RENATO INNECCO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PIMENTÃO **Capsicum annuum** L. ATRAVÉS DE METODOS "IN VITRO" E ESTACAS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração, Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1993

RENATO INNECCO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PIMENTÃO **Capsicum annuum** L. ATRAVÉS DE METODOS "IN VITRO" E ESTACAS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração, Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1993

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PIMENTÃO *Capsicum annuum* L. ATRAVES DE METODOS "IN VITRO" E ESTACAS

APROVADA: 18 de fevereiro de 1993

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, PhD
Orientador

Prof. Wilson Roberto Maluf, PhD

Prof. César Augusto Brasil Pereira Pinto, PhD

A minha esposa e meus filhos

Yone Maria D.R. Innecco

Fernando R. Innecco

Roberta R. Innecco

Henrique R. Innecco

OFEREÇO

A minha mãe, Neide S. Innecco e à memória

de meu pai Roberto Innecco

Ao meu grande amigo Severino José Catella

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

A minha esposa e meus filhos pelo carinho e apoio que me dedicaram durante o curso.

Ao meu orientador José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela amizade orientação e valioso incentivo transmitido a mim durante meu curso.

Aos meus colegas pelo incentivo e amizade dedicados a mim durante o curso.

Ao colega e amigo Márcio Henrique Pereira Barbosa, que juntamente com sua esposa me auxiliaram na confecção desta tese.

A Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) através de seus departamentos, professores e funcionários pela atenção e auxílio prestados a mim.

A CAPES pela bolsa de estudos.

Aos laboratoristas Evaldo de Souza Anrantes e Vantuil Antônio Rodrigues pela grande colaboração durante as pesquisas.

A todos que direta ou indiretamente contribuiram para realização deste trabalho.

VITA

O autor nasceu em 18 de junho de 1959 em Belo Horizonte, filho de Roberto Innecco e Neide Soares Innecco. Fez o primeiro e segundo graus em Belo Horizonte e graduou-se como Engenheiro Agrônomo na ESAL, em dezembro de 1982. É casado com Yone Maria Dias reis Innecco, tem 3 filhos, Fernando, Roberta e Henrique. O autor trabalhou em vários locais do Brasl. Se inscreveu na ESAL para o curso de mestrado e foi aceito para início em outubro de 1991 no Departamento de Agricultura. Após 1 ano e 5 meses estará terminando o seu mestrado. Com o desejo de maior conhecimento, pretendendo estudar um pouco mais, inscreveu-se em outubro de 1992 e já foi aceito para iniciar o doutorado em março de 1993.

SUMÁRIO

Página

Página

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
KNO_3	Nitrato de potássio
KNOP	Solução nutritiva (HEWITT, 1952)
M.S.	Meio de cultura (MURASHIGE & SKOOG, 1962)
PEG	Polietilenoglicol
PLANTIMAX	Substratos orgânicos e minerais suplementados com macro e micro nutrientes.
PROMIX-32	Substratos organicos e minerais suplementados com macro e micro nutrientes.
ROOTONE	0,067% 1 naftaleno acetamida; 0,033% ácido-2-metil-1-naftaleno acético; 0,057% 2-metil-1-naftaleno acetamida; ácido-1-4-indolbutírico 4% de thiran e 95,83% de material inerte.
TZD	Tidiazuron

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

O pimentão e as pimentas, planta da família das solanáceas e do gênero *Capsicum*, tem sua origem na América Central e México. Se tem notícia, através de estudos arqueológicos, de sua domesticação desde 1700 a.C.. A espécie mais cultivada é a *Capsicum annuum* L. que hoje está difundida por todo mundo. É uma planta de clima tropical ou subtropical cujo crescimento e desenvolvimento é afetado por alterações climáticas: o frio retarda o crescimento e o calor em excesso causa abortamento e queda de flores.

Os frutos do pimentão, são consumidos na forma imatura ou madura podendo ainda ser utilizados na indústria alimentícia ou na produção de pigmentos (corantes).

Na Índia, México e Turquia são utilizados na alimentação básica. No Brasil, apresenta-se como uma das dez mais importantes hortaliças do mercado hortigranjeiro. Destacam-se como maiores produtores os estados do Rio de Janeiro e São Paulo.

A espécie *Capsicum annuum* é predominantemente

autógama, mas possui uma taxa de polinização cruzada (alogamia), que pode atingir até 36% e por isso, é considerado uma planta do grupo intermediário.

MIRANDA (1987), constatou, em híbridos F_1 entre cultivares não aparentadas, heterose para produtividade, precocidade e para média de peso de fruto, concluindo assim, que os híbridos F_1 de pimentão podem ser explorados economicamente. A produção de sementes F_1, em pimentão, possui alguns fatores que a dificultam: a emasculação das flores do parental feminino é feita manualmente bem como, a polinização feita em seguida; flores assim polinizadas em geral necessitam ser marcadas (com um segmento de fio de lã ou similar) e os frutos colhidos separadamente dos eventuais frutos de polinização aberta. Todo esse processo gera a necessidade de mão-de-obra especializada.

Como uma alternativa para minimizar estas dificuldades o uso da macho esterilidade é de grande valia. No gênero *Capsicum* a macho esterilidade é do tipo genético nuclear, determinada por um alelo recessivo (msms). Este tipo de macho esterilidade provoca algumas dificuldades de aplicação na produção comercial de híbridos F_1, pois o macho estéril só pode ser mantido sexuadamente através do cruzamento com sua contrapartida fértil heterozigota o que resulta em apenas 50% de plantas macho estéreis. Outro agravante é que nesta cultura não se tem genes marcadores de sementes ou de "seedlings" para identificar a macho esterilidade provocando assim, a

necessidade do exame a nível de campo em cada uma das plantas, efetuando-se a eliminação de 50% delas que seriam férteis. A identificação da macho esterilidade só pode ser feita com o surgimento das primeiras flores onde, se identifica o macho esteril através da ausência de pólen. Essas dificuldades acabam por limitar o uso deste processo de obtenção de híbridos F_1, e de fato, a maioria dos híbridos comercializados no mundo não utiliza o processo de macho esterilidade na sua obtenção.

Apesar destas dificuldades, os híbridos F_1 de pimentão já são uma realidade no mercado, apesar do elevado preço das sementes, em virtude da uniformidade e produtividade em geral associados aos híbridos F_1.

Com intuito de otimizar ainda mais a produção comercial de sementes F_1, seria importante, o desenvolvimento de técnicas alternativas para propagação vegetativa das linhas macho estéreis o que permitira obter lotes de plantas 100% macho estéreis, dispensando o "rouguing" e viabilizando a utilização da macho esterilidade nesta produção de sementes híbridas.

Uma das opções para propagação vegetativa é a micropropagação através da cultura de tecidos onde o sucesso demanda vencer algumas etapas:

a) determinação do tipo de explante e estabelecimento dos explantes primários em meio de cultura.

b) adequação do meio ótimo de cultivo bem como as condições para se obter altas taxas de multiplicação.

c) indução de raizes, crescimento e aclimatação dos propágulos e após, a transferência para o solo.

A eficiência do processo de propagação vegetativa pode aumentar também com o estabelecimento das técnicas de propagação vegetativa "in vivo" (estaquia), que possam aumentar a taxa de multiplicação das plantas oriundas da micropropagação "in vitro".

Este trabalho teve como objetivo identificar técnicas "in vitro" e "in vivo" da propagação vegetativa de pimentão, com finalidade última de viabilizar a manutenção de clones macho estéreis utilizados na produção de sementes híbridas nesta cultura.

CAPÍTULO II

PRÉ-TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO PARA UNIFORMIDADE DA GERMINAÇÃO "IN VITRO"

1.1. BIBLIOGRAFIA

01. MIRANDA, J.E.C. de. **Análise genética de um cruzamento dialélico em pimentão** (*Capsicum annuum* L). Piracicaba, ESALQ, 1987. 159p (Tese de Doutorado).

CAPÍTULO II - PRÉ-TRATAMENTO DE SEMENTES DE PIMENTÃO PARA UNIFORMIDADE DA GERMINAÇÃO "IN VITRO"

RESUMO - Utilizando sementes básicas de pimentão (*Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8) foram testados quatro pré-tratamentos de sementes na tentativa de aumentar a uniformidade de germinação "in vitro". Os tratamentos foram: imersão em H_2O; AIA (40 mg/L); KNO_3 (20 mg/L) e AIA (40 mg/L) + KNO_3 (20 mg/L), todos por 20 horas e comparados com um controle (sementes não tratadas). Os quatro pré-tratamentos foram superiores ao contrôle e iguais entre si. Por ser mais barato e apresentar bons resultados indica-se a imersão em H_2O por 20 horas para se obter maior uniformidade na germinação "in vitro".

2.1. REFERENCIAL TEÓRICO

A germinação de sementes "in vitro" tem sido muito

estudada e segundo BRADFORD (1986) o pré-tratamento de sementes visando maior percentagem de germinação, melhor desenvolvimento vem sendo utilizadas em várias espécies vegetais, dos "seedlings" e sua maior uniformidade.

Em pimentão, vários pesquisadores trabalharam com pré-tratamento de sementes. A utilização do polietilenoglicol (PEG) à -0,8 MPa (HEYDECKER et alii, 1975) à 1,15 MPa (YAKLICK & ORZOLER, 1977) foi indicada para um aumento na percentagem de germinação. STOFFELLA et alii,(1992) mostraram que sementes de *C. annuum* L. cv "Early California Wonder" quando tratadas com PEG à 0,5 MPa germinavam, aproximadamente, dois dias mais cedo do que as não tratadas.

DESAI et alii, (1987), trabalhando com *C. annuum* cv Bharat observou, que a imersão das sementes por 24 horas em solução de 600 ppm de cicocel (Clormequat), testadas em condições de laboratório e campo, promoveram um bom incremento na germinação (95,33% e 84,67%, respectivamente). Também obtiveram, bons resultados, quando trataram as sementes por 24 horas, com solução de ANA a 10 ppm obtendo respectivamente 95% e 83% de germinação, respectivamente no laboratório e no campo.

Sementes não pré-tratadas, mas simplesmente desinfestadas para inoculação "in vitro", foram utilizadas em vários trabalhos. GUNAY & RAO, (1978), trabalharam com sementes de *C. annuum* L. (cvs. California Wonder e Pimento) e *C. frutecens* L. (híbrido Bharat), FARI & CZAKÓ (1981), trabalharam com sementes de *C. annuum* (T. Hatwani), AGRAWAL et alii (1989),

trabalharam com sementes de *C. annuum* L. cv. MATHANIA. Todos estes autores não fizeram nenhum pré-tratamento com as sementes, mas variaram apenas, os meios de cultura: meio M.S. (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com ágar, solução KNOP (HEWITT, 1952), em algodão e água esterelizada com utilização de pontes de papel de filtro em tubos de ensaio, respectivamente. Em nenhum destes trabalhos se fazem menção a problemas com germinação.

O pré-tratamento de sementes de pimentão, com solução de 3% e 2,75% de nitrato de potássio (KNO_3), mostrou um incremento na percentagem de germinação, (SUNDSTRON & EDWARDS,1989). Estes resultados tambem foram conseguidos por BRADFORD et alii (1990).

FARI (1987), trabalhando com sementes de *C. annuum, C. frutescens, C. baccatum, C. chinense* e *C. pubecens* determinou que a imersão das sementes por 4 a 24 horas sob agitação contínua em solução de 40 mg/L de AIA promoveu melhor germinação e também favoreceu a desinfestação posterior das sementes.

Sementes de pimentão pré-germinadas promoveram, segundo GHATE & PHATAK, (1982), "seedlings" mais vigorosos e ainda , segundo SCHULTHEIS et alii, (1988a),tambem uma maior uniformidade na emergência dos "seedlings". Segundo SCHULTHEIS et alii (1988b) sementes pré-germinadas também proporcionam antêse mais precoce e mais uniforme quando comparadas com sementes não tratadas. Já, STOFFELLA et alii (1992), não

obtiveram resposta significativa em germinação para sementes pré-germinadas mas observaram que os "seedlings" oriundos de sementes pré-germinadas eram maiores e mais vigorosos que os demais.

Para determinar o melhor meio para germinação SRIPICHITT et alii (1987) trabalhando com sementes de *C. annuum* cv. Yatsufusa testou os meios M.S. completo, M.S. com metade da concentração salina, solução KNOP e água esterelizada. Obtiveram como melhor resultado, o meio M.S. com metade da concentração salina, na fase de indução de brotações, os explantes oriundos dos "seedlings" obtidos neste meio tiveram melhores respostas quanto ao número de brotos por explante.

Como o presente trabalho tem, como material inicial para estabelecimento da cultura "in vitro", a semente, a sua germinação uniforme será uma importante etapa para o sucesso do trabalho uma vez que a idade do cotilédone pode afetar na indução de brotações.

Este trabalho teve pois como objetivo determinar uma metodologia para o pré-tratamento das sementes de pimentão, para obter uma maior percentagem e principalmente, uma maior uniformidade da germinação "in vitro".

2.2. MATERIAL E METODOS

Sementes básicas de pimentão *C. annuum* L. cv. Agronômico 8 foram usadas neste trabalho. Este "background" genetico está sendo usado no programa de melhoramento da ESAL para produção de híbridos F_1, onde entrará na forma de uma linhagem isogênica macho estéril.

As sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: água destilada, solução de AIA (40 mg/L), solução de KNO_3 (20 mg/L) e solução de AIA (40 mg/L) + KNO_3 (20 mg/L) todos por 20 horas de imersão e mantidos neste período em mesa de agitação contínua a 120 rpm aproximadamente; para controle, usaram-se sementes não tratadas, isto é, sem imersão. Após este período, as sementes pré-tratadas e o controle, foram desinfestadas em álcool a 70% por 30 segundos, posteriormente em solução de água sanitária 30%, (1,0% de hipoclorito de sódio), com 5 gotas de Tween 20 por 300 mL por 20 minutos; finalmente as sementes foram lavadas por três vezes em água bidestilada e autoclavada. Todo este trabalho de desinfestação foi feito em câmara de fluxo laminar. Paralelamente ao pré-tratamento das sementes foi preparado o meio de cultura M.S. com metade da concentração salina, pH de 5,9 antes da autoclavagem, ágar (6,5 g/L) o qual foi colocado em tubos de ensaio 25 por 150 mm com aproximadamente 15 mL por tubo. Os tubos contendo o meio de cultura e tampados com tampa plástica

foram autoclavados a 121 ± 1 °C por 20 minutos. Após desinfestação das sementes, estas foram inoculadas nos tubos, (uma semente por tubo), e colocadas no escuro para germinação. O experimento foi montado segundo o modelo de delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento e nove tubos por repetição. A avaliação foi feita ao sétimo dia tendo sido avaliada a percentagem e uniformidade de germinação.

2.3. RESULTADOS

A avaliação deste experimento foi feita ao sétimo dia, porém como o principal objetivo foi a uniformidade de germinação, foram feitas observações diárias à partir do terceiro dia. Em quase todos os tratamentos, a maioria das sementes germinaram do sexto para o sétimo dia.

Os resultados experimentais evidenciaram a necessidade de um pré-tratamento das sementes, o que se observa através dos QUADROS 1 e 2. Houve uma grande diferença entre as sementes pré-tratadas e as não tratadas quanto a rapidez e uniformidade de germinação, mas o Teste de Tukey, mostrada no QUADRO 1 mostra que não houve diferença significativa entre o uso do AIA e do KNO_3, sozinhos ou combinados e a simples embebição em agua.

QUADRO 01 - Percentagens médias de germinação por tratamento ao sétimo dia. As letras apresentadas junto aos valores representam os resultados do Teste de Tukey à nível de 1%.

Tratamentos	Germinação (%)
H_2O - 20 H	81,46 A
AIA (40 mg/L) - 20 H	72,22 AB
KNO_3 (20 mg/L) - 20 H	70,37 AB
AIA (40 mg/L) + KNO_3 (20 mg/L) - 20 H	70,37 AB
SECO (testemunha)	44,44 B

QUADRO 02 - Resumo da análise de variância para percentagens de germinação "in vitro".

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Tratamento	4	622,08 *
Resíduo	25	158,39
C.V. (%)		21,97

[1] Dados transformados para arco seno da raiz de (x + 0,5)
* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade.

2.4. DISCUSSÃO

Os resultados experimentais, confirmam o que BRADFORD (1986), relatou, isto é, que o pré-tratamento de sementes visando uma maior percentagem e maior uniformidade de germinação "in vitro", se faz necessário em várias espécies vegetais como é o caso do pimentão.

O pré-tratamento osmótico com soluções salinas, tal como (KNO_3) se mostrou melhor que as sementes não tratadas confirmando assim os trabalhos de BRADFORD et alii (1990) e SUNDSTRON & EDWARDS (1989). O pré-tratamento com AIA, também se mostrou melhor que as sementes não tratadas, confirmando as indicações feitas por FARI (1987), que indicou este tratamento para *Capsicum*, obtendo uma maior percentagem e uma melhor uniformidade da germinação. A simples embebição das sementes, também foi melhor que as sementes não tratadas e além disto, não diferiu estatisticamente dos demais pré-tratamentos testados neste experimento, obtendo-se uma boa percentagem de germinação e uma boa uniformidade. Estas últimas afirmações, nos levam a inferir, que a simples pré-embebição "per si" das sementes deve ser mais importante que o uso de algumas substâncias (reguladores de crescimento, sais) para uma melhor uniformidade de germinação em pimentão.

Uma outra observação efetuada (resultados não relatados), foi que a utilização dos pré-tratamentos, auxiliou

na desinfestação das sementes, diminuindo bastante as contaminações, o que confirma o relatado por FARI (1987).

2.5. CONCLUSÃO

Com estes resultados, à partir deste experimento passa-se a utilizar para os demais experimentos, o pré-tratamento das sementes com a embebição em água por 20 horas seguindo a metodologia descrita na seção Material e Métodos deste capítulo. Esta opção foi adotada porque este pré-tratamento não diferiu dos demais pré-tratamentos avaliados, porém é mais simples e mais barato que os outros pré-tratamentos.

2.6. BIBLIOGRAFIA

01. AGRAWAL, S., CHANDRA, N. & KOTHART, S.L. Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Mathania). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 16:47-55, 1989.

02. BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Riverside, 21:1105-12, 1986.

03. ————; STEINER, J.J. & TRAWATHA, S.E. Seed priming influence on germination and emergence of pepper seed lots. **Crop Science**, Madison, 30:718-21, 1990.

04. DESAI, V.G.P., PATIL, M.M., PATIL, U.K. & ANIARKAR, M.V. Effect of growth regulators on sweet pepper (*Capsicum annuum* var. grossum Sendt.) seed germination. **South Indian Horticulture**, Coimbratore, 35(6):451-2, 1987.

05. FARI, M. & CZAKO, M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hipocotyl explants cultured in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, 15(3):207-13, 1981.

06. GHATE, S.R. & PHATAK, S.C. Preference of tomato and pepper seed germinated before planting. **Journal American Society Horticultural Science**, Elsevier, 11:908-11, 1982.

07. GUNAY, A.L. & RAO, P.S. In vitro plant regeneration from Hipocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). **Plant Science Letters**, Limerick, 11:365-72, 1978.

08. HEYDECKER, W., HIGGINS, J. & TURNER, J.L. Invigoration of seeds. **Seeds Science Technology**, New Delhy, 3:881-8, 1975.

09. HEWITT, E. **Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition.** London, The Eastern Press, 1952. 189p.

10. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Koafnhauv, 15(3):473-97, 1962.

11. SCHULTHEIS, J.R.; CANTLIFFE, D.J.; BRYAN, H.H. & STOFFELLA, P.J. Improvement of plant establishment in bell pepper with a gel mix planting medium. **Journal of America Society Horticultural Science**, Mount, 113:546-52, 1988a.

12. SCHULTHEIS, J.R., CANTLIFFE, D.J.; BRYAN,H.H. & STOFFELLA, P.J. Planting methods to improve stand establishment, uniformity, and earliness to flower in bell pepper. **Journal of American Society Horticultural Science**, Elsevier, 113:546-52, 1988b.

13. SRIPICHITT, P.; NAWATA, E. & SHIGENAGA, S. "In vitro" shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). **Japanese Journal of Breeding**, 37(2):133-42, 1987.

14. STOFFELLA, P.J.; PAOLA, M.L.D.; PARDOSSI, A. & TOGNONI F. Seedling root morphology and shoot growth after seed priming or pregermination of bell pepper. **HortScience**, Riverside, 27(3):214-5, 1992.

15. SUNDBSTROM F.J. & EDWARDS, R.L. Pepper seed respiration, germination and seedling development following seed priming. **HortScience**, Riverside, 24:343-5, 1989.

16. YAKLICK, R.W. & ORZOLER, M.D. Effect of polyethyleneglycol -8000 on pepper seeds. **HortScience**, Riverside, 12:263-7, 1977.

CAPÍTULO III

EFEITO DE DIFERENTES EXPLANTES NA RESPOSTA MORFOGENÉTICA "IN VITRO"

CAPÍTULO III - EFEITO DE DIFERENTES EXPLANTES NA RESPOSTA MORFOGENÉTICA "IN VITRO"

RESUMO - Utilizando pimentão (*Capsicum annuum* L.) cv Agronômico 8 foram testados quanto a capacidade morfogenética três tipos de explantes de "seedlings" epicótilo (com gema apical), hipocótilo e cotilédone (sem o terço final do limbo) em meio de cultura suplementado por BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg/L). O cotilédone seccionado se mostrou como melhor explante na indução de brotações bem como concentrações de 2,0 e 4,0 mg/L de BAP.

3.1. REFERENCIAL TEÓRICO

A utilização de diferentes tipos de explantes de seedlings (cotilédone, epicótilo, hipocótilo) tem-se tido sucesso na resposta morfogenética "in vitro" com diferentes espécies e/ou variedades botânicas e entre elas podemos citar:

repolho (BAJAI & NIETSCH 1975; brócoli (HUI & ZEE 1980), alface (DOERSHUNG & MULLER 1967; SASCKI 1974; KADKDE & O' CONNOR 1976; SIBI 1976; WEEBIT et alii, 1984), beringela (ALICCHIO et alii, 1982), abóbora *C. pepo* (JALASKA 1974).

SHARNA et alii (1991), trabalhando com *Brassica juncea* avaliaram vários segmentos de cotilédones e suas respostas a regeneração. Os explantes primários utilizados foram: cotilédone intacto, pecíolo cotiledonar, pecíolo com pequena porção de limbo cotiledonar, pecíolo com metade do limbo cotiledonar, um lóbulo do cotilédone, metade do limbo cotiledonar, limbo cotiledonar sem pecíolo e metade do cotilédone cortado longitudinalmente. Determinaram neste estudo que cotilédone intacto, lóbulo cotiledonar e metade do cotilédone cortado longitudinalmente conferiram melhores percentagens de resposta à brotações, sendo que o cotilédone intacto teve maior número de brotações por explante.

NAUDWANI & RAMAWAT (1992), estudando a percentagem de regeneração em explantes de "seedlings" de *Proposis tamarugo*, utilizaram, como explante, segmentos de hipocótilo, ápice de "seedlings" com cotilédone, cotilédones mais epicótilo sem meristema apical e meristema apical. Concluíram, dentre outras coisas, que a presença do cotilédone junto com o meristema apical proporcionou a melhor regeneração.

Na maioria dos trabalhos visando a propagação vegetativa de pimentão "in vitro" partiu-se de explantes de "seedlings", sendo utilizados vários tipos de segmentos na

tentativa de indução de brotações. Explantes meristemáticos (gema e nó cotiledonar) e não meristemáticos (cotilédone e hipocótilo) foram comparados, quanto a capacidade de regeneração, por PHILLIPS & HUBSTENBERGER (1985). Estes autores concluíram, que quando incubados em meio suplementado com AIA e BAP, em várias concentrações, todos os tipos de explantes produziram brotações, sendo que os meristemáticos responderam melhor quando incubados à temperatura de 28,5 °C e os n ão meristemáticos a 25 ° C.

SRIPICHITT et alii, (1987), estudando *C. annuum* L. cv. Yatsufusa avaliaram a capacidade de regeneração de alguns explantes oriundos de "seedlings": cotilédone intacto, cotilédone sem o terço final do limbo, pecíolo cotiledonar e limbo cotiledonar sem pecíolo. Concluíram então, que o melhor destes explantes, para resposta à regeneração, quando cultivados em meio M.S. suplementado com BAP (3 mg/L), foi o cotilédone seccionado a 1/3 do limbo. Observaram também, que neste explante, as brotações ocorriam em maior intensidade na extremidade cortada do pecíolo.

Em outros estudos com o gênero *Capsicum*, GUNAY & RAO (1978); SWAMY (1983); SUBHASH & CHRISTOPHER (1988) e AGRAWAL et alii (1988 e 1989), trabalharam com avaliação de indução de brotações e tendo usado como explante o cotilédone, obtiveram sucesso na regeneração de plantas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes explantes primários oriundos de "seedlings", quanto a sua

capacidade de regeneração e proliferação "in vitro".

3.2. MATERIAL E METODOS

As sementes básicas de pimentão *C. annuum* cv. Agronômico 8 foram pré-tratadas por embebição em água por 20 horas conforme o descrito no capítulo II. Após a germinação no escuro os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento a 26 ± 1 °C e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). Dez dias após esta transferência foram retirados 3 tipos de explantes por "seedlings": cotilédone (seccionado a um terço da extremidade do limbo cotiledonar), segmento de hipocótilo com aproximadamente 1,5 cm (retirado a partir do nó cotiledonar) e segmento de epicótilo com meristema apical (retirado logo acima do nó cotiledonar). Estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio 25 x 150 mm contendo aproximadamente 15 mL de meio de cultura M.S. (com pH de 5,9 antes da autoclavagem), suplementado com ágar (7 g/L) mais citocinina (BAP) em várias concentrações (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg/L). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob as mesmas condições ambientais citadas anteriormente. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 6, perfazendo um total de 18 tratamentos com 4 repetições cada e seis tubos por repetição

(1 explante por tubo). A avaliação foi feita aos 45 dias tendo como parâmetros as brotações em cada explante, a formação de calos e formação de raízes.

3.3. RESULTADOS

A utilizacão de diferentes tipos de explantes de *Capsicum* induziram diferentes respostas morfogenéticas "in vitro" (QUADRO 04 e FIGURA 01 e 02). Essas variações foram influenciadas e diferenciadas pelas diferentes concentrações de BAP no meio de cultura. A formação de calos teve um incremento com o aumento da concentração de BAP atingindo o máximo na concentração de 2,0 mg/L. A partir da qual se observou um decréscimo na resposta morfogenética para calos em todos os explantes. O enraizamento foi inibido pela presença da citocinina no meio de cultura ocorreu nos 3 diferentes explantes na ausência de BAP, e no explante apical teve um decréscimo com o aumento da concentração de BAP no meio. Pode-se observar através do QUADRO 04 e das FIGURA 01 e 02 que o cotilédone seccionado a 1/3 do limbo foi o melhor tipo de explante quanto a capacidade de indução de brotações. A resposta morfogenética também variou com a concentração do regulador de crescimento, sendo que a concentração de 2,0 mg/L de BAP apresentou a maior taxa de indução de brotações. Com o

aumento da concentração de BAP houve uma inibição da proliferação dos brotos. O BAP revelou-se, no entanto, necessário à indução de brotações, uma vez que a concentração nula deste regulador de crescimento não promoveu indução de brotações em nenhum dos tipos de explantes testados.

QUADRO 03 - Resumo da análise de variância para percentagens de brotações em explantes de "seedlings".

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Explantes	2	1792,48 **
BAP	5	680,54 **
EXPLANTE x BAP	10	399,81 **
Resíduo	54	21,44
C.V. (%)		51,85

[1] Dados transformados para arco seno da raíz de (x + 0,5)
** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

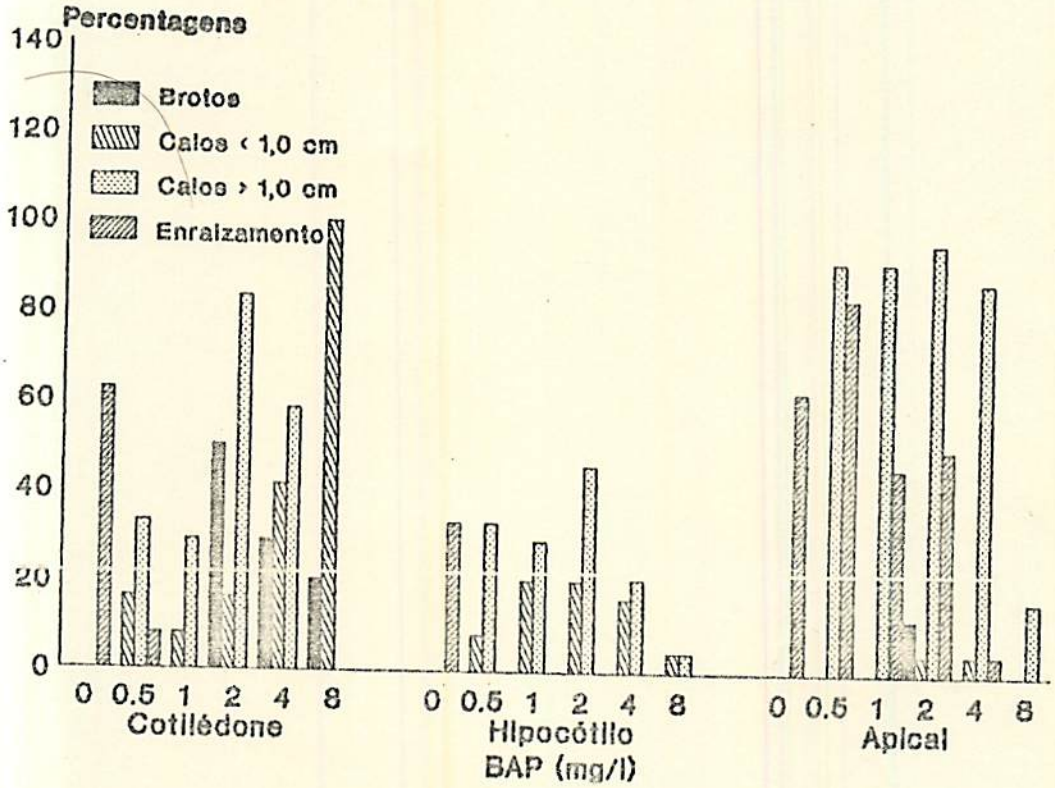

FIGURA 01 - Histograma representativo das percentagens de respostas morfogenéticas à brotações, calos e enraizamento utilizando diferentes explantes e cotilédone, hipocótilo e segmento apical em combinações com diferentes concentrações de BAP no meio de cultivo.

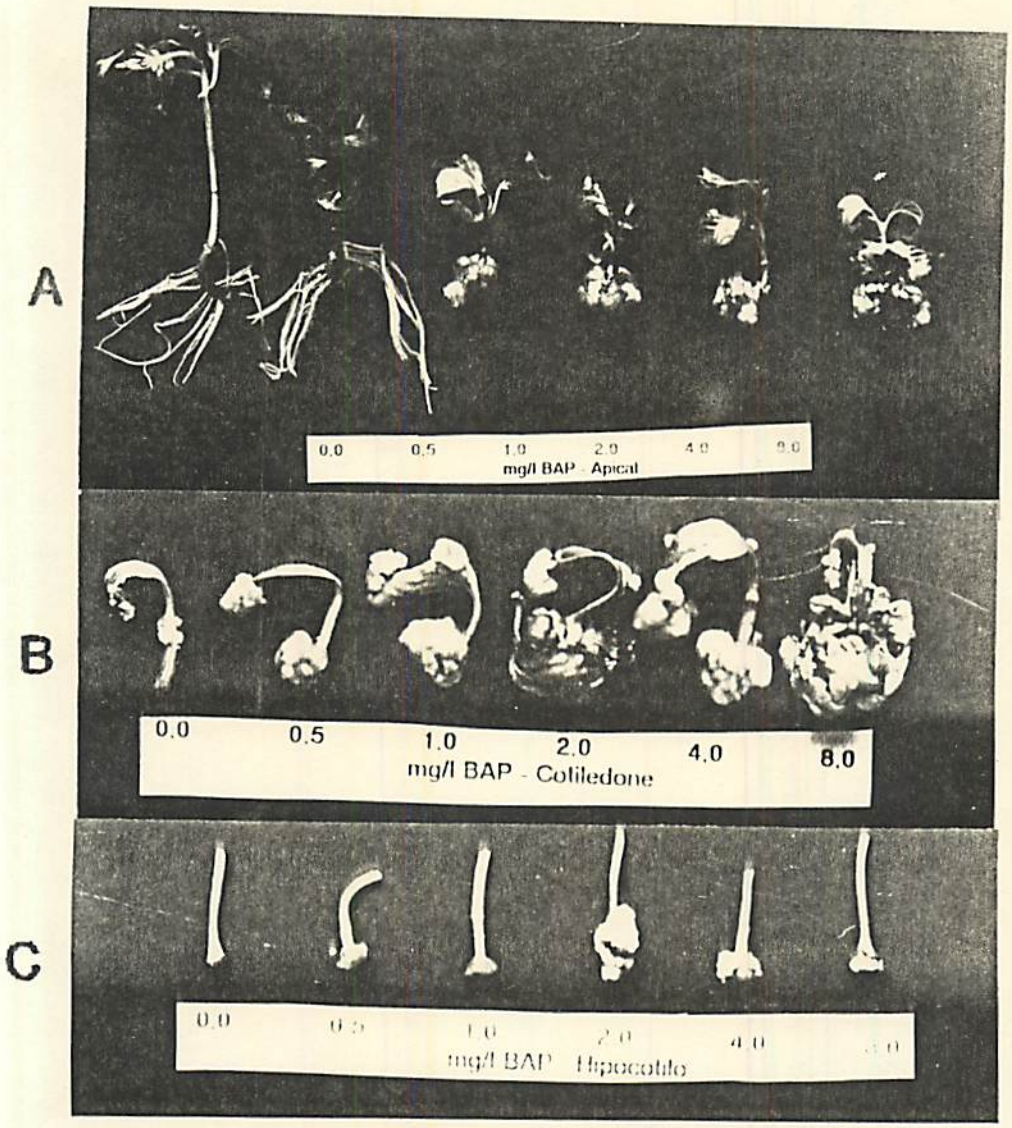

FIGURA 02 - Representação fotográfica da resposta morfogenética de diferentes explantes de "seedlings" de pimentão *Capsicum annuum* L. cv agronômico 8 à diferentes concentrações de BAP no meio de cultivo. A - segmento apical com o desenvolvimento da gema apical, enraizamento e calo na base. B - cotilédone sem o terço final do limbo. C - segmento de hipocótilo.

3.4. DISCUSSÃO

A partir dos resultados experimentais, fica evidente que os diferentes tipos de explantes podem induzir respostas diferenciadas quanto a formação de raízes, calos e brotações, dependendo da concentração dos reguladores de crescimento adicionadas ao meio de cultura. Estas observações também foram relatadas por GUNAY & RAO (1978), trabalhando com explantes cotiledonares e hipocótilo de três variedades de *Capsicum* e por PHILLIPS & HUBSTENBERGER (1985), que trabalhando com explantes meristemáticos e não meristemáticos de *Capsicum* obteve diferentes respostas morfogenéticas utilizando AIA e BAP em várias concentrações. A resposta morfogenética utilizando diferentes explantes, também é observada em outras espécies como *Proposis tamarugu* (NANDWANI & RAMAWAT, 1992) e *Brassica juncea* (SHARMA et alii, 1991).

Confirmando o trabalho de SRIPICHITT et alii (1987) o cotilédone sem o terço final do limbo foi o melhor dos explantes para indução de brotações. Outra observação, também confirmada por SRIPICHITT et alii (1987), foi de que as brotacões ocorrem em sua maioria na extremidade cortada do pecíolo.

O cotilédone como melhor explante de "seedling" observado neste experimento foi confirmado pela sua utilização por uma série de autores em estudos com *Capsicum* tais como:

GUNAY & RAO (1978); SWAMY (1983); SUBHASH & CHRISTOPHER (1988); AGRAWAL et alii (1988 e 1989) além dos já citados acima.

3.5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que existe uma necessidade de estudar e tentar identificar uma melhor concentracão de reguladores de crescimento, para a cultivar em estudo, utilizando o cotilédone sem o terço final do limbo como explante, para se ter uma melhor taxa de regeneracão e, se possível, regenerações diretas sem passar pela fase de calos.

3.6. BIBLIOGRAFIA

01. AGRAWAL, S., CHANDRA, N. & KOTHART, S.L. Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Mathania). Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 16:47-55, 1989.

02. ————, ———— & ————. Shoot tip culture of pepper for micropropagation. Current Science, New Delhy, 57(24):1347-9, 1988.

03. ALICCHIO, R. GROSSO, E.D. & BOSCHIERI, E. Tissue culture and plant regeneration from differents explants in six cultivars of *Solanum melongena*. Experientia, Switzerland, 38:449-50, 1982.

04. BAJAI, Y.P.S. & NIETSCH, P. In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). Journal Experimental of Botany, London, 26:883-90 1975.

05. DOERSCHUNG, M.R. & MILLER, C.O. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. American Journal Botany, Columbus, 54:410-13, 1967.

06. GUNAY, A.L. & RAO, P.S. In vitro plant regeneration from Hipocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Science Letters, Limerick, 11:365-72, 1978.

07. HUI, L.M. & ZEE, S.Y. The effect of ginseng on plantlet regenaration percentage of cotyledon and hypocotyl explants of Brocoli. Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie, Stuttgart, 69:297-301, 1980.

08. JALASKA, S. Embryogenesis and organogenesis in punpikins explants. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 31:257-61, 1974.

09. KADKADE, P. & O'CONNOR, H.J. Interactive effects of growth regulators on organogenesis in lettuce tissue culture Plant Physiology, Berlim, 57:75, 1976.

10. NANDWANI, D. & RAMAWAT, K.G. High frequency plantlets regeneration from seedlings explants of *Proposis tamarugo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 29:173-8, 1992.

11. PHILLIPS, G.C. & HUBSTENBERGER, J.F. Organogenesis in pepper tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 4:261-9, 1985.

12. SASAKI, H. Physiological and morphological studies and development of vegetable crops. Organ formation of lettuce tissue culture in vitro. **Journal of Hokkaido University Educacional Science**, Hokkaido, IIB, 26:17-27, 1974.

13. SRIPICHITT, P.; NAWATA, E. & SHIGENAGA, S. "In vitro" shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). **Japanese Journal Breeding**, 37:133-42, 1987.

14. SHARNA, K.K.; BHOJWANI, S.S. & THORPE, T.A. The role of cotyledonary tissue in the differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L) Czern. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 24:55-9, 1991.

15. SIBI, M. La notion de programme genetique chez les végètaux superierus. II Aspect experimental: obtention de variants par culture de tissue in vitro sur *Lactuca sativa* L. apparition de viguerur chez les croisements. **Annales d'Amelioration de Plantes**, Paris, 26:523-547, 1976.

[redacted]

16. SUBHASH, K. & CHRISTOPHER, T. Direct plantlet formation in cotyledon cultures of *Capsicum frutecens*. **Current Science**, New Delhy, 57(2):99-100, 1988.

17. SWAMY, T.C.N. Tissue culture multiplication of chilles (*Capsicum annuum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). **Thesis Abstracts**, Bangalore, 9(4):340-1, 1983.

18. WEEBIT, D.F.; TORRES, L.D. & FOBERT, P. Interaction of growth regulators, explants and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons in vitro. **Canadá Journal of Botany**, Otawa, 62:586-90, 1984.

CAPÍTULO IV

EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO E IDADE DO EXPLANTE NA PROLIFERAÇÃO DE BROTOS "IN VITRO"

CAPÍTULO IV - EFEITO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO E IDADE DO EXPLANTE NA PROLIFERAÇÃO DE BROTOS "IN VITRO"

RESUMO - Foram testadas combinações de citocininas (BAP) com auxinas (AIA e ANA) em várias concentrações para avaliar a capacidade morfogenética dos cotilédones (sem o terço final) de pimentão (*Capsicum annuum*) cv Agronômico 8. As concentrações de BAP (4,0 mg/L) mais AIA (1 mg/L) foi a melhor combinação para indução de brotações. Foram testados comparativamente os efeitos do BAP e do TZD sobre os cotilédones em imersão e no meio de cultura em várias concentrações e o TZD provou ser muito mais ativo que o BAP. Quanto a idade do explante, concluiu-se que, quanto mais jovem for o cotilédone, tanto melhor para indução de brotações diretas.

4.1. REFERENCIAL TEÓRICO

Os reguladores de crescimento adicionados ao meio de

cultura, tem como principal objetivo, o de suprir exogenamente os explantes. Isto se faz porque estes não sintetizam os fitohormônios necessários para as respostas biológicas tais como: crescimento, alongamento, enraizamento, formação de calos e multiplicação de brotos (TORRES & CALDAS, 1990).

A adição de um regulador de crescimento, do grupo das citocininas, induz brotações "in vitro" e na maioria dos casos pode ser favorável e/ou até mesmo necessário para a multiplicação da cultura. A determinação do tipo de citocinina e sua concentração, são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação "in vitro" (TORRES & CALDAS, 1990). De acordo com ZAERR & MAPES (1985), a citocinina mais potente para promover a proliferação de partes aéreas e economicamente, mais barata é o BAP. Segundo estes autores, esta citocinina sintética (BAP) é mais estável (e menos degradável) do que as naturais. Em um trabalho de levantamento da frequência de utilização de diferentes citocininas em meios de isolamento de cem espécies vegetais, HU & WANG (1983) verificaram que o BAP é o mais utilizado (em 68% das espécies).

Segundo TORRES & CALDAS (1990), as concentrações das citocininas em meios de cultura visando a multiplicação estão em geral entre 0,1 a 5,0 mg/L . QI-GUANG et alii, (1986), observaram que o excesso de BAP inibiu brotações de gemas, reduziu drasticamente o número de brotos por explantes e promoveu a formação de calos em cultura de *Castanea molissima*. Demonstraram ainda que o BAP afeta a vitrificação, interagindo

com a concentração de ágar no meio.

Embora, nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicaçao, as auxinas, que são outro grupo de reguladores de crescimento, são utilizadas em combinaçào com as citocininas, no intuito de minimizar o efeito inibitório que as citocininas tem sobre o alongamento e crescimento das culturas "in vitro" (HU & WANG, 1983). Segundo TORRES & CALDAS (1990), deve-se manter um balanço de auxinas/citocininas sempre menor que uma unidade para o sucesso das multiplicações, pois, o excesso de auxinas, podem promover formação de calos e raizes em detrimento da multiplicação. Segundo HU & WANG (1983), as auxinas mais utilizadas em combinação com as citocininas são, em ordem decrescente, ANA, AIB e AIA. O AIA é de todas as auxinas a mais instável em condições de meio de cultura devido a fotooxidação e a ação da AIA oxidase presente nos tecidos do explante. Em função disto, ela pode ser usada no início do estabelecimento da cultura, sem contudo, mesmo em concentrações mais elevadas, ter um efeito excessivamente prolongado o que, resultaria na formação de calos e comprometeria a taxa de multiplicação. O ANA, por ser mais estável, é utilizado em concentrações mais baixas (TORRES & CALDAS, 1990)

GUNAY & RAO, (1978), trabalhando com duas variedades de *Capsicum annuum* (California Wonder e Pimento) e um híbrido de *C. frutecens* (Bharath) e como explante o cotilédone e o hipocótilo, cultivados em meio M.S., suplementado com algumas auxinas e citocininas sozinhas ou combinadas, observaram que em

nenhum dos tratamentos que se usou apenas auxinas houve indução de brotações. Já com o uso de Zeatina (1 mg/L) uma citocinina, foram observados, ocasionalmente, brotações após a formação de calos no explante cotilédone nas variedades Pimento e Bharath. A citocinina BAP (1mg/L) induziu calos e brotações em hipocótilo da variedade Pimento e no cotilédone das variedades Bharath e California Wonder. Com a dosagem de 2 mg/L de BAP obtiveram brotações nas três cultivares no explante cotilédone. O SD8339 (1 mg/L) induziu calos e brotações nos dois explantes de California Wonder e no cotilédone de Bharath, enquanto que na variedade Pimento produziu calos e raízes. Quando combinaram AIA (1 mg/L) e BAP (2 mg/L) observaram no híbrido Bharath, no explante hipocótilo, calos e raízes e no cotilédone produziu brotações. Nas outras variedades produziu também brotações após formação de calos no explante cotilédone. A combinação Zeatina (2 mg/L) e AIA (1 mg/L) se portou da mesma forma que BAP (2 mg/L) com AIA (1 mg/L), porém o número de brotações foi sempre inferior aos da combinação BAP e AIA. Com base nestes resultados concluíram que o melhor tratamento para regeneração foram a combinação citocinina (BAP 2 mg/L), auxina (AIA 1 mg/L) com o explante cotilédone. Estas brotações, obtidas do cultivo de cotilédones, após 6 semanas do início de seu surgimento, foram subcultivadas em meio M.S., suplementado com BAP (2 mg/L) e AIA (1 mg/L), transformaram-se em plantas completas.

Outro trabalho desenvolvido por FARI & CZAKO (1981), com *C. annuum* cv T. Hatwani, onde se cultivaram segmentos de

hipocótilo em meio M.S., suplementado com BAP (2 mg/L) e AIA (1mg/L) verificou-se que os segmentos apicais do hipocótilo produziram brotações, os segmentos intermediários produziram varias raízes enquanto segmentos basais produziram calos. As brotações foram transferidas para meio M.S. suplementado com AIA (0,1 mg/L) e AIB (0,05 mg/L) e após 4 semanas formaram plântulas com 3 a 5 folhas que foram transferidas, para solo esterilizado, junto com meio de cultura. Após uma aclimatação gradativa as plantas já estavam áptas para o plantio no campo.

SWANY (1983), conclui, em seus trabalhos, que o melhor regulador de crescimento para a regeneração, foi o BAP, quando se utilizou como explante cotilédone de *C. annuum*.

Já PHILLIPS et alii (1985), trabalhando com *C. annuum* cv California Wonder, Yolo Wonder, NewMexico 6-4 e NuMex R. Naky evidenciaram também, que o melhor meio para indução de brotação, para todos explantes utilizados foi o M.S. suplementado com BAP combinado com AIA. Após seu desenvolvimento as brotações foram subculturadas em meio M.S. suplementado por 0,05 mg/L de cada regulador (BAP e AIA) promovendo também o enraizamento e produção de plântulas completas.

SRIPICHITT et alii, (1987), observaram que cotilédones (seccionados a 1/3 do limbo) de *C. annuum* cv Yatsufusa cultivado em meio M.S. com BAP (3 mg/L), foi o melhor tratamento para regeneração. No entanto quando se combinavam citocininas e auxinas concluíram que estas últimas inibiam, em

maior ou menor escala, as brotações.

SUBHASH & CHRISTOPHER (1988), usando cotilédones de *C. frutescens* obtiveram resultados satisfatórios para indução de brotações quando usaram meio M.S. suplementado com cinetina (1mg/L) e ANA (1 mg/L) sendo que estas eram regenerações diretas (i.e., sem formação de calo) apesar de ocorrerem em baixa percentagem (10%). As brotações depois de desenvolvidas foram transferidas para vermiculita e formaram plantas normais.

Em outro trabalho com *C. annuum* variedades Mathania e Bharath e como explante o cotilédone, foi feito por AGRAWAL et alii, (1988), onde obtiveram brotações e enraizamento, após a formação de pequeno calos, quando os cotilédones foram cultivados em meio M.S., suplementado com vários níveis de cinetina e BAP combinados com AIA e AIB. Estes mesmos pesquisadores em 1989, trabalhando ainda com a cultivar Mathania observaram que cotilédones cultivados em meio M.S., suplementado com BAP (5 mg/L), foi o melhor tratamento para indução de brotações. Contudo, apesar de em grande número, estas brotações não se desenvolviam e quando subculturadas neste mesmo meio, proliferavam dando mais brotações. Para obter plantas completas, as brotações foram subculturadas em meio M.S., suplementado com AIB ou ANA (0,1 mg/L).

Outro regulador de crescimento que foi observado como sendo o melhor para a regeneração de plantas no cultivo de cotilédones de pimentão foi a Zeatina (5 mg/L), quando adicionada ao meio Nagao suplementado com os sais do M.S.

(HAYASH,KATO & YANG 1988).

Utilizando embriões de *C. annuum* cultivar Mathania, cultivando-os em meio M.S. suplementado com BAP (5 mg/L), sozinho ou combinado com AIA (0,5 a 1,0 mg/L), AGRAWAL & CHANDRA (1983) obtiveram inúmeras brotações ao longo da margem do cotilédone expandido. Estas brotações quando subculturadas em meio M.S. contendo BAP (5 mg/L), proliferaram em mais brotações, que cultivadas em meio M.S. com ANA (0,1 mg/L) enraizavam e produziam plântulas completas.

Outra citocinina, registrada em 1976 como desfolhante para algodão, é o TZD. ELSTNER et alii (1983) demonstraram que o TZD causava um aumento no etileno em folhas de feijão. SUTTLE (1985), determinou que o TZD causava abscisão de folhas em algodão. MOK et alii (1982), foram os primeiros a determinar a atividade de citocinina do TZD trabalhando com *Phaseolus lanatus*. Eles encontraram um alto efeito na formação de calos e concluíram que o TZD tinha um efeito similar ao da mais ativa citocinina (BAP).

Existem poucos trabalhos com o emprego de TZD em culturas "in vitro". NIEUWKERK et alii (1986), mostraram que o TZD causou uma profunda estimulação à formação de brotos em explantes de maçã. KERNS & MEYER (1985, 1986), relataram o sucesso do TZD na formação de brotos em *Celtir occidentalis* L. e uma dificuldade na propagação de clones de *Acer*. FELLMAN et alii (1987), avaliaram o efeito do TZD em segmentos de folhas de petúnia nas concentrações de 10^{-4} à 10^{-8} M e observaram

após 5 semanas que a proliferação de gemas ocorreu na concentração de 10^{-6}M (com a supressão da elongação de brotos), as concentrações de 10^{-3} e 10^{-4}M o TZD foi tóxico e na concentração de 10^{-5} houve formação de calos compactos e verdes. FELLMAN et alii (1987), comparando BAP e TZD em imersão em várias concentrações e em pulverizações (aplicadas três dias antes da retirada do explante), concluíram que a imersão foi mais eficaz que a pulverização e ainda que a concentração de 10^{-2} M de TZD foi a que produziu maior número de brotos por explante. Baskakov et alii, citado por MOK et alii (1987), determinaram que o TZD poderia substituir as citocininas, do tipo adenina para promover crescimento em tabaco. MOK et alii (1987), demonstraram que o TZD é mais resistente às oxidases, mais estável e biologicamente mais ativo em baixas concentrações quando comparado com as demais citocininas do tipo adenina. FIOLA et alii (1990), mostraram que o TDZ teve efeito mais pronunciado que o BAP na indução de organogênese em cotilédones e folhas de *Rubus* sp. Para cotilédones as concentrações ótimas no meio foram de 5 a 10 µM e para folhas de 5 a 20 µM. BATES et alii (1992), em trabalhos com *Fraxinus americana* L. e determinaram que houve formação de brotações, em explante de "seedlings" quando cultivados em meio com 10 µM de TZD. ELLIS et alii (1991), compararam os efeitos do BAP, Zeatina e TZD em epicótilo e embriões de *Pecea glauca* e determinaram que a Zeatina a 50 µM e TZD a 0,01 µM foram os melhores tratamentos para promover o rápido crescimento de

gemas.

4.2. COMBINAÇÃO DE BAP COM AIA E ANA NA INDUÇÃO DE BROTOS

4.2.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da combinação de citocinina (BAP) com auxinas (AIA e ANA) na resposta morfogenética de cotilédones de pimentão.

4.2.2. Material e métodos

Sementes de pimentão cv. Agronômico 8 foram embebidas em água por 20 horas e posteriormente desinfestadas e inoculadas em meio MS com metade da concentração salina e levadas para o escuro para germinação. Sete dias após a inoculação foram transferidos para sala de crescimento sob fotoperíodo 16/8 horas (luz/escuro) e temperatura de 26 ± 1°C.

Após 12 dias desta transferência os cotilédones foram seccionados, retirando-se o terço final do limbo e inoculados em tubos de ensaio 25 x 150 mm contendo aproximadamente 15 mL de meio M.S o meio foi solidificado com ágar (6,5 g/L) suplementado com citocinina (BAP) em várias concentrações (2,0;

4,0 e 8,0 mg/L) sozinho ou em combinação com auxinas (AIA ou ANA) nas concentrações (0,5; 1,0 e 2,0 mg/L). O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. O experimento foi dividido em duas partes, testando separadamente o efeito da combinação do BAP com cada auxina (AIA ou ANA). Cada experimento foi montado no delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial 3 x 3 (3 níveis de auxina x 3 níveis de citocinina) e com 4 repetições por tratamento e 5 tubos por repetição. O experimento foi mantido em sala de crescimento com 26 ± 1 °C sob fotoperíodo 16/8 horas (luz/escuro). A avaliação foi feita aos 45 dias observando os seguintes parâmetros: percentagem de calos (nas duas extremidades - P/L, somente no pecíolo), tamanho de calo (menores que 1 cm e maiores que 1 cm), percentagem de brotações (número de explantes que mostraram alguma resposta morfogenética para brotações, separados em duas categorias: nas duas extremidades do explante (P/L e só no pecíolo) e ainda percentagem de enraizamento.

4.2.3. Resultados

Os reguladores de crescimento BAP, ANA e AIA interagem no que diz respeito a resposta morfogenética (QUADROS 04, 05 e 06 e FIGURAS 03 e 04).

A análise estatística foi feita apenas para o

experimento BAP X AIA porque o BAP X ANA não mostrou respostas morfogenéticas que justificassem uma análise estatística. A combinação de BAP X AIA foi analisada estatisticamente para as percentagens de brotações nas duas extremidades dos explantes. Existiu diferença significativa entre os níveis de AIA sendo que a concentracão de 1,0 mg/L foi estatisticamente superior às demais. Como a interação foi também estatisticamente significativa o desdobramento de níveis de BAP dentro da concentração (1,0 mg/L) de AIA mostrou que as concentracões 4,0 e 8,0 mg/L de BAP foram estatisticamente superiores.

Observando o QUADRO 05 pode-se notar que apesar dos níveis 4,0 e 8,0 mg/L de BAP mais 1,0 mg/L de AIA serem semelhantes quanto a indução de brotações o nível de 4,0 mg/L de BAP apresenta calos menores que 1,0 cm, enquanto que no nível de 8,0 mg/L de BAP apresenta calos maiores que 1,0 cm.

Para a combinação BAP x ANA, comparativamente à combinação BAP x AIA houve uma maior indução de calos e menor regeneração de brotações, apresentando em 100% dos explantes houve calos maiores que 1,0 cm. Houve regeneração de brotos apenas no nível baixo de ANA (0,5 mg/L), independente dos níveis de BAP. O enraizamento ocorreu no nível de 2,0 mg/L de BAP em combinação com ANA, havendo uma maior percentagem de enraizamento no nível de 2 mg/L de ANA (QUADRO 05).

QUADRO 04 - Resumo da análise de variância para percentagem de brotações nas extremidades dos cotilédones em diferentes concentrações de BAP e AIA.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
AIA	2	15118,03 **
BAP	2	2755,76 **
AIA x BAP	4	1171,71 **
Resíduo	27	163,36
C.V. (%)		28,40

[1] Dados transformados para arco seno da $\sqrt{(x + 0,5)}$
** Significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

QUADRO 05 - Percentagens de respostas morfogenéticas em brotações calos e raízes dos cotiledones de pimentão aos tratamentos de BAP e ANA.

ANA (mg/L)	BAP (mg/L)	Calos (%)				Brotações (%)		Raiz (%)
		P/L	P	<1 cm	>1 cm	P/L	P	
0,5	2,0	100	0	0	100	0	5	20
	4,0	100	0	0	100	5	20	5
	8,0	100	0	0	100	0	35	0
1,0	2,0	100	0	0	100	0	0	15
	4,0	100	0	0	100	0	0	0
	8,0	100	0	0	100	0	0	0
2,0	2,0	100	0	0	100	0	0	50
	4,0	100	0	0	100	0	0	0
	8,0	100	0	0	100	0	0	0

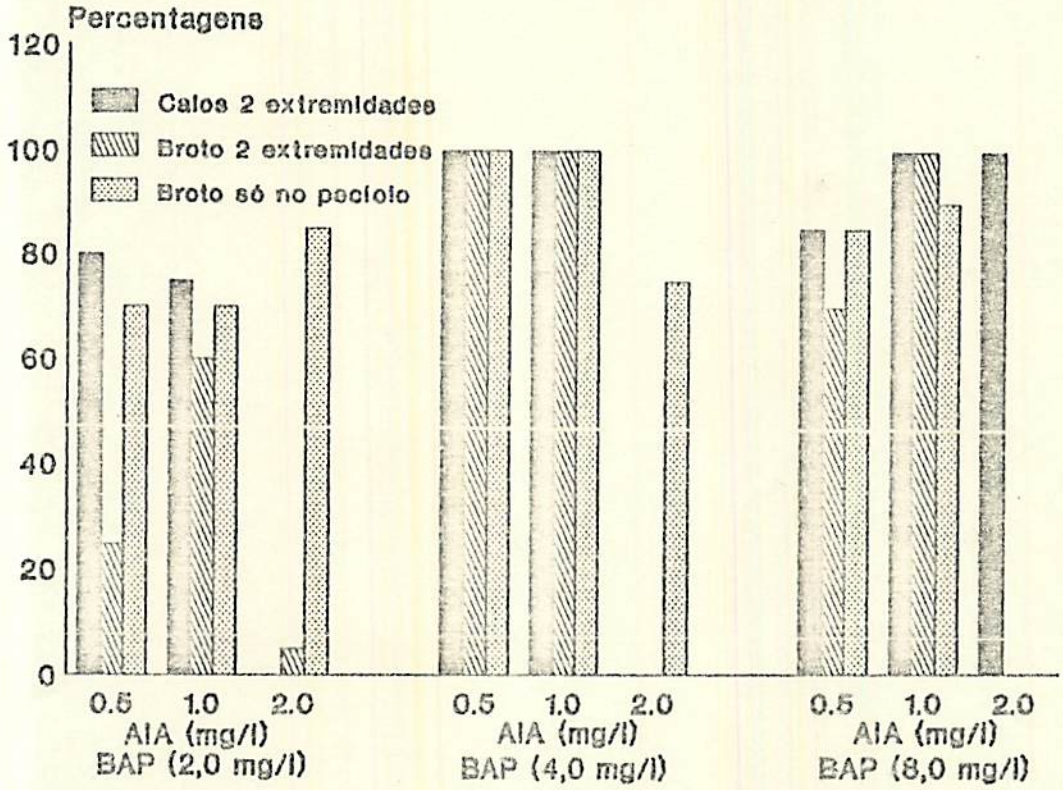

FIGURA 03 - Histograma das percentagens de brotações e calos em cotilédones de pimentão *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8 em diferentes concentrações de BAP e AIA no meio de cultivo.

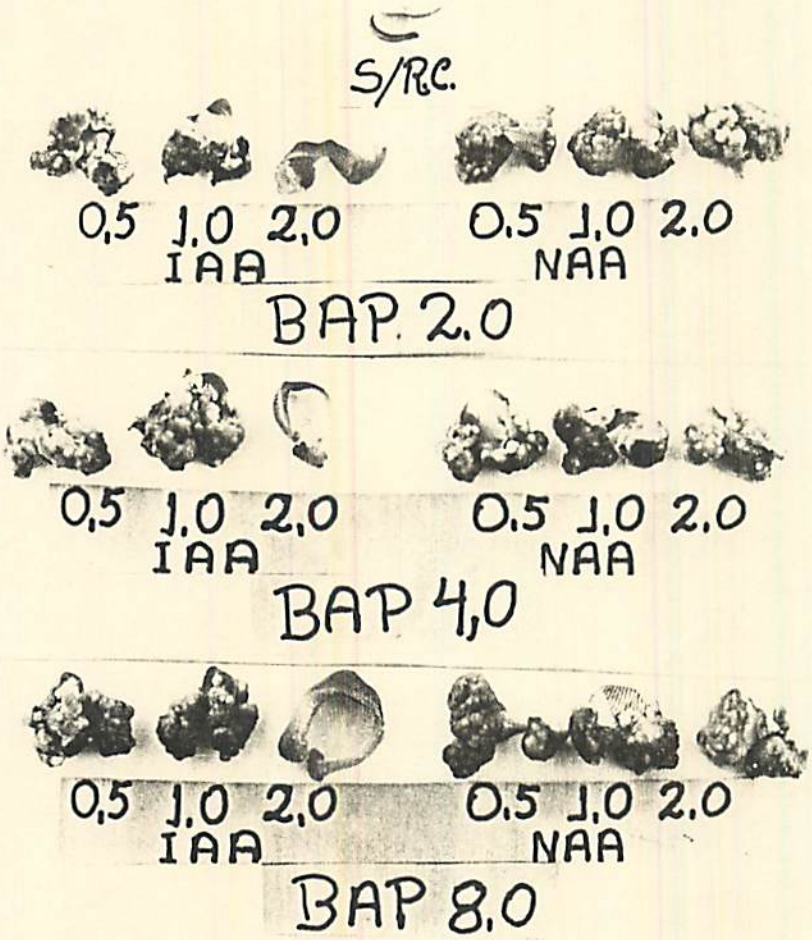

FIGURA 04 - Respostas morfogenéticas em cotiledones de pimentão *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8 em diferentes concentrações de BAP e AIA no meio de cultivo.

4.2.4. Discussão

A escolha do BAP como citocinina na indução de brotações foi baseada no seu sucesso em vários trabalhos semelhantes, sendo recomendado por SWAMY (1983) como melhor citocinina para indução de brotações em *Capsicum*. A utilização de BAP isolado foi recomendada por SRIPICHITT et alii (1987), no nível de 3 mg/L para indução de brotações em cotilédones enquanto AGRAWAL & KOTHART (1989), o recomenda na concentração de 5 mg/L no meio para indução de brotações também em cotilédone.

A utilização da combinação BAP com auxinas, foi testada neste experimento baseada em observações feitas no experimento do capítulo anterior onde as brotações que ocorreram nos cotiledones nos níveis de BAP (2,0; 4,0 e 8,0 mg/L) não se desenvolveram, confirmando os resultados de AGRAWAL & KOTHART (1989). Segundo HU & WANG, (1983), a combinação BAP x auxinas tem o intuito de minimizar o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento e crescimento das culturas "in vitro".

A combinação citocinina e auxina foi utilizada em pimentão com sucesso por GUNAY & RAO (1978), FARI & CZAKÓ (1981), PHILLIPS & HOBSTENBERGER (1985), SUBHASH & CHRISTOPHER (1988), AGRAWAL & KOTHART (1988 e 1989) e AGRAWAL & CHANDRA (1989) e confirmada no atual experimento, como sendo eficiente

na indução de brotações em *Capsicum*.

No presente experimento, o nível encontrado como mais favorável à indução de brotações foi o BAP (4 mg/L) + AIA (1mg/L) o que difere dos níveis encontrados por GUNAY & RAO (1978), e FARI & CZAKO (1980), que encontraram BAP (2 mg/L) e AIA (1 mg/L) como melhor combinação para indução de brotações. Isto pode ser explicado pela idade do explante na época da inoculação bem como pelos diferentes "background" genéticos utilizados. Já AGRAWAL & CHANDRA (1989), encontraram a combinação BAP (5 mg/L) com AIA (0,5 a 1,0 mg/L) como a melhor para induzir brotações. Uma observação feita no presente experimento e não relatada por nenhum destes trabalhos foi a presença das brotações nas duas extremidades do explante quando se utilizou a combinação BAP e AIA o que não ocorre quando se utilizou apenas o BAP, observada no experimento do capítulo III.

A combinação entre citocininas com a auxina (ANA) citada por HU & WANG (1983), como sendo a mais utilizada provou no presente experimento que nos níveis testados não foi eficiente para indução de brotações. Pode-se atribuir estes resultados ao fato citado por TORRES & CALDAS (1990), que o ANA por ser mais estável, deve ser utilizado em concentrações mais baixas.

4.2.5. Conclusão

Como os resultados em termos de número de brotações por explantes foram bem satisfatórios e em grande número no tratamento BAP (4 mg/L) com AIA (1 mg/L) à partir deste experimento passou-se a utilizá-lo como meio para indução de brotações para proceder os demais passos de multiplicação de *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8.

4.3. INFLUÊNCIA DA IDADE DO EXPLANTE NA REGENERAÇÃO DE BROTOS

4.3.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da idade do explante em relação às respostas morfogenéticas "in vitro".

4.3.2. Material e métodos

Sementes de pimentão cv. Agronômico 8, foram embebidas em água por 20 horas, posteriormente desinfestadas e

inoculadas em meio M.S. com metade da concentração salina e colocadas no escuro para germinação. Sete dias após a inoculação foram transferidas para sala de crescimento sob fotoperíodo 16/8 (luz/escuro) e temperatura relativa de 26 ± 1°C. Após o 12º dia da inoculação das sementes os cotilédones apresentaram um tamanho mínimo, no qual poderiam ser seccionados e inoculados. Iniciou-se então a retirada dos cotilédones dia a dia até o 25º dia após a inoculação das sementes "in vitro". Estes cotilédones foram inoculados em tubos de ensaio 25 x 150 mm contendo o meio que, como relatado anteriormente como o melhor para indução de brotações diretas (M.S. mais ágar (6,5 g/L) suplementado com BAP (4,0 mg/L) e AIA (1,0 mg/L) e pH de 5,9 antes da autoclavagem). Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 1 °C sob o fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro). O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com um total de 13 tratamentos (idades dos cotilédones) 3 repetições e parcela de 5 tubos. Vinte dias após a inoculação dos explantes avaliou-se as brotações diretas (sem passar pela fase de formação de calos) e indiretas (brotações oriundos dos calos) adotando o seguinte critério de notas:

Notas	Brotações diretas (%)	Brotações indiretas (%)
10	100	0
9	80	20
8	60	40
7	40	60
6	20	80
5	0	100
4	0	80
3	0	60
2	0	40
1	0	20
0	0	0

4.3.3. Resultados

Conforme os QUADROS 06 e 07 e FIGURA 05, os caracteres avaliados foram as percentagens de formação de calos, à percentagem de resposta morfogenética para brotações divididas em "nas duas extremidades" e "só no pecíolo". A análise estatística foi feita apenas para as notas pois estas foram baseadas nos caracteres avaliados. Nesta análise, as idades de 13, 14 e 15 dias mostraram-se iguais em si, mas superiores as demais. Após o 21º dia não houve mais respostas morfogenéticas quanto a brotações e após o vigésimo segundo dia não houve também resposta morfogenética quanto a calos. A

formação de brotacões decresceu com o aumento da idade enquanto que a presença de calos aumentou com a idade até o décimo nono, a partir do qual começou a decrescer.

QUADRO 06 - Nota referente a diferenciação direta e indireta nas diferentes idades do cotilédone. As letras ao lado das notas se referem ao teste de Tukey ao nível de 1%.

Idade do explante (Dias)	Notas				
13	10,0	A			
14	10,0	A			
15	9,0	A			
16	5,0		B		
17	4,0		BC		
18	3,0		BC		
19	2,0			C	
20	0,5			D	
21	0				E
22	0				E
23	0				E
24	0				E
25	0				E

QUADRO 07 - Resumo da análise de variância para notas em diferentes idades do cotilédone.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Idade	10	3,04 **
Resíduo	22	0,01
C.V. (%)		7,20

[1] Dados transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.
** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

4.3.4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados confirmam os dados relatados por SRIPICHITT et alii (1987), que trabalharam com *Capsicum annuum* L. cv Yatsufusa e avaliaram a idade dos cotilédones retirados de "seedlings" com 12, 16 e 20 dias de idade. Eles chegaram a conclusão de que quanto mais novo o explante (12 dias) maior foi a resposta morfogenética para brotações. Thorpe & Patel (1984), citados por SRIPICHITT et alii (1987), concluíram que em geral explantes mais jovens são melhores para formação de órgãos em culturas "in vitro".

Um fato observado nos presentes resultados, e não relatado por SRIPICHITT et alii (1987) foi que, quanto mais novo o cotilédone inoculado no meio de cultura suplementado com

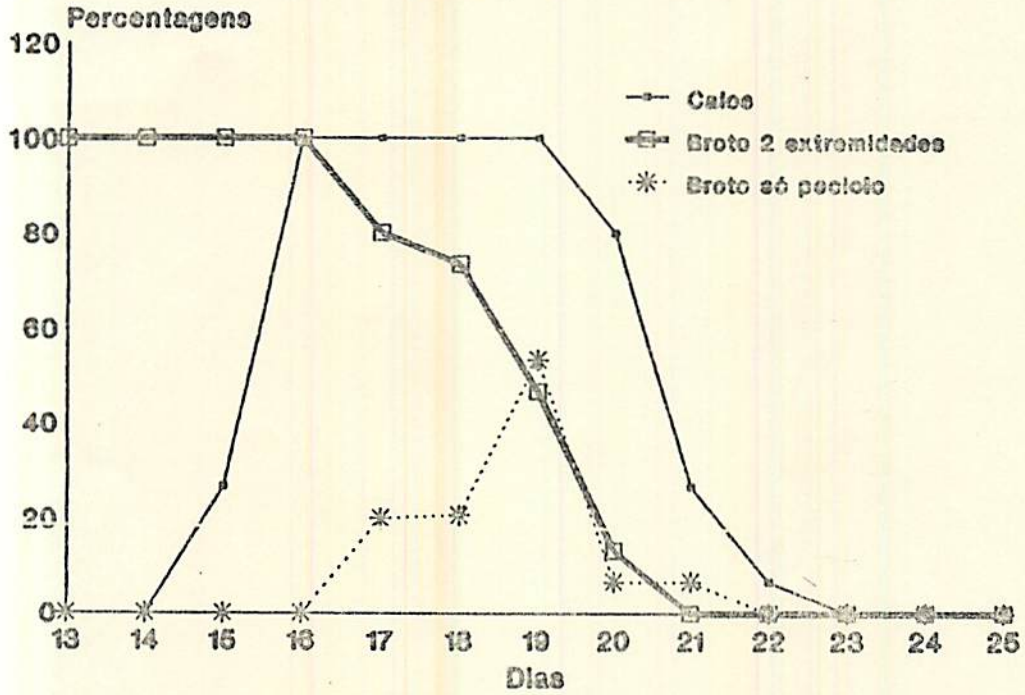

FIGURA 05 - Resposta morfogenética em diferentes idades do cotiledone quando cultivados em meio MS suplementado com BAP (4 mg/L) e AIA (1 mg/L).

BAP (4,0 mg/L) e AIA (1,0 mg/L) maior a tendência a ocorrerem as regenerações diretas o que para o objetivo proposto é muito vantajoso porque evita possíveis variações somaclonais que possam ocorrer. A ocorrência deste tipo de reação em nosso experimento pode ter ocorrido devido a se ter trabalhado com explantes mais jovens uma vez que as avaliações se iniciaram a partir de 13 dias após a inoculação das sementes, ou seja, em "seedlings" de aproximadamente 6 a 7 dias. Pode-se ainda, neste caso, sugerir que o explante mais jovem foi o melhor devido ao estado de atividade fisiológica que naturalmente, decresce com o tempo, devido a translocação dos metabólitos de reserva do cotilédone para a plântula.

4.3.5. Conclusões

Conclui-se, pois, que para a micropropagação de pimentão cultivar Agronômico 8, a utilização de cotilédones com 13 e 14 dias após a inoculação da sementes mostra mais apta para obtenção de brotações diretas diminuindo assim, o risco da ocorrência da indesejável variação somaclonal.

4.4. AVALIAÇÃO DE UM NOVO REGULADOR DE CRESCIMENTO NA PROLIFERAÇÃO DE BROTOS

4.4.1. Objetivo

O objetivo deste ensaio foi avaliar a eficiência da atividade da citocinina TZD frente ao BAP na resposta do cotilédone à imersão em soluções de BAP e TZD e da inoculação do explante em meio de cultura contendo estes reguladores de crescimento.

4.4.2. Material e métodos

Sementes de pimentão Agronômico 8 foram embebidas em água por 20 horas, inoculadas em meio M.S. com metade da concentração salina e postas no escuro para a germinação. No sétimo dia foram transferidas para sala de crescimento sob fotoperiodo 16/8 horas (luz/escuro) e temperatura de 26 ± 1°C.

Foram retirados três tipos de explantes: cotilédone sem o terço final do limbo, segmento de hipocótilo e epicótilo com gema apical. Foram então feitos dois experimentos. Num primeiro estes explantes foram imersos em soluções de citocininas por 60 segundos BAP (2,2; 22; 220 mg/L), TZD (2,2;

22; 220 mg/L). Em um segundo experimento os explantes foram inoculados em meio suplementado com TZD (0,05; 0,15; 0,45; 1,35 e 4,05 mg/L) ou BAP (2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 mg/L). Em seguida foram inoculados em tubos de ensaio 25 x 150 mm contendo aproximadamente 15 mL de meio M.S. mais ágar (6,5 g/L) e pH 5,9 antes da autoclavagem. O experimento foi montado segundo delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos por explante e 4 repetições por tratamento, com, 5 tubos por repetição. As avaliações foram feitas 25 dias após a montagem do experimento observando o efeito morfogenético em cada explante/tratamento. Para o experimento com reguladores de crescimento no meio de cultura foram avaliadas as percentagens de brotações (número de explantes com brotações), calos menores que 0,5 cm e calos maiores que 0,5 cm.

4.4.3. Resultados

No primeiro experimento, foram avaliadas algumas respostas morfogenéticas de três tipos de explantes à tratamentos de imersão em soluções contendo diferentes concentrações de duas citocininas (BAP e TZD) separadamente. Como mostra o QUADRO 08 e a FIGURA 06 a resposta morfogenética à brotacões ocorreu apenas em um tratamento, ou seja, o de imersão em TZD a 220 mg/L mas foram em geral baixas. Observou-

se ainda uma resposta morfogenética, quanto a formação de calos, crescente com aumento das concentrações de TZD. As percentagens de enraizamento nos explantes apical e hipocótilo diminuiram com o aumento nas concentrações tanto de BAP quanto de TZD.

No experimento de incorporação de TZD e BAP ao meio de cultivo, concentrações de TZD (iguais ou superiores a 0,15 mg/L) e de BAP (4,0 mg/L) foram as que promoveram maior percentagem de brotações. Além disso, o TZD na concentracão de 0,45 mg/L teve uma tendência de ser superior a todos os demais.

Nas concentracões superiores de BAP (16,0 e 32,0 mg/L) não houve resposta morfogenética tanto para brotações como para formação de calos, ocorrendo um crescimento exagerado do limbo cotiledonar. A formação de calos apresentou uma queda com o aumento da concentração de BAP e um aumento com o aumento da concentração de TZD a partir de 1,35 mg/L.

QUADRO 8 - Resultados do ensaio preliminar de imersão em soluções de BAP e TZD comparando quanto a respostas morfogenéticas em calos, brotações e raízes.

Tipo de explante	Citocinina	Concentração (mg/L)	Calos	Brotações (%)	Raiz (%)
Cotilédone	TZD	2,2	X	0	0
		22,0	XX	0	0
		220,0	XX	45	0
	BAP	2,2	●	0	0
		22,2	X	0	0
		220,0	-	0	0
Apical	TZD	2,2	X	0	57,00
		22,0	XX	0	48,00
		220,0	XX	15	7,75
	BAP	2,2	●	0	65,25
		22,2	X	0	46,50
		220,0	-	0	33,25
Hipocótilo	TZD	2,2	●	0	12,25
		22,0	●	0	7,50
		220,0	-	10	1,00
	BAP	2,2	-	0	13,25
		22,2	-	0	7,25
		220,0	-	0	

XX —— Calo grande
X —— Calo pequeno
● —— Calo muito pequeno
- —— Sem calo

QUADRO 9 - Resumo da análise de variância das percentagens de brotações nos cotilédones à diferentes concentrações de BAP e TZD.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Citocininas	9	1,23 **
Resíduo	30	0,05
C.V. (%)		14,60

[1] Dados transformados para $\sqrt{(x + 0,5)}$.
** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

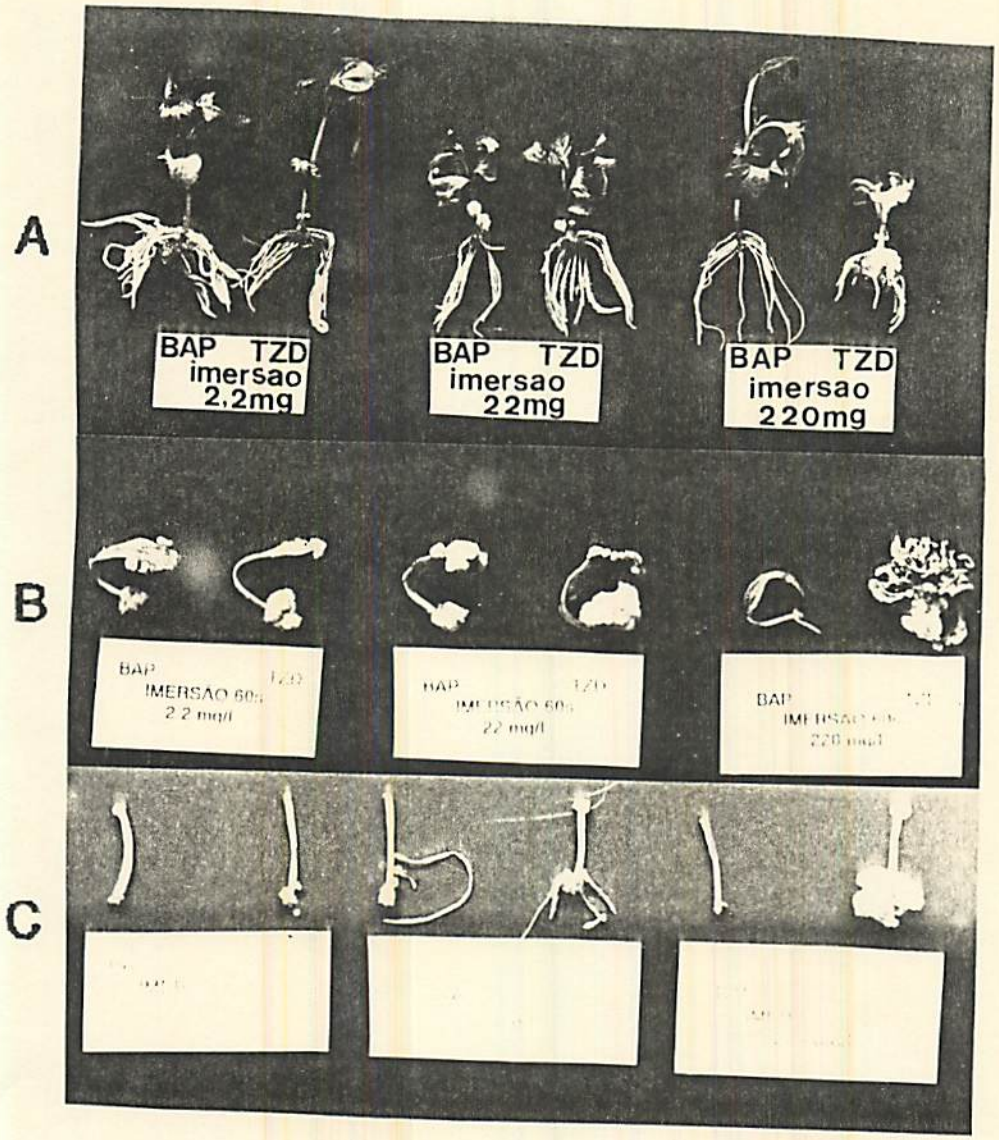

FIGURA 06 - Respostas morfogenéticas de diferentes explantes de pimentão submetidos a imersão em soluções com diferentes concentrações: (A) segmento apical com desenvolvimento de gema apical sem novas brotações; (B) cotilédone sem o terço final do limbo; (C) segmentos de hipocótilo.

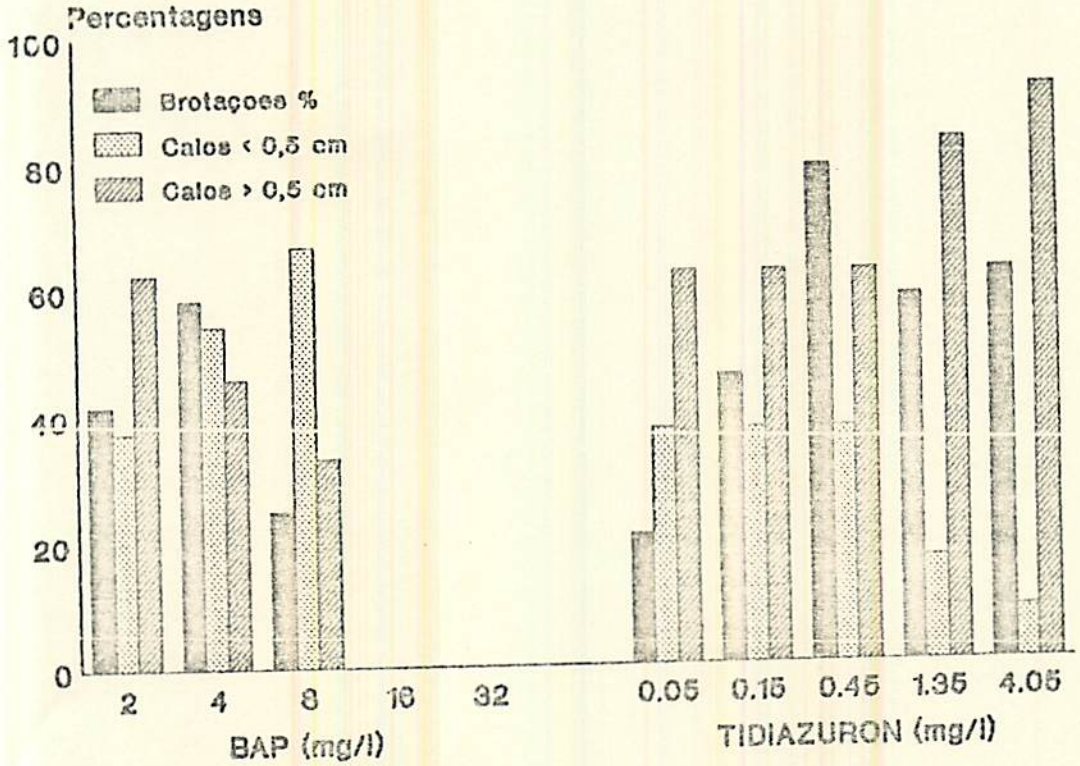

FIGURA 07 - Histograma das percentagens de brotações e calos em cotilédones de pimentão *Capsicum annuum* L. cv. Agronômico 8 à diferentes concentrações de TZD ou BAP no meio de cultivo.

4.4.4. Discussão

No ensaio preliminar, para medir os efeitos comparativos de TZD e BAP em explantes de "seedlings" de pimentão, obtiveram resultados que confirmaram os obtidos por FELLMAN et alii (1987), sobre maior eficiência de TZD em relação ao BAP para a promoção de brotações.

Com os resultados deste ensaio partiu-se para avaliar o efeito comparativo entre as duas citocininas quando utilizadas em meio de cultura. Chegamos a resultados onde a concentracão de TZD (0,15 mg/L) não diferiu da de BAP (4mg/L) quanto a indução de brotações, o que nos leva a concluir, que o TZD é muito mais ativo e eficaz que o BAP. Estes resultados confirmam os obtidos por MOK et alii (1987), FELLMAN et alii (1987) e FIOLA et alii (1990). Outra demonstração da grande eficácia do TZD foi obtida por ELLIS et alii (1991), onde os melhores resultados na indução de brotações foram obtidos os níveis de Zeatina (50 µM) e TZD (0,01 µM). Uma das explicações para maior eficiência do TZD em relação a outras citoninas, é que o TZD é resistente as citocininas oxidases, tornando-se assim mais estável e biologicamente mais ativo que as demais (MOK et alii, 1987).

[redacted]

4.4.5. Conclusão

A formação de brotações, foi encontrada em todas as concentracões de TZD incorporado no meio de cultivo. Com isso sugerem-se maiores estudos com esta nova citocinina em pimentão no intuito de determinar melhor seu efeito em explantes de "seedlings" e buscando uma otimização da micropropagação nesta cultura.

4.5. BIBLIOGRAFIA

01. AGRAWAL, S. & CHANDRA, S.L. Differentiation of multiple shoot, buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. Current Science, New Delhy, 52(13):645-6, 1983.

02. ————; ———— & KOTHART, S.L. Plant regeneration in tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L. c.v. Mathania). Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 16:47-55, 1989.

03. ————; ———— & ————. Shoot tip culture of pepper for micropropagation. Current Science, New Delhy, 57(24):1347-9, 1988.

04. BATES, S.; PREECE, J.E.; NAVARRENTE, N.E.; VAN SAMBEEK, J.W. & GAFFNEY, G.R. Thidiazaron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus americana* L). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 31:21-30, 1992.

05. ELLIS, D.D., BARCZYNSKA, H., McCOWN, B.H. & NELSON, N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 27:281-7, 1991.

06. ELSTNER, E.F. KELLER, G. & PARADIES, I. Contrasting effects of the cotton defoliant thidiazuron and aminoethoxyilinylinylglycine, an inhibitor of ethylene formation on stomatal aperture and on ethylene formation in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. Ber Deutsch Botanische Gesellschaft, Stuttgart, 96:459-67, 1983.

07. FARI, M. & CZAKO, M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hipocotyl explants cultured in vitro. Scientia Horticulturae, Amsterdan, 15(3):207-13, 1981.

08. FELLMAN, C.D., READ, P.E. & HOSIER, M.A. Effects of thiadiazuron and CPPU on meristera formation and shoot proliferation. HortScience, Riverside, 22(6):1197-200. 1987.

09. FIOLA, J.A., HASSAN, M.A., SWARTZ, H.J., BORS, R.H. & McNICOLS, R. Effects of thiadiazuron, light fluence rater and Kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, 20:223-8, 1990.

10. GUNAY, A.L. & RAO, P.S. In vitro plant regeneration from Hipocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). Plant Science Letters, Limerick, 11:365-72, 1978.

11. HAYASHI, K.; YANG, Z.Q. & KATO. The effects of cotyledon explant and culture conditions in vitro of adventitious buds in red pepper. Research Reports of the Kochi University Agricultural Science, Kochi, 37:153-69, 1988.

12. HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., eds. Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding, New York, McMillan Publishing Company, 1983. v.1, p.117-227.

13. KERNS, H.R. & MEYER, M.M. In vitro propagation of red silver hybid maples. HortScience, Riverside, 20:593, 1985. (Abstracts).

14. MOK, M.C. MOK, D.W.S, ARMSTRONG, D.J., SHUDO, K., ISOGAI, Y & OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl-N' - 1,2,3 - Thiadiazol-5-ylurea (thiadizuron). **Phytochemistry**, Elmsford, 21:1509-11, 1982.

15. NIEWKERK, J. P. VAN, ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple proliferation in vitro. HortScience, Riverside, 21:516-8, 1986.

16. PHILLIPS, G.C. & HUBSTENBERGER, J.F. Organogenesis in pepper tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 4:261-9, 1985.

17. Q. GUANG, Y.; READ, P.E.; FELLMAN, C.D. & HOSIER, M.A. Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on chinese chesnut cultured in vitro. HortScience, Riverside, 21:133-4, 1986.

18. SRIPICHITT, P.; NAWATA, E. & SHIGENAGA, S. "In vitro" shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). Japanese Journal Breeding, 37:133-42, 1987.

19. SUBHASH, K. & CHRISTOPHER, T. Direct plantlet formation in cotyledon cultures of *Capsicum frutecens*. Current Science, New Delhy, 57(2):99-100, 1988.

20. SUTTLE, F.C. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thiadiazuron. Plant Physiology, Copenhagen, 78:272-6, 1985.

21. SWAMY, T.C.N. Tissue culture multiplication of chilles (*Capsicum annuum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). Thesis Abstracts, Bangalore, 9(4):340-1, 1983.

22. TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. Técnicas e Aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990 433p.

23. ZAERR, J.B. & MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds. 1985. Tissue culture inforestry. 2.ed. Dordrecht, Martinus Nijhoff Bublshers, 1985. p.231-55.

CAPÍTULO V

USO DE ESTACAS E MICROESTACAS PARA A PROPAGAÇÃO DE PIMENTÃO

CAPÍTULO V - USO DE ESTACAS E MICROESTACAS PARA A PROPAGAÇÃO DE PIMENTÃO

RESUMO - Na tentativa de aumentar a taxa de multiplicação foram testados alguns tratamentos para propagação vegetativa "in vivo" de pimentão (*Capsicum annuum* L. cv. Agronômico 8) via estaquia e microestaquia. Para estaquia, as estacas foram retiradas de plantas com aproximadamente 50 dias de idade, sendo de dois tipos apicais e basais. Para estacas apicais o melhor tratamento foi a imersão por 3 horas em solução de AIB (225 mg/L) e para as basais 6 horas em AIB (225 mg/L). Para microestaquia plantas com diâmetro do caule de 3 a 5 mm foram utilizadas, e retirados três tipos de microestacas: basais, medianas e apicais, todas com uma gema. As microestacas basais enraizaram bem, sendo que, a imersão por 3 horas em AIB (15 mg/L) foi o melhor tratamento. As microestacas medianas e apicais tiveram o índice de sobrevivência muito baixo o que nos leva a concluir, que é necessário desenvolver mais estudos antes que se chegue a aconselhar o uso de microestacas para aumentar a taxa de multiplicação em pimentão.

5.1. REFERENCIAL TEÓRICO

STOLTZ (1967), em trabalhos com as cultivares de crisântemo 'Mrs Roy' e 'Briaft Golden Anne', considerados respectivamente de difícil e fácil enraizamento de estacas, constatou a relação entre o conteúdo de carboidratos e a formação de raízes, salientando que a baixa capacidade de enraizamento da cultivar 'Mrs Roy' seria devido ao baixo teor de carboidratos.

Para BOJAREZUR (1978), a diferença na capacidade de formação de raízes nas estacas pode ser em virtude das diferenças no seu conteúdo de compostos fenólicos, e estes viriam a atuar de modo sinérgistico ou antagônico no enraizamento. Suas afirmativas baseam-se em estudos sobre substâncias endógenas no enraizamento da espécie *Syringa vulgaris* L.

Embora as estacas de diferentes espécies respondam diferentemente ao meio de enraizamento utilizado, o meio deve favorecer à formação de um sistema radicular bem ramificado, delgado e flexível (CARLSON, 1966). O substrato deve apresentar características físicas apropriadas, ou seja, boa capacidade de retenção de água, porosidade suficiente para permitir boa aeração e ser livre de patógenos.

A umidade também é muito importante para a propagação vegetativa, uma vez que, a sua deficiência, pode conduzir ao

insucesso do enraizamento e até mesmo, ao dessecamento e morte das estacas. A nebulização, segundo Hess, citado por HSU & HIRINCHS, (1958), mantém a umidade em volta das folhas, diminuindo-lhes a pressão de vapor e reduzindo as taxas de respiração e transpiração, circunstâncias que mantém as estacas vivas até a formação de raízes. Ainda conforme o autor a nebulização intermitente é preferível à contínua, uma vez que na primeira evita-se o excesso de água no meio de enraizamento.

Há também, o efeito benéfico da luz, pelo menos até um certo nível de irradiação, (HOWARD & SYKES, 1966). No enraizamento de estacas caulinares foliadas, os produtos da fotossíntese são importantes na iniciação e crescimento das raízes, enquanto nas sem folhas, o enraizamento depende do teor de carboidratos acumulados na estaca. (HARTMANN & KESTER, 1976).

DUSTAN & TURNER, (1984), trabalhando com enraizamento em estacas de macieira, utilizaram a imersão da parte aérea em ácido indolbutírico (AIB) onde conseguiram bom resultados de enraizamento. Este experimento foi realizado em ambiente com umidade relativa igual ou superior à 90% e mantendo-se a temperatura do substrato entre 18 e 20 °C sendo, a temperatura do ar de 13 a 18 °C durante 35 a 40 dias (no inverno).

SULTANBAWA & PHATAK, (1991), estudando um mutante de pimenta ornamental, *Capsicum* spp., trabalharam com microestaquia "in vivo" e "in vitro". No estudo "in vivo" utilizaram segmentos caulinares com duas gemas, com

aproximadamente 2 a 4 milímetros de diâmetro e sem folhas. Obtiveram o melhor resultado com 40% de estacas enraizadas quando trataram as microestacas com ROOTONE e colocadas em sacos plásticos contendo como substrato o PROMIX-BX. "In vitro" os melhores resultados foram na ausência de reguladores de crescimento. Concluiram neste trabalho que a umidade tanto "in vitro" como "in vivo" é o fator mais importante para o enraizamento da espécie em estudo.

Já SEDIYAMA et alii, (1991), trabalhando com *Capsicum paetermissum* L. e avaliando o efeito do tratamento de imersão de estacas em soluções aquosas de ANA e AIB, em várias concentrações não obtiveram diferenças significativas para número de raízes e plantas sobreviventes, mas, observaram que o comprimento de raízes aumentava linearmente e o número de sobreviventes reduziu de forma quadrática com o aumento das concentrações de AIB e já como aumento das concentrações de ANA, observou que o número de folhas, brotações e estacas vivas diminuiram.

5.2. ENRAIZAMENTO DE ESTACAS

5.2.1. Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar dois

tipos de estacas (basal e apical) retiradas de plantas cultivadas em casa de vegetação, quanto ao enraizamento quando submetidas ao pré-tratamento de imersão em soluções de AIB.

5.2.2. Material e métodos

Sementes de Pimentão Agronômico 8 foram plantadas em bandejas de isopor de 128 células com substrato PLANTIMAX e uma semente por célula. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas duas vezes ao dia. Com dois pares de folhas os "seedlings" foram transplantados para sacos de polietileno preto de 5 litros contendo como substrato, uma mistura de terra, areia e esterco de galinha na proporção de 2:1:1, suplementado com superfosfato simples (300 g/20 litros de mistura) e calcário dolomítico (300 g/20 litros de mistura). Daí em diante, foram mantidos em casa de vegetação sob nebulização intermitente.

As plantas foram coletadas, 30 dias após o transplantio, com corte feito logo acima do nó cotiledonar. As plantas foram divididas ao meio formando duas estacas denominadas por nós de apical e basal. As folhas foram seccionadas na metade do limbo com o objetivo de diminuir a transpiração. Estas estacas foram tratadas em imersão, em solução aquosa suplementadas com AIB em diferentes

concentrações (0; 25; 75; 225 mg/L) e em dois tempos (3 e 6 horas). Após o tratamento, as estacas, foram colocadas em saquinhos 15 e 8 cm (1 por saquinho), tendo como substrato areia fina. O experimento foi montado sobre uma bancada na casa de vegetação, sob SOMBRITE 70% e em regime de nebulização intermitente. O experimento foi montado segundo o modelo de delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 (2 tempos x 4 concentrações de AIB) (para cada tipo de estaca), com 3 repetições e 4 estacas por repetição.

Aos 15 e aos 30 dias após a montagem do experimento foram feitas irrigações com solução nutritiva (¼ dos sais do meio MS). Aos 45 dias foi avaliado o experimento e avaliados os parâmetros.

5.2.3. Resultados

Foram feitos experimentos em separado para cada tipo de estaca, pois o interesse deste trabalho é determinar um melhor tratamento para cada tipo de estaca, já que os dois devem ser utilizados para aumentar a taxa de multiplicacão. O parâmetro avaliado foi o peso fresco de raízes um reflexo da eficiência dos tratamentos em promover enraizamento.

Para estacas apicais, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os dois tempos de

imersão. O uso de AIB na concentracão de 225 mg/L foi estatisticamente superior aos demais concentrações (QUADRO 10).

Para estacas basais houve diferença estatística entre os tempos de imersão sendo que o de 6 horas foi superior ao de 3 horas. Então dentro do tempo de 6 horas a concentração que se mostrou estatisticamente superior foi a 225 mg/L de AIB.

QUADRO 10 - Resumo da análise de variância do peso fresco de raízes de estacas apicais submetidas à diferentes concentrações de AIB e tempos de imersão.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância
Tempo	1	2,31 ns
AIB	3	23,83 **
Tempo X AIB	3	5,84 *
Resíduo	16	1,20
C.V. (%)		30,60

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.
** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 11 - Resumo da análise de variância do peso fresco de raízes de estacas basais submetidas à diferentes concentrações de AIB e tempos de imersão.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância
Tempo	1	59,84 **
AIB	3	29,23 **
Tempo X AIB	3	34,09 **
Resíduo	16	2,75
C.V. (%)		18,00

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

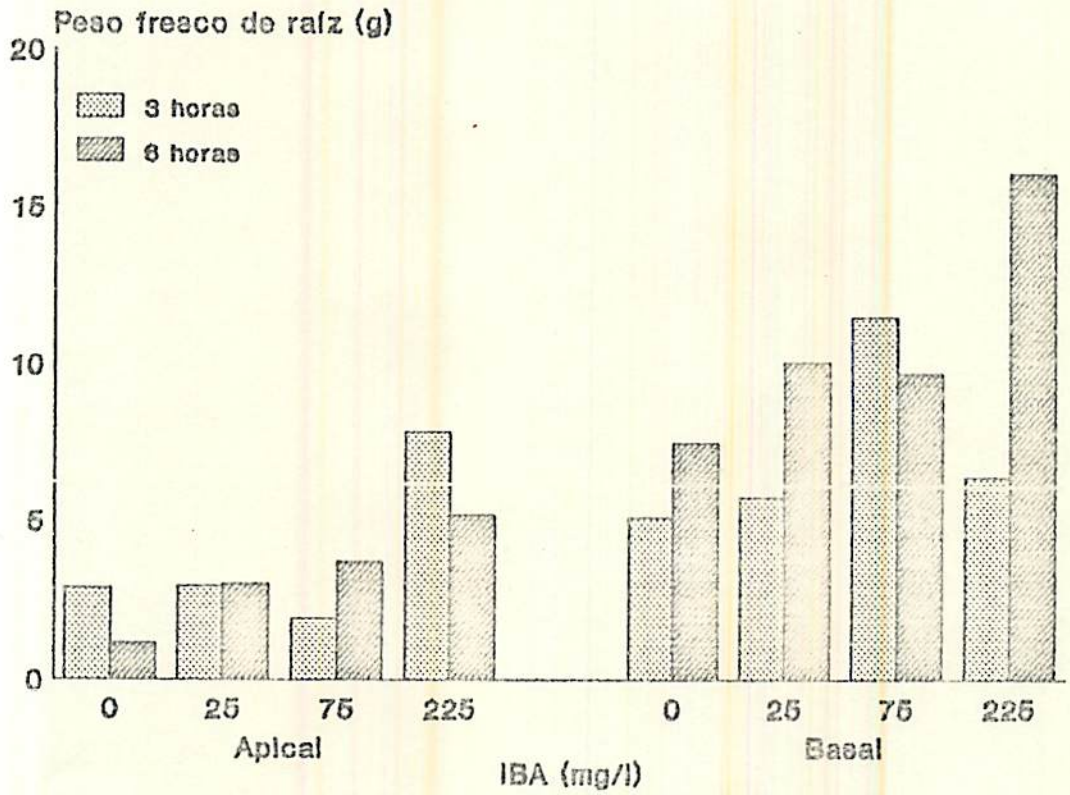

FIGURA 08 - Histograma representativo do peso fresco de raízes de dois tipos de estacas de pimentão *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8 em resposta a diferentes tratamentos de pré-imersão em soluções de IBA por dois tempos.

5.3. ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS

5.3.1. Objetivo

Avaliar a resposta quanto ao enraizamento de microestacas caulinares tratadas com imersão em soluções de AIB no intuito de aumentar a taxa de multiplicação.

5.3.2. Material e métodos

Sementes de pimentão Agronômico 8 foram plantadas em bandejas de isopor de 128 células, com substrato PLANTIMAX e uma semente por célula. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas duas vezes ao dia. Com dois pares de folhas os "seedlings" foram transferidos para sacos de polietileno preto de 5 litros contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco de galinha na proporção de 2:1:1, suplementados com superfosfato simples (300 g/20 litros de mistura) e calcário dolomítico (300 g/20 litros de mistura). Daí em diante foram mantidos em casa de vegetação sob nebulização intermitente.

Quando o caule atingiu 3 a 5 mm de diâmetro em média as plantas foram coletadas e seccionadas em microestacas de

forma que, cada estaca, tivesse 1 gema. As estacas foram separadas em basais, medianas e apicais. As folhas foram retiradas e a estaca apical ficou apenas com as folhas que estavam iniciando a formação. Posteriormente foram tratadas em imersão em solução aquosa suplementada com AIB em diferentes concentrações (0; 5; 45; 135 mg/L) e dois tempos de imersão (1 e 3 horas). Após o tratamento, as microestacas foram plantadas em saquinhos plásticos tendo como substrato areia fina. O experimento foi montado sobre bancada em casa de vegetação, sob SOMBRITE 70% ficando ainda sob regime de nebulização intermitente. O experimento foi montado segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, para cada tipo de microestaca, com 3 repetições e 4 estacas por repetição.

Aos 15 e aos 30 dias após a montagem do experimento foram feitas irrigações com solução nutritiva (1/4 dos sais do meio M.S.) na tentativa de suplementar nutricionalmente as micro estacas.

As avaliações foram feitas aos 45 dias após a montagem do experimento e os parâmetros relacionados foram: sobreviventes, enraizadas e comprimento de raizes.

5.3.3. Resultados

Foram também feitas, neste experimento, análises estatísticas separadamente para cada tipo de estaca utilizada. O parâmetro avaliado foi o comprimento médio de raízes por estaca. Para estacas basais houve diferença significativa entre os tempos de imersão, sendo que o tempo de 3 horas foi superior ao tempo de 1 hora. Dentro do tempo de três horas a única concentração que deferiu das demais e se mostrou inferior às outras foi à 5 mg/L.

Para estacas medianas não houve diferenças estatísticas entre os tempo de imersão e nem entre as concentrações de AIB.

Para estacas apicais o tempo de 3 horas não foi analisado devido a não sobrevivência de nenhuma das estacas e no tempo de 1 hora não houve diferença significativa quanto ao enraizamento de estacas.

QUADRO 12 - Microestacas sobreviventes, enraizadas e comprimento médio de raízes de três tipos de estacas: basais, medianas e apicais submetida a tratamento com AIB em diferentes concentrações por dois tempos.

APICAL

Tempo (horas)	AIB (mg/L)	Sobreviventes (%)	Enraizados (%)	Comprimento médio de raiz (cm)
	0	25,00	0	0
	5	50,00	25,00	2,008
1	15	8,33	8,33	0,358
	45	33,33	25,00	4,542
	135	8,33	8,33	3,325

MEDIANA

Tempo (horas)	AIB (mg/L)	Sobreviventes (%)	Enraizados (%)	Comprimento médio de raiz (cm)
	0	16,66	16,66	8,683
	5	50,00	33,33	4,242
1	15	16,66	16,66	1,333
	45	33,33	8,33	0,617
	135	8,33	8,33	2,025
	0	41,16	33,33	1,492
	5	33,33	16,66	1,667
3	15	33,33	25,00	2,817
	45	66,66	58,33	6,900
	135	75,00	66,66	14,608

BASAL

Tempo (horas)	AIB (mg/L)	Sobreviventes (%)	Enraizados (%)	Comprimento médio de raiz (cm)
	0	66,66	66,66	20,960
	5	50,00	41,60	9,592
1	15	50,00	50,00	7,208
	45	41,66	33,33	2,883
	135	41,66	33,33	4,200
	0	83,33	75,00	29,467 A[1]
	5	100,00	91,66	16,175 B
3	15	100,00	100,00	32,775 A
	45	91,66	91,66	28,425 A
	135	91,66	91,66	28,825 A

(1) Teste de Tukey ao nível de 1%.

QUADRO 13 - Resumo da análise de variância do comprimento médio das raízes das microestacas basais submetidas à diferentes concentrações de AIB e tempos de imersão.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Tempo	1	40,25 **
AIB	4	2,25 **
Tempo X AIB	4	2,57 **
Resíduo	20	0,15
C.V. (%)		9,70

[1] Dados transformados para raíz de (x + 0,5).
** Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 14 - Resumo da análise de variância do comprimento médio de raízes das microestacas medianas submetidas à diferentes concentrações de AIB e tempos de imersão.

Causas de variação	Gl	Quadrados médios e significância[1]
Tempo	1	2,78 ns
AIB	4	1,01 ns
Tempo X AIB	4	3,49 *
Resíduo	20	0,89
C.V. (%)		49,48

[1] Dados transformados para raíz de (x + 0,5).
* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 15 - Resumo da análise de variância do comprimento médio das raízes de microestacas apicais submetidas imersão por uma hora em diferentes concentrações de AIB.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância[1]
AIB	4	0,85 ns
Resíduo	10	0,84
C.V. (%)		69,51

[1] Dados transformados para raiz de (x + 0,5).

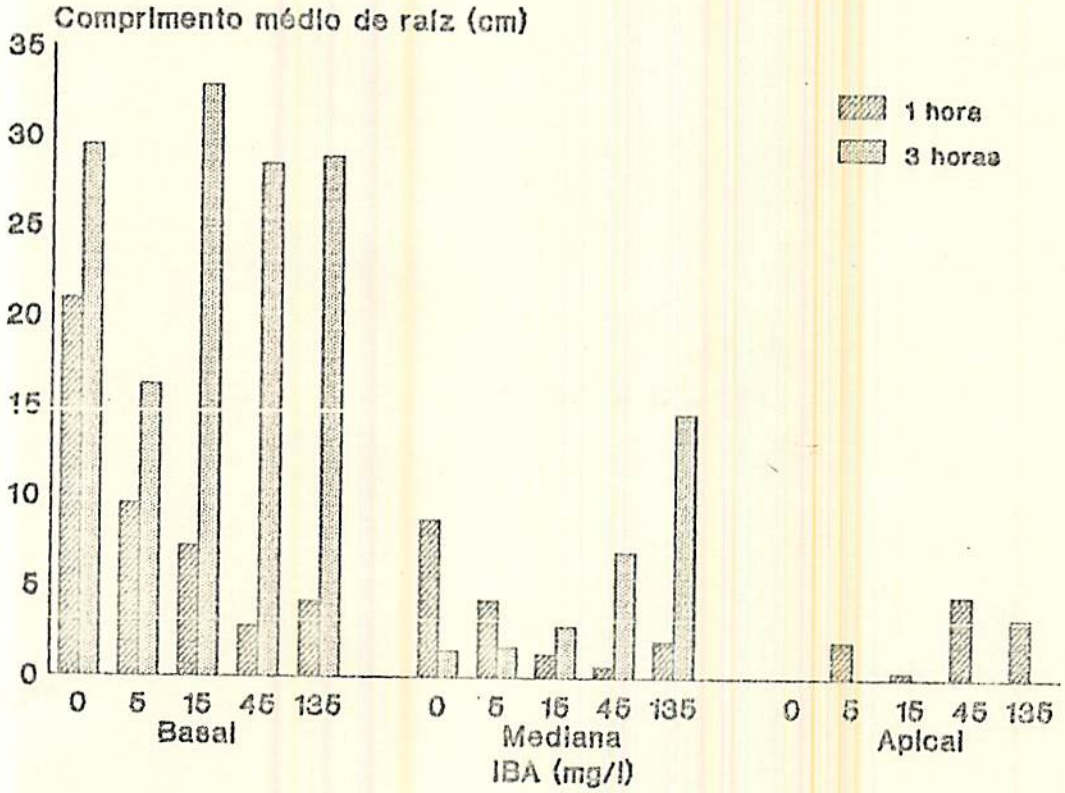

FIGURA 9 - Histograma representativo do comprimento médio de raízes de três tipos de microestacas submetidas à diferentes tratamentos de pré-imersão em soluções de AIB por dois tempos.

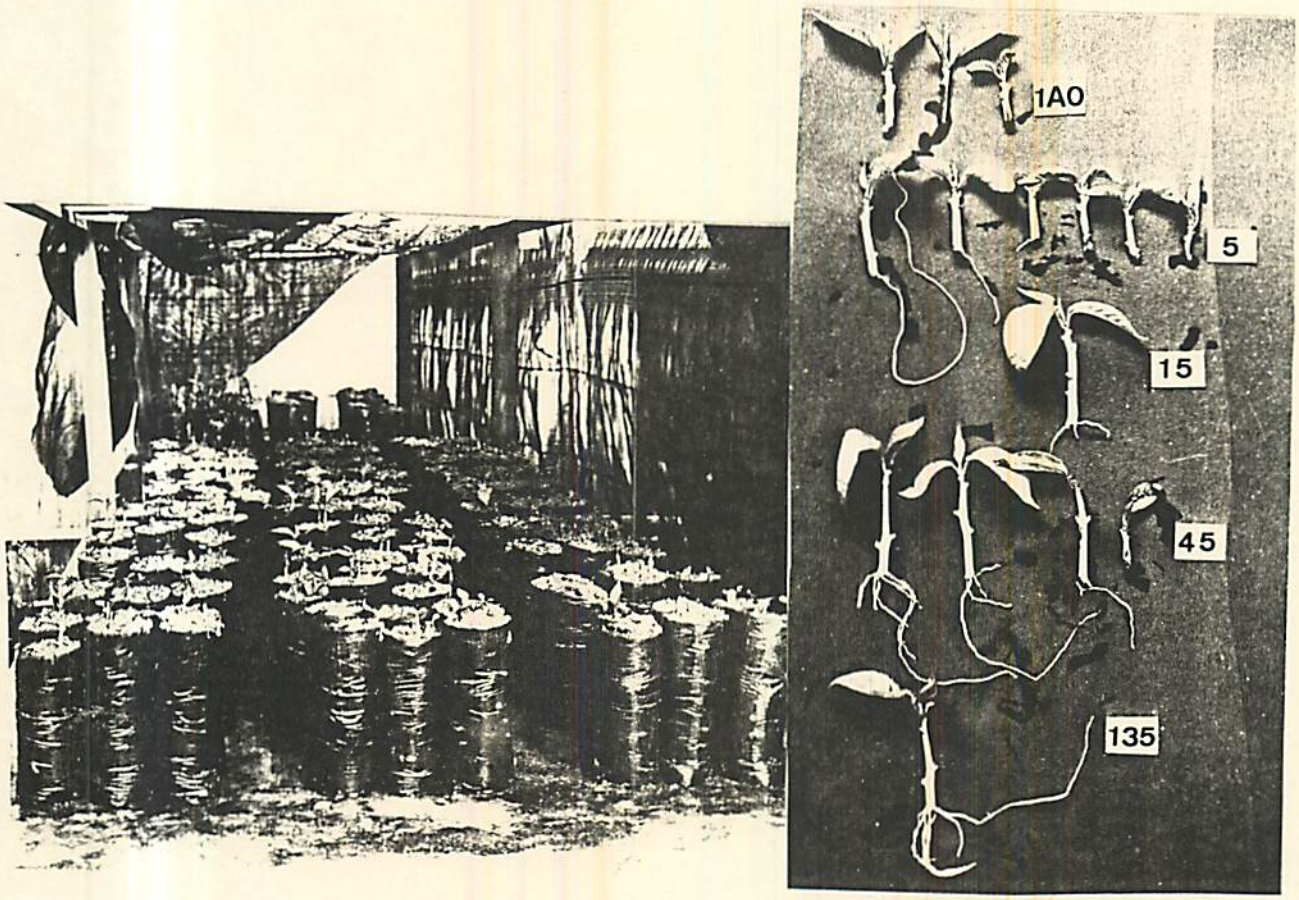

FIGURA 10 - Representação fotográfica da vista geral do experimento montado em casa de vegetação e dos resultados de enraizamento de microestacas apicais de pimentão *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8 submetidas à diferentes tratamentos de pré-imersão em soluções de AIB no tempo de uma hora.

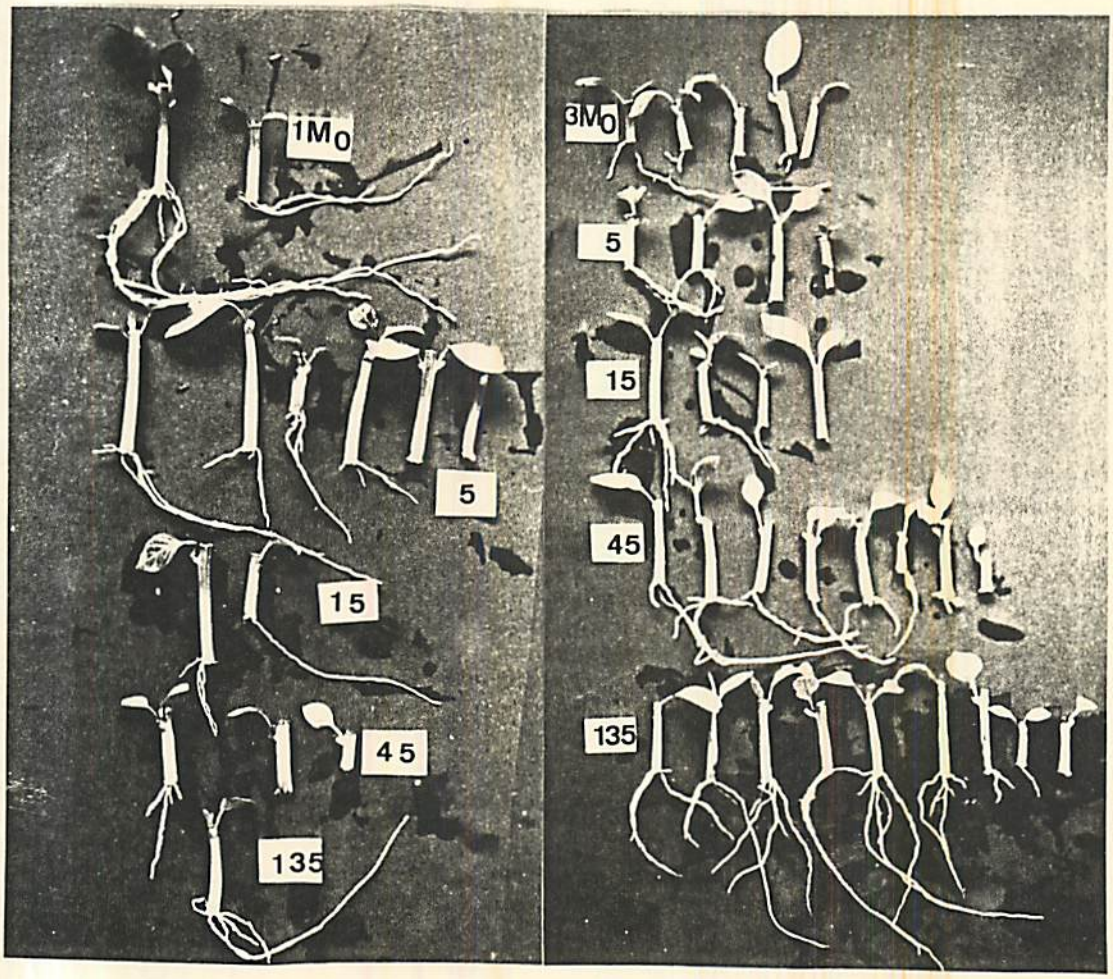

FIGURA 11 - Representação fotográfica dos resultados de enraizamento de microestacas medianas de pimentão *Capsicum annuum* L. cv Agronômico 8 submetidas à diferentes tratamentos de pré-imersão em soluções de AIB por dois tempos (1 e 3 Horas).

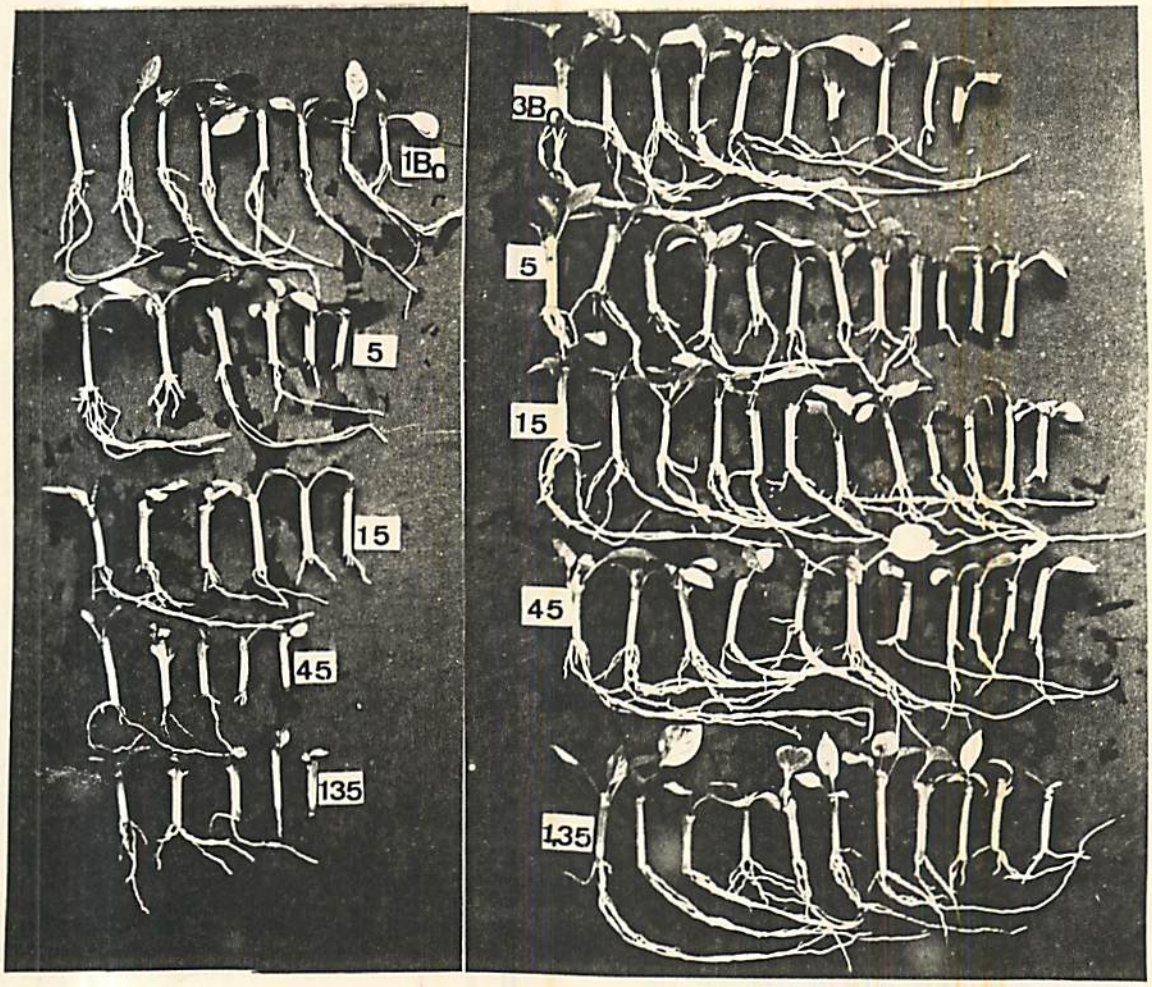

FIGURA 12 - Representação fotográfica dos resultados e enraizamento de microestacas basais de pimentão ***Capsicum annuum*** L. cv Agronômico 8 submetidas à diferentes tratamentos de pré-imersão em soluções de AIB por dois tempos (1 e 3 Horas).

5.4. DISCUSSÃO

Os resultados experimentais nos mostraram que, no enraizamento de estacas, as condições ambientais são muito importantes para seu sucesso. Segundo Hess citado por HSU & HIRINCKS (1958), a umidade elevada em torno das folhas manteve vivas as estacas para que elas possam enraizar o que foi confirmado em nosso trabalho. Para manter esta umidade alta utilizamos a nebulização intermitente. O substrato areia fina foi utilizado por possuir algumas características importantes para um bom enraizamento como o recomendado por CARLSON (1966), que o substrato deve permitir a formação de raizes ramificadas, delgadas e flexíveis. A utilização do SOMBRITE 70% favoreceu ao bom desenvolvimento do enraizamento confirmando o relatado por HOWARD & SYKES (1966). A diminuição efetuada na área foliar parece ter sido suficiente para reduzir a transpiração ao mesmo tempo em que manteve a produção de compostos através da fotossintese para suprir as necessidades do enraizamento confirmando o relatado por HARTMANN & KASTER (1976).

A utilização da imersão das estacas em solução de AIB produziu boa resposta para enraizamento confirmando os relatos de DUSTAW & TURNER (1984), trabalhando com macieira. No pimentão Agronômico 8 a utilização da imersão das estacas em AIB (225 mg/L) foi superior as demais; embora nas apicais o tempo de imersão deve ser por 3 horas enquanto nas basais, 6

horas. Em *C. pactermissum*, isto não ocorreu pois SEDIYAMA et alii (1991), não encontraram diferenças no enraizamento (número de raizes e sobreviventes) quando utilizaram a imersão de estacas em soluções de AIB.

Nas mesmas condições ambientais o experimento de microestacas foi montado e observou-se que a sobrevivência teve um decréscimo em relação aos diferentes tipos de micro estacas da basal para apical ou seja quanto mais tenra (tecido mais jovem) a microestaca menor foi a sobrevivência. Este fato pode talvez ser explicado pelos relatos de SOLTZ, (1967), que concluiu que o conteúdo de carboidratos em estacas sem folhas têm grande influencia no enraizamento para suprir as necessidades nutricionais nesta fase.

SULTANBAWA & PHATAK (1991), trabalhando com uma pimenta ornamental da mesma espécie do Agronômico 8 e com microestacas de diâmetros semelhantes às utilizadas por nós, obteve resultados muito baixos (40%) no enraizamento mesmo com a utilização de ROOTONE, um produto que contém misturas de reguladores de crescimento, e concluiu que a umidade é o fator mais importante para enraizamento de microestacas.

5.5. CONCLUSÃO

Devido a baixa sobrevivência das microestacas apicais

seguidas das medianas em nosso trabalho concluimos que o uso de microestacas em larga escala para proporcionar maiores taxas de multiplicação na produção de mudas precisa ainda de maiores estudos para ser recomendadas mesmo que bons resultados no enraizamento de microestacas basais. Sugerimos porém a utilização de estacas apicais e basais para aumentar a taxa de multiplicação, minimizando os custos da propagação vegetativa do macho esteril de pimentão.

5.6. BIBLIOGRAFIA

01. BOJAREZUR, K. Studies on endogenous rhizogenic substances during the process of rooting lilae (*Syringa vulgaris* L.) cuttilngs. Plant Propagation, 24(4):3-6, 1978.

02. CARLSON, R.F. Factors influencing root formation in traditional culture of fruit trees. Quartely Bulletin Michigan Agricultural Experimental Station, East Lansing, 48(3):449-54, 1966.

03. DUNSTAN, D.I. & TURNER, R.E. The aclimatization of micropropagated plants. In: VASU, I.R., ed. Cell culture and somatic cell genetics of plants, Laboratory procedures and their applications. Orlando, Academic Press, 1984. v.1, n.15, p.123-9.

04. HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. Propagacion de plantas: princípios y pratica. Mexico, Editorial Continental, 1976. 810p.

05. HOWARD, B.H. & SYKES, J.T. Regeneration of the hop plant (*Humulus lupulus* L.) from soltwood cuttings. II Modification of the carboydrate resources within the cuttings. Journal Horticultural Science, Asford, 41:155-63. 1966.

06. HSU, C.S. & HINRICHS, H.A. Rooting response of dwarl apple cuttings under intermittent mist. Proceedings of American Society for Horticultural Science, College Park, 72:15-22. 1958.

07. SEDIYAMA, M.A.N.; CASALI, V.W.D.; CARDOSO, A.A. & SEDIYAMA, T. Uso de substâncias reguladoras de crescimento no enraizamento de *C. praternussum* Heizer G. Emith. Horticultura Brasileira, Brasília, 9(1):57, 1991.

08. STOLTZ, L. Factores influencing moot initiation in a easy and difficult-to-root Chrysanthemun. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, College Park, 89:734-43, 1967.

09. SULTANBAWA, F. & PHATASE, S.C. Propagation of sterile ornamental pepper by cuttings and "in vitro" shoot-tip culture. HortScience, Riverside, 26(8):1078, 1991.

CAPITULO VI

CONCLUSÕES GERAIS

[redacted]

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES GERAIS

Durante o desenvolvimento desse trabalho nós tentamos desenvolver uma metodologia para a propagação "in vitro" e "in vivo" de pimentão, visando a micropropagação e manutenção de linhas macho-estéreis para auxiliar no programa de melhoramento da ESAL.

Primeiramente trabalhamos com as sementes para obtenção uniforme da germinação. Notamos que o pré-tratamento da semente foi muito importante para homogeneizar a germinação. Também concentramos nossos esforços em diferentes tipos de materiais para serem propagados vegetativamente. Nós encontramos evidências que, o tipo de explante é muito importante no processo de regeneração "in vitro". É interessante notar que o cotilédone é um tecido com alta capacidade morfogenética, principalmente do lado do pecíolo. Uma evidência muito importante no processo de morfogênese, foi a idade do explante. Em outras palavras, quando o "seedling" desenvolvia o tecido cotiledonar ia perdendo a capacidade morfogenética, talvez, pelo dreno de matabólitos para o

desenvolvimento e crescimento do "seedling". A indução do explante com reguladores de crescimento (BAP, AIA e ANA) foi também interessante. Notamos um melhor desenvolvimento, ou seja, uma regeneração de brotos, no uso de BAP combinado com AIA, e quando usamos o ANA ocorria maior proliferação de calos, talvez devido a interação entre os metabólitos endógenos com exógenos para a indução de calos ou a destruição do AIA pela fotooxidação (luz). A proliferação de brotos também foi avaliada com um novo regulador de crescimento (Tidiazuron). Notamos que o uso desse novo regulador de crescimento, em baixas concentrações, é ativo na indução de brotos.

No estudo usando estacas e microestacas para a propagação vegetativa, nós encontramos que a posição do material e a concentração dos reguladores de crescimento são importantes para a regeneração das raízes. Neste trabalho nós achamos que o uso de microestacas poderá ser usado quando utilizarmos as microestacas basal e mediana, enquanto na apical o índice de sobrevivência é quase nulo. Com respeito à estaca, há também uma tendência melhor para as estacas basais.

Baseado em nosso trabalho, linhas de pesquisa ainda necessitam ser mais desenvolvidas. O estudo de uma metodologia para o alongamento e individualização das brotações ainda é necessário. Um estudo adicional seria quanto ao processo de aclimatação das plântulas para a produção em grande escala das linhas macho-estéreis. A correlação bioquímica entre o explante e a idade de regeneração de brotos precisa ser melhor

entendida. O processo de organogênese entre plantas macho-estéreis e não macho-estéreis também precisa ser estudado. Portanto, muitas questões ainda precisam ser respondidas, entretanto, uma questão muito importante e trabalhosa precisa ser dirigida para identificação e seleção do macho-estéril, ainda na fase de "seedling", "in vivo" ou "in vitro".

RESUMO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE PIMENTÃO *Capsicum annuum* L. ATRAVES DE METODOS "IN VITRO" E ESTACAS

Alguns fatores que influenciaram a capacidade de explantes de "seedlings" de pimentão (*Capsicum annuum* L. cv. Agronômico 8) de formarem brotações "in vitro" foram investigados. O pré-tratamento de sementes foi estudado e o melhor pré-tratamento foi em água por 20 horas para um aumento na germinação e melhor uniformidade quando estas foram cultivadas em meio M.S. com metade dos sais e no escuro por 7 dias. Cotiledone seccionado (1/3 do limbo) foi o melhor explante para formação de multiplos brotos quando cultivados em BAP. Quando estes explantes foram cultivados em BAP combinado com AIA induziu maior formação de brotos em AIA (1,0 mg/L) com BAP (4,0 mg/L). Quando se combinou com ANA houve uma inibição de formação de brotos. O maior número de brotos por explante foi encontrado em cotilédones seccionados (6 a 7 dias de idade do "seedlings") ou seja os mais jovens. Quando nós testamos o

efeito de TZD em comparação com BAP achamos que o TZD é mais efetivo que o BAP para brotações em cotilédone. A propagação utilizando estacas também foi investigada estas estacas foram retiradas de plantas com 50 dias de idade e o efeito do AIB foi estudado. Para estacas apicais o AIB (225 mg/L) por 3 horas foi o melhor para enraizamento e para estacas basais AIB (225 mg/L) por 6 horas foi o melhor para enraizamento quando cultivadas em casa de vegetação e plantadas em areia fina.

ABSTRACT

PROPAGATION OF *Capsicum annuum* L. IN VITRO AND BY CUTTINGS

Some of the factors wich influence the in vitro shoot forming capacity of seedling explants of bell pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Agronômico 8) were investigated. Seed priming was studied and preming of seed in water for 20 hours was the best priming treatment for increased rate of germination and best uniformity when cultured in half-stength M.S. medium in dark for seven days. Trimmed cotyledon (the distal one third portion of the blade was removed) explant was the best for mutiple shoot formation when cultived with BAP. When cultived this explant with BAP combined with IAA tended to induced more shoot forming at IAA (1,0 mg/L) and BAP (4,0 mg/L). When combined with NAA tended to inhibit shoot formation. The largest number of shoots per explants was founded in de younger trimmed cotyledon (6 and 7day-old-seedlings). When compared, with BAP, TZD was more effective for the cotyledon shoot formation.

Propagation by cuttings was also investigated in defficients types of cuttings (50 day-old plants). Best rooting was obtained by treating cuttings with IBA at 225 mg/L for 3 hours (apical cuttings) or 6 hours (basal cuttings) immersion followed by placement in green house on a fine sand substrate.