, durante a aclimatização, estas plantas não sobreviveram. O baixo acúmulo de carboidratos na fase *in vitro* pode ser um dos fatores responsáveis por esta alta mortalidade.

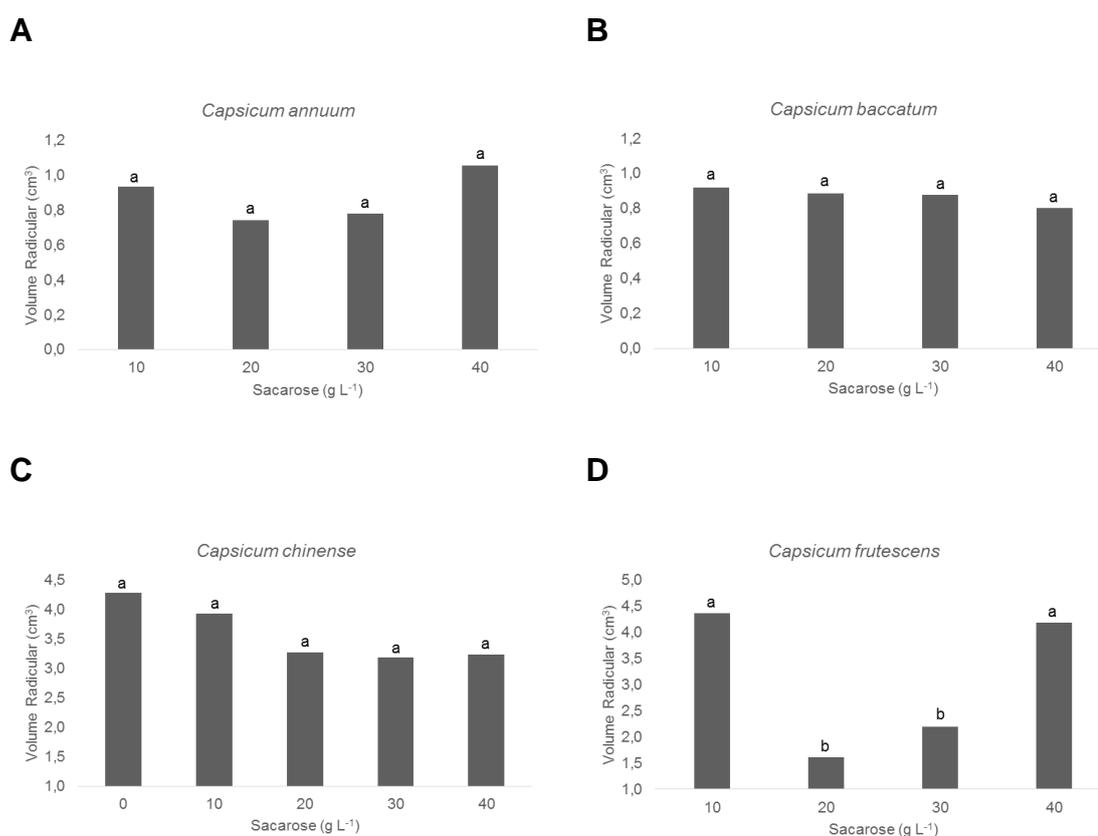


Figura 9. Volume radicular de plantas de (A) *C. annuum*, (B) *C. baccatum*, (C) *C. chinense* e (D) *C. frutescens* ao final da aclimatização. Letras minúsculas comparam todos os tratamentos dentro de cada espécie e diferem significativamente pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

5.5. Eficiência do cultivo de embriões maduros

Quando comparada a taxa germinativa de embriões maduros isolados e de sementes intactas, verifica-se que a técnica de resgate de embriões em *Capsicum* é uma ferramenta viável. Os embriões isolados apresentaram uma taxa germinativa para *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* de 89, 98, 89 e 99%, respectivamente, enquanto nas sementes intactas, houve germinação de apenas 61, 68, 11 e 22%, respectivamente, para as quatro espécies acima (Tabela 8).

A comparação da germinação de embriões isolados maduros e de sementes intactas no gênero *Capsicum* ainda não foi registrada na literatura, sendo reportada pela primeira vez na presente pesquisa, sendo indicado o cultivo de embriões maduros, pois se mostraram eficientes e mais viáveis para a germinação *in vitro* do que sementes intactas.

Tabela 8. Comparação da eficiência na germinação de embriões isolados e sementes intactas de quatro espécies de *Capsicum* cultivadas em meio de cultura com ausência de sacarose. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Explantos	Germinação (%)			
	<i>C. annuum</i>	<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
Embrião isolado	89 a	98 a	89 a	99 a
Semente intacta	61 b	68 b	11 b	22 b
C.V. (%)	21,90	12,44	21,77	20,80

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

O meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS com $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA e 40 g L^{-1} de sacarose para os genótipos estudados proporcionou maior taxa de germinação dos embriões globulares e cordiformes. Para embriões torpedo e cotiledonares, os meios de cultura mais indicados para a germinação foram $\frac{1}{2}$ MS com $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA e 20 g L^{-1} de sacarose, ou sem fitorreguladores.

A sacarose não é necessária para a germinação de embriões maduros das quatro espécies de *Capsicum* estudadas, porém é indispensável para o crescimento *in vitro* das plântulas.

As concentrações de sacarose que proporcionaram maior crescimento *in vitro* e durante a aclimatização para *C. annuum* foram de 30 g L^{-1} ; para *C. baccatum*, de 20 g L^{-1} ; e para *C. frutescens*, de 10 g L^{-1} . Para *C. chinense*, durante a aclimatização, o maior crescimento ocorreu nas plantas oriundas do meio sem sacarose, porém a taxa de sobrevivência foi de 16,67%. Assim sendo, para esta espécie, o uso de 20 g L^{-1} de sacarose é o mais recomendado.

A germinação *in vitro* de embriões maduros isolados é mais eficiente que a germinação de sementes intactas de *Capsicum*.

Os resultados deste trabalho são úteis para geneticistas e melhoristas interessados em aplicar a técnica de germinação de embriões isolados em *Capsicum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acebedo, M. M., Lavee, S., Liñán, J., Troncoso, A. (1997) *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69(3-4): 207–215.
- Adelberg, J., Fujiwara, K., Kirdmanee, C., Kozai, T. (1999) Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57(2): 95–104.
- Azevedo, C. P., Café Filho, A. C., Henz, G. P., Reis, A. (2006) Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas. Embrapa Hortaliças, 1: 4.
- Bapa Rao, N., Sri Valli, T., Lakshmi, N. (1992) Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L, *C. frutescens* L. and its progeny. *Euphytica*, 59: 135-140.
- Barbieri, R. L., Neitzke, R. S. (2008) Pimentas do gênero *Capsicum* – cor, fogo e sabor. In: Barbieri, R. L., Stumpf, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 727-745.
- Benson, E. E. (2000) Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36(3): 163–170.

- Bento, C. S., Sudre, C. P., Rodrigues, R., Riva, E. M., Pereira, M. G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, 8(2): 149–156.
- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. (1996) *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Developments in Crop Science. Elsevier, Amsterdam
- Bianchetti, L. B., Carvalho, S. I. C. (2005) Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanaceas). In: Walter, B. M. T., Cavalcanti, T. B. Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal: teoria e prática. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 355-385.
- Blat, S. F., Braz, L. T., Arruda, A. D. S. (2007) Avaliação de híbridos duplos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, 25(3): 350–354.
- Bolhàr-Nordenkamph, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E. G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3 (4): 497-514.
- Borém, A., Miranda, G. V. (2013) *Melhoramento de Plantas*. 6. ed. Viçosa: Editora UFV, 523p.
- Bosland, P. W. (1993) Breeding for quality *Capsicum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 12: 25-31.
- Bosland, P. W. (1996) *Capsicum: Innovative uses of an ancient crop*. Arlington, VA: ASHS Press, p. 479-487.
- Bosland, P. W., Votava, E. J. (2000) *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p
- Caldas, L. S., Haridasam, P., Ferreira, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa/ CNPH, p. 87-132.

- Calvete, E. O., Azevedo, M., Bordignon, M. H., Suzin, M. (2002) Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Horticultura Brasileira*, 20(4,): 649–653.
- Campos, K. P. (2006). *Obtenção, caracterização molecular, morfológica e reprodutiva de híbridos entre espécies de capsicum*. Tese (Doutorado em Produção Gevetal), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 145p.
- Capellades, M., Lemeur, R., Debergh, P. (1991) Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25(1): 21–26., 1991.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild Capsicums: identification and *in situ* analysis of Brazilian species. *XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of Capsicum and Eggplant*. Torino, Italy. P. 205-213.
- Carvalho, S. I. C.; Bianchetti, L. B.; Bustamante, P. G.; Silva, D. B. (2003) *Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (Capsicum spp.) da Embrapa Hortaliças*. Brasília, 38 DF: Embrapa Hortaliças. 49p.
- Castro, F.A.; Campostrini, E.; Torres Netto, A.T.; Viana, L.H. (2011) Relationship between photochemical efficiency (JIP-Test Parameters) and portable chlorophyll meter readings in papaya plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23 (4):295- 304.
- Chen, L.Z., Adachi, T., (1996). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo rescue and *in vitro* propagation. *Plant Breed*, 115: 251–256.
- Chenevard, D., Frossard, J.-S., Jay-Allemand, C. (1997) Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23 X *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. *Scientia Horticulturae*, 68(1-4): 207–217.
- Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Défago, G. (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress

responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3): 504–514.

Crespo, L. E. D. C. (2007) *Ambientes que favorecem condições heterotróficas e mixotróficas : um estudo relacionado à fotossíntese , à eficiência fotoquímica e às eelações hídricas*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 49p.

Davey, M. R., Anthony, P. (2010) *Plant cell culture: essential methods*. Print Media. 341p.

De Riek, J., Piqueras, A., Debergh, P. C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47(3): 269–278.

EMBRAPA, (2012). Hortaliças em número. Produção de hortaliças no Brasil: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/producao_hortalicas_brasil_2000_2011.pdf em: 05/11/2014.

Erig, A. C., Schuch, M. W. (2005) Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, 35(4): 961–965.

Eshbaugh, W. H. (1993) Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. *In*: Janick, J., Simon, J.E. (eds.), *New Crops*. Wiley, New York, USA, p. 132–139.

FAOSTAT, (2011). *Agriculture Data*. FAO, Rome, Italy. Available at <http://faostat.fao.org> em: 01.11.14.

Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.

Ferreira, L. S. (2014) *Cultivo in vitro de orquídeas em dois ambientes (sala de crescimento e casa de vegetação): crescimento e capacidade fotossintética*, Tese (mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 69p.

- Finger, F. L., Rêgo, E. R., Segatto, F. B., Nascimento, N. F. F., Rêgo, M. M. (2012) Produção e potencial de mercado para pimenta ornamental. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 33(267): 14-20.
- Fischer, C., Neuhaus, G. (1995) *In vitro* development of globular zygotic wheat embryos. *Plant Cell Reports*, 15(3-4): 186–91.
- George E. F. (1993) *Plant propagation by tissue culture: part 1 – The technology*. 2 ed. Edington, Exegetics Limited, 574p.
- George, E. F. (2008) *Plant tissue culture procedure - Background*. In: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. *Plant propagation by tissue culture*. 3 ed. Netherlands: Springer; cap1, 1: 1-28.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156(1-2): 1–13.
- Hannig, E. E. (1904) Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. *Botanic Ztg*, Botanische Zeitung., 62: 45–80.
- Haslam, T. M., Yeung, E. C. (2011) Zygotic embryo culture: an overview. In: Thorpe, T. A., Yeung, E. C. (Eds.), *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols*. Humana Press, New York, 17: 3–15.
- Henz, G. P., Ribeiro, C. S. C. (2008) Mercado e comercialização. In: Ribeiro, C. S. C., Carvalho, S. I. C., Henz, G. P., Reifschneider, F. J. B. *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 15-24.
- Henz, G. P; Costa, C. S. R. (2005) Caderno Técnico: Como produzir pimenta. *Revista Cultivar Hortaliças e Frutas*. 33: 2-7.
- Hossain, A., Minami, M., Nemoto, K. (2003) Immature Embryo Culture and Interspecific Hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. futescens* L. via Embryo Rescue. *Jpn. J. Trop. Agr.*, 47(1): 9–16.
- Jackson, S. D. (1999) Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*, 119: 1–8.

- Jansky, S. (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125: 1–12.
- Jiang, C.-D., Shi, L., Gao, H.-Y., Schansker, G., Toth, S. Z., Strasser, R. J. (2006) Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll *a* fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44(3): 454–463.
- Kanechi, M., Ochi, M., Abe, M., Inagaki, N., Maekawa, S. (1998) The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. *Journal Of America Society. For Horticultural Science.*, 123(2): 176–181.
- Kapila, R. K., Sethi, G. S. (1993) Genotype and age effect on *in vitro* embryo rescue of bread wheat x hexaploid triticales hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(3): 287–291.
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N. (2010) Chilli peppers - a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology advances*, 28(1): 35–48.
- Kott, L. S., Kasha, K. J. (1985) Embryo culture and haploid plant production. In: Bright, S. W. J., Jones, M. G. K. (Eds.), *Cereal Tissue and Cell Culture*. Springer, Dordrecht, p. 45–78.
- Kozai, T., Ohde, N., Kubota, C. (1991) Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24(3): 181–186.
- Lannes, S. D., Finger, F. L., Schuelter, D. R., Casali, V. W. D. (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae*, 112: 266-270.
- Leng, P., Yamamura, H. (2006) Fruit set and embryo rescue in crosses using parthenocarpic 'Mopanshi' persimmon. *Scientia Horticulturae*, 107: 332–336.

- LI-COR. LI-3100. (1996) *Area meter instruction manual*. Lincoln, 34 p.
- Lima, M. L.Melo Filho, P. A; Café Filho, A. (2001) Susceptibilidade de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) a infestação de ácaros fitófagos em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 19, suplemento CD-ROM.
- Lotfi, M., Alan, A. R., Henning, M. J., Jahn, M. M., Earle, E. D. (2003) Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Reports*, 21(11): 1121–8.
- Loyola-Vargas, V. M., Vázquez-Flota, F. (2006) An introduction to plant cell culture. In: Loyola-Vargas, V. M., Vázquez-Flota, F. (eds) *Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols*. 2 ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc. p. 3-8.
- Manzur, J. P., Oliva-Alarcón, M., Rodríguez-Burruezo, A. (2014) *In vitro* germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 170: 203–210.
- Manzur, J. P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo, (2013) A. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161: 181–187.
- Martins, K. C., Souza, S. A. M., Pereira, T. N. S., Rodrigues, R., Pereira, M. G., Cunha, M. (2013) Palynological characterization and genetic divergence between accessions of chilli and sweet peppers. *Horticultura Brasileira*, 31(4): 568–573.
- McCown, B. H. (1998) Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: Davis, T., Haissig, B. E., Sankla, N. (Ed.). *Adventitious root formation in cuttings*. v. 2. Portland–Oregon: Dioscorides, p. 289-299.
- Monnier, M. (1995) Culture of zygotic embryos. In: Thorpe, T. A. (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 117–153.

- Moreira G. R., Caliman F. R. B., Silva D. J. H., Ribeiro C. S. C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, 27: 16-29.
- Moreira, B. M. T., Tomba, E. C., Zonetti, P. C. (2007) Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* lindl var *venosa* x *Cattleya warneri* T . Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. *Sabios: Revista Saúde e Biologia*, 2(2): 16–21.
- Moscone, E. A., Scaldaferrro, M. A., Grabiele, M., Cecchini, N. M., García, Y. S., Jarret, R., Daviña, J. R., Ducasse, D. A., Barboza, G. E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. *Acta Horticulturae*, 745: 137-169.
- Murashige, T., Skoog, F. A. (1962) Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
- Nicoloso, F. T., Erig, A. C., Russowski, D., Martins, C. F. (2003) Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27(1): 84–90.
- Ohara, R., Pinto, C. M. F. (2012) Mercado de pimentas processadas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 33(267): 7-13.
- Peçanha, A.L. (2010). *Metabolismo fotossintético, crescimento e estado nutricional do mamoeiro (Carica papaya L.) em resposta a condutividade elétrica da solução de cultivo*. Tese de Doutorado – (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 131p.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T.; Gupta, P. K. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, part B. Elsevier, Amsterdam, p. 139-160.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96(1): 129–133.

- Pinheiro, C. S. R., Medeiros, D. N., Macêdo, C. E. C. Alloufa, M. A. I. (2001) Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* gomez) em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2): 413–416.
- Pozzobon, M. T., Schifino-Wittmann, M. T., Bianchetti, L. B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x = 12$ and $x = 13$ represent two evolutionary lines? *Botanical Journal Linnean Society*, 151: 259-269.
- Prestes, A. M., Goulart, L. R. (1995) Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *RAPP*, 3: 315-363.
- Rappaport, J. (1954) *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. *The Botanical Review*, 20(4): 201–225.
- Regent Instruments Inc. (2001) *Programa WinRhizo versão 2002a*. Québec.
- Rêgo, E. R., Rêgo, M. M., Cruz, C. D., Cecon, P. R., Amaral, D. S. S. L., Finger, F. L. (2003) Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 3(1): 19–26.
- Reis, E. S., Pinto, J. E. B. P., Silva Rosado, L. D., Monteiro Corrêa, R. (2008) Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Ceres*, 55(3): 160–167.
- Rick, C. M., Chetelat, R. T. (1995) Utilization of related wild species for tomato improvement. *Acta Horticulturae*, 412: 21–38.
- Rufino, J. L. S., Pentead, D. C. S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário*, 27(235): 7–15.
- Santos, E. K. 2003. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. *In*: Freitas, L. B., Bered, F. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS. p. 415-444.

- Schmildt, O. (2010) *Cultivo in vitro e estaquia dos mamoeiros 'Golden' e 'Uenf/Caliman 01'™* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 119p.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis research*, 10(1-2): 51–62.
- Sharma, D. R., Kaur, R., Kumar, K. (1996) Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica*, 89(3): 325–337.
- Skrebsky, E. C., Nicoloso, F. T., Ferrão, G. D. E. (2004) Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural*, 34(5): 1471–1477.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F. (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3): 274–9.
- Stancato, G. C., Tucci, M. L. S. (2010) Monitoring the end of the *in vitro* phase of *Anthurium andreanum* Lindl. plantlets. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(1): 61–68.
- Stirbet, A., Govindjee. (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of photochemistry and photobiology B*, 104(1-2): 236–57.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. *In*: Papageorgiou, G., Govindjee (Eds.), *Advances in photosynthesis and respiration: Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 19: 321–362.
- Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In*:

- Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, p 445-483.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013) Fotossíntese: Reação de Carboxilação. Translocação do floema. *In: Taiz, L., Zeiger, E. Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p.
- Tamaki, M., Urasaki, N., Nakamura, I., Motomura, K., Adaniya, S. (2011) Shortening the breeding cycle of papaya (*Carica papaya* L.) by culturing embryos treated with ethrel. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2): 225–233.
- Tang, F., Wang, H., Chen, S., Chen, F., Zhaolei, L., Weimin, F. (2011) Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. *Scientia Horticulturae*, 132: 1–6.
- Tanksley, S. D. (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. *HortScience*, 19(4): 580-582.
- Tong, N., Bosland, P. W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109(2): 71–77.
- Torres Netto, A. (2005) *Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (Carica papaya L.) na fase juvenil*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes/RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 116p.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J. G., Yamanishi, O. K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(3): 203–210.
- Viñals, F. N., Ortega, R. G., GARCIA, J. C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Walter, R., Pereira, L. S., Carvalho, V. S., Rodrigues, R. (2013) *Resgate de embriões maduros in vitro de pimentão (Capsicum annuum L.)*. XIX

Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas, Recife-PE. Yamamoto, S., Nawata, E. (2005) *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. *Economic Botany*, 59(1): 18–28.

Yoon, J. B., Yang, D. C., Do, J. W., Park, H. G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56(1): 31–38.