

EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO E TIPO DE EXPLANTES NA MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *CAPSICUM ANNUUM* L.

EFFECT OF GROWTH REGULATORS AND DIFFERENT EXPLANTS ON *IN VITRO* MORPHOGENESIS OF *CAPSICUM ANNUUM* L.

Márcio Henrique Pereira Barbosa¹
Renato Inneco¹

José Eduardo Brasil Pereira Pinto²
Cesar Augusto Brasil Pereira Pinto³

RESUMO

Explantes apicais, cotiledonares, hipocotiledonares e brotações regeneradas *in vitro* de *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10 foram cultivados em meio (MURASHIGE & SKOOG, 1962)-MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de BAP, adenina e tidiazuron. De acordo com o tipo de explante e reguladores de crescimento, foram obtidas diferentes respostas morfogênicas. De modo geral, meios contendo concentrações mais elevadas de BAP e tidiazuron, promoveram a indução e produção de calos nos explantes provenientes de "seedlings", enquanto que a rizogênese foi favorecida em meios com baixas concentrações de BAP. Múltiplos brotos axilares foram formados somente quando utilizou-se como explante, brotações regeneradas *in vitro*. Os níveis de 26,64 e 39,96µM de BAP possibilitaram a maximização da proliferação em aproximadamente 2,08 e 2,17 novas brotações por explante, respectivamente.

Palavras-chave: pimentão, tidiazuron, 6-Benzilaminopurina (BAP), adenina.

SUMMARY

Apical, cotyledonary, and hypocotyledonary explants and *in vitro* regenerated shoots of *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10 were grown in

(MURASHIGE & SKOOG, 1962)-MS medium, supplemented with different concentrations and combinations of BAP, Adenine and Thidiazuron. According to the explant type and growth regulators used different *in vitro* morphogenetic responses were attained. Generally, culture media having high concentrations of BAP and Thidiazuron promoted induction and yield of calli from seedling explants but rhizogenesis was favored only under low concentrations of BAP. Multiple axillary buds were formed only when the explant *in vitro* regenerated shoots. BAP at 26.64 and 39.96µM maximized proliferation in 2.08 and 2.23 shoots per explant, respectively.

Key words: pepper, thidiazuron, 6-Benzylaminopurine (BAP), adenine.

INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das dez hortaliças mais importante do mercado hortícola brasileiro. O vigor híbrido para essa espécie pode ser explorado (MIRANDA, 1987). As sementes híbridas podem ser produzidas em massa, utilizando a macho esterilidade masculina. A cultura de tecidos, surge como um método alternativo para manutenção e propagação *in vitro* de linhagens macho estéreis e clones selecionados de *Capsicum annuum* (SWAMY, 1983).

¹Engenheiro Agrônomo, M. Sc., doutorando no Curso de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL). Bolsista do CNPq. Caixa Postal 37, 37200-000 - Lavras, MG.

²Professor Titular do Departamento de Agricultura, ESAL, Bolsista do CNPq.

³Professor Adjunto do Departamento de Biologia, ESAL. Bolsista do CNPq.

As primeiras tentativas de regenerar plantas a partir da cultura de tecidos de duas variedades de *Capsicum annuum* e variedades híbridas de *Capsicum frutescens* foram feitas por GUNAY & RAO (1978) empregando o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com várias combinações e concentrações de auxinas e citocininas.

A cultura de pimentão *in vitro* pode ser estabelecida utilizando explantes provenientes de plântulas germinadas em condições axênicas (FARI & CZAKO, 1981; SWAMY, 1983; PHILLIPS & HUBSTENBERGER, 1985; SRIPICHITT et al., 1987; SADHANA AGRAWAL et al., 1989). A escolha do tipo de explante bem como o emprego de um balanço hormonal adequado são fatores determinantes para o sucesso da resposta morfogênética *in vitro* (MURASHIGE, 1974).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do BAP (6-benzilaminopurina), adenina, tidiazuron e tipo de explante sobre a morfogênese *in vitro* de *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10.

MATERIAL E MÉTODOS

Explantes

Sementes obtidas da cultivar Agrônômico 10 *Capsicum annuum*, tiveram a superfície desinfestada com álcool 70% por um minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% por 20 minutos. Posteriormente foram lavadas quatro vezes com água destilada autoclavada. Em câmara asséptica as sementes foram inoculadas em meio MS completo porém, contendo a metade das concentrações dos sais, 0,2% de carvão ativado e solidificado com 0,7% de ágar^a. A germinação das sementes ocorreu uma semana após a inoculação. No 25º dia após a inoculação, as plântulas crescidas na presença de luz branca fria (50µmol/s/m²), fotoperíodo de 16h luz e temperatura de 26 ± 1°C, foram seccionadas de modo que o comprimento dos explantes ficasse em torno de 1,5 a 2,0cm. Os explantes utilizados foram: segmento apical (compreendendo secção acima das gemas cotiledonares), segmento cotiledonar (compreendendo somente as gemas cotiledonares) e segmento hipocotiledonar (compreendendo secção abaixo das gemas cotiledonares). As brotações regeneradas *in vitro* foram utilizadas para instalação de outro ensaio. Estas brotações, foram cultivadas em meio MS por 10 dias e eram constituídas por duas gemas axilares e comprimento entre 1,5 e 2,0cm.

Meio de cultura

Utilizou-se o meio básico descrito por MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com BAP, adenina ou tidiazuron, de acordo com o ensaio. Antes do processo de autoclavagem (121°C, 15psi, 20min), o pH do meio para germinação das sementes e dos meios de cultura suplementados com BAP, adenina ou tidiazuron, foram ajustados para 5,8. Todos os meios de cultura foram solidificados com 7% de ágar.

Ensaio

Realizaram-se três ensaios. No primeiro ensaio adicionou-se ao meio de cultura, em esquema fatorial, as concentrações de adenina (0 - 148 - 296 e 592µM) e de BAP (0 - 2,22 - 4,44 - 8,88 e 17,76µM) utilizando como explantes, os segmentos apicais, cotiledonares e hipocotiledonares. No segundo ensaio, as concentrações de BAP (0 - 13,32 - 26,64 e 39,96µM) foram investigadas empregando somente brotações regeneradas *in vitro*, com duas gemas e comprimento variando entre 1,5 e 2,0cm. Já no terceiro ensaio, os níveis de tidiazuron (0 - 0,001 - 0,01 - 0,1 - 1,0 e 10,0 µM) foram avaliados, utilizando segmentos apicais e cotiledonares como explantes.

Condições de cultivo

Os explantes foram colocados em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10ml de meio de cultura e posteriormente transferidos para câmara de crescimento sob condições controladas de luminosidade (intensidade de 50µmol/s/m² utilizando lâmpada fluorescente branca fria) fotoperíodo (16h luz) e temperatura (26 ± 1°C).

Delineamento experimental

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado para os ensaios onde testaram-se BAP e tidiazuron e inteiramente casualizado, em esquema fatorial, para o ensaio BAP x adenina. Utilizaram-se doze repetições por tratamento.

Avaliação

A avaliação foi feita aos 25 dias de cultura após a inoculação dos explantes, observando-se as seguintes variáveis: formação de calos e de raízes, comprimento de brotos (cm) e número de brotos com mais de 0,5cm de comprimento. Devido a falta e normalidade dos erros experimentais, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (STEEL & TORRIE, 1980 e CAMPOS, 1983) apropriado para delineamentos intei-

ramente casualizados, foi aplicado para a variável número de brotos no experimento onde testou-se BAP.

RESULTADOS

Efeito do tipo de explante na morfogênese

De maneira geral, a utilização de diferentes tipos de explantes de *Capsicum* induziram diferentes respostas morfogênicas *in vitro* (Tabelas 1 e 2). Essas variações foram influenciadas pela utilização de reguladores de crescimento em diferentes concentrações. Observações indicaram que, explantes provenientes de plântulas com 25 dias de idade são mais propícios à formação de calos, provavelmente devido ao balanço hormonal do tecido e, portanto, dificultou a obtenção de múltiplas brotações nesta fase de estabelecimento. Por outro lado, segmentos nodais oriundos de brotações regeneradas *in vitro*, apresentaram pouca formação de calos e uma melhor taxa de regeneração de novos brotos axilares em comparação aos explantes provenientes de "seedlings" (Tabela 3).

Tabela 1. Representação qualitativa da resposta morfogênica *in vitro* de diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP e adenina em *Capsicum annum* cv. Agrônômico 10.

Tipo de explante	BAP (µM)	Adenina (µM)			
		0	148	296	592
Apical*	0,00	○ ■	○ ■	○ ■	○ ■
	2,22	●	●	●	●
	4,44	●	●	●	●
	8,88	●	●	●	●
	17,76	●	●	●	●
Cotiledonar*	0,00	○ ■	○ ■	○ ■	○ ■
	2,22	□	□	□	□
	4,44	□	□	□	□
	8,88	□	□	□	□
	17,76	□	□	□	□
Hipocotiledonar*	0,00	○ ■	○ ■	○ ■	○ ■
	2,22	□	□	□	□
	4,44	□	□	□	□
	8,88	□	□	□	□
	17,76	□	□	□	□

* Observou-se crescimento de brotos a partir de gemas apicais e cotilodenas.
 ○ Formação de raízes; □ Moderada formação de calos;
 ■ Ausência de calos.

Tabela 2. Representação qualitativa da resposta morfogênica *in vitro* de diferentes explantes e concentrações de tidiazuron em *Capsicum annum* cv. Agrônômico 10.

Tidiazuron (µM)	Explant	
	Apical*	Cotiledonar*
0,000	○ ■	○ ■
0,001	○ □	○ ■
0,010	○ □	○ □
0,100	●	○ ●
1,000	△ ●	●
10,000	△ ●	●

* Observou-se crescimento de brotos a partir de gemas apicais cotilodenas.
 ○ formação de raízes
 ● intensa formação de calos com coloração verde claro e de consistência firme;
 □ moderada formação de calos com coloração verde claro e de consistência firme;
 ■ Ausência de calos;
 △ regeneração e brotos a partir de calos.

Tabela 3. Representação qualitativa da resposta morfogênica *in vitro* de brotações axilares e concentrações de BAP em *Capsicum annum* cv. Agrônômico 10.

BAP (µM)	Resposta morfogênica	
0,00	○	■
13,32	△	□
26,44	△	□
39,96	△	□

○ Formação de raízes;
 □ Pouca formação de calos;
 ■ Ausência de calos;
 △ Regeneração de brotos a partir de calos.

Formação de calos

Calos foram induzidos na parte basal dos explantes em contato com o meio. A presença de BAP no meio de cultura promoveu a formação de calos (Tabelas 1 e 3). A utilização de segmentos apicais proporcionou maior formação de calos em relação aos demais tipos de explantes empregados (Tabela 1). De maneira geral, a aderência não influenciou na produção de calos, observando-se um leve efeito somente quando empregou-se explantes apicais nos níveis de

296 e 592 μ M (Tabela 1). O tidiazuron intensificou a formação de calos com o aumento de sua concentração no meio de cultura (Figura 1 e Tabela 2). De modo contrário, as maiores concentrações de tidiazuron, inibiram o crescimento de brotos (Figura 2). Observa-se pelas Figuras 1 e 2, que as medidas de comprimento de brotos e diâmetro de calos foram negativamente associadas.

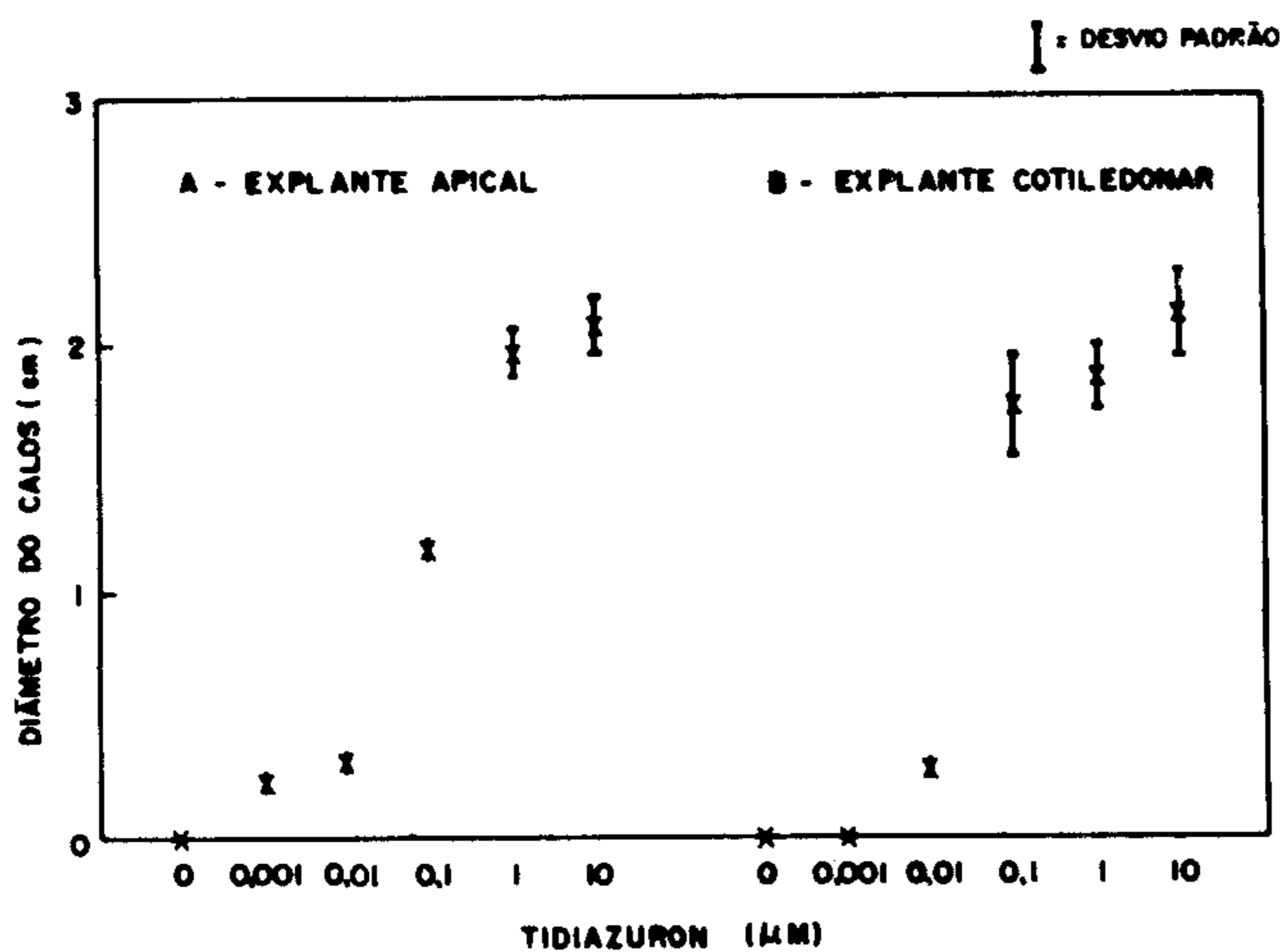


Figura 1. Efeito do tidiazuron sobre o crescimento de calos a partir dos explantes apical e cotiledonar de *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10.

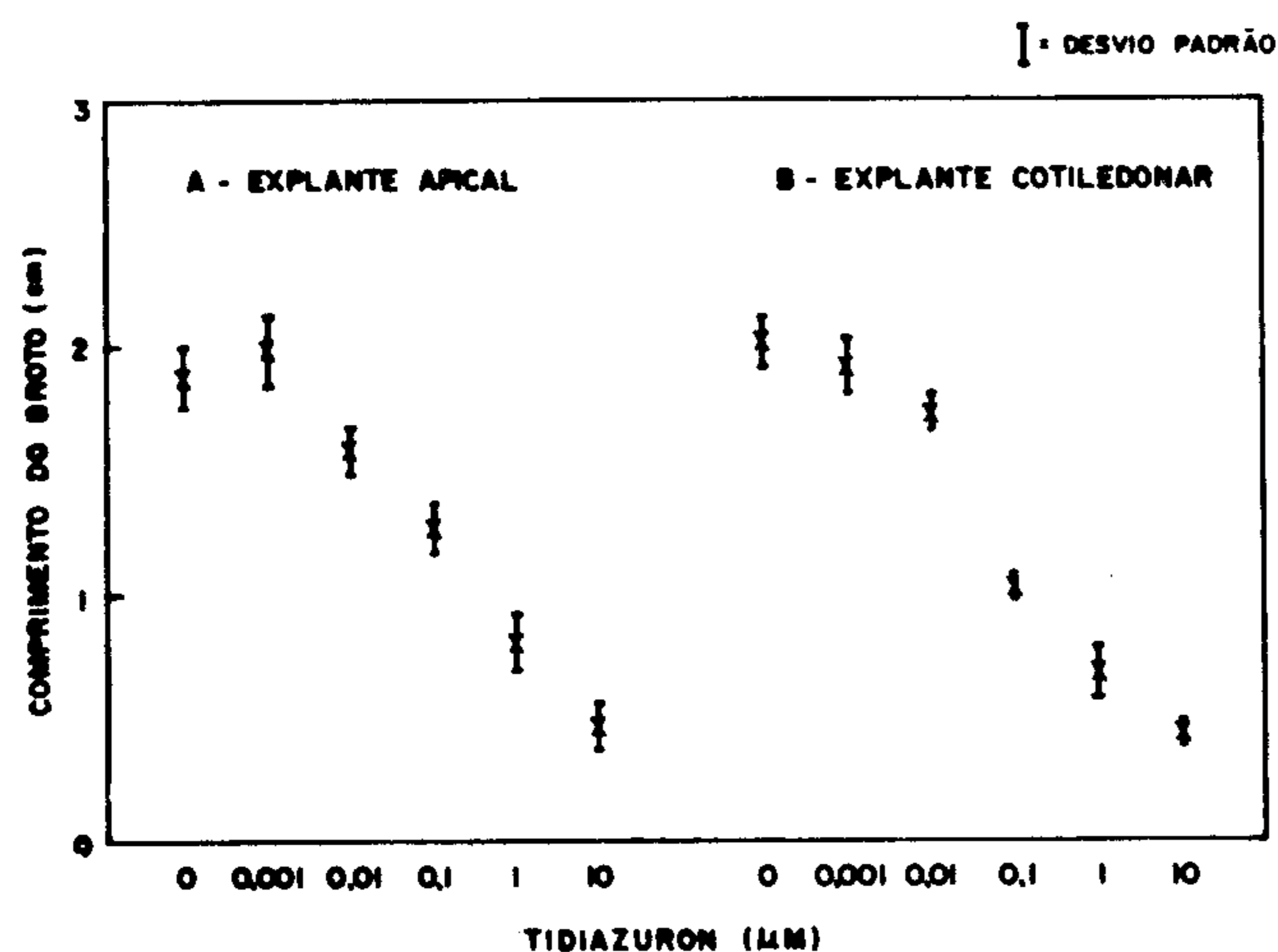


Figura 2. Efeito do tidiazuron sobre o crescimento de brotos a partir dos explantes apical e cotiledonar de *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10.

Formação de brotos

Não houve formação de brotos adventícios na cultura dos segmentos hipocotiledonares (Tabela 1). Cada gema existente nos segmentos apicais ou cotiledonares permitiu o desenvolvimento somente de uma brotação. Nos explantes cotiledonares apenas uma das gemas originou uma ramificação lateral, inibindo o desenvolvimento da gema oposta existente no mesmo explante. Brotos adventícios foram regenerados através do processo indireto (calos) (Tabelas 2 e 3), principalmente quando empregou-se concentrações mais elevadas de BAP e tidiazuron. Estas brotações apresentavam-se com folhas mal formadas evidenciando possível toxidez por reguladores de crescimento ou sais minerais. O aspecto hiperhídrico, conforme descrito por DELBERGH et al. (1992), foi observado para os brotos adventícios regenerados na presença de 1 e 10 μ M de tidiazuron. Múltiplos brotos axilares formados somente quando utilizou-se como explante, brotações regeneradas *in vitro* com duas gemas e comprimento variando entre 1,5 e 2,0cm. Observou-se que as concentrações de 26,64 e 39,96 μ M de BAP proporcionaram a maior produção para número de brotos (Tabela 4). Houve queda de folha dos brotos após 25 dias de cultura *in vitro*.

Tabela 4. Resultado da análise não paramétrica pelo método de Kruskal-Wallis para número de brotos adventícios regenerados a partir de gemas axilares de *Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10.

Estatística de Kruskal-Wallis: $H = 27,48^{***1/}$

Tratamento níveis de BAP (μ M)	Média observada	número de repetições	desvio padrão	média do "RANK" ^{2/}
0,00	0,92	12	0,28	12,0a
13,32	1,25	12	0,43	33,8 b
26,64	2,08	12	0,49	33,8 b
39,96	2,17	12	0,69	34,1 b

^{1/**} significativo ao nível de 1% de probabilidade usando a aproximação Qui-quadrado;

^{2/} médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% - d.m.S._(n=0,05) = 14,68.

Formação de raízes

Raízes foram induzidas diretamente dos segmentos apicais, cotiledonares e hipocotiledonares na ausência da citocinina BAP (Tabela 1). A formação

de raízes foi também observada quando empregou-se níveis mais baixos de tidiazuron, sendo originadas diretamente do explante na testemunha (nível zero de tidiazuron), e nos demais níveis, regeneradas a partir de calos (Tabela 2). Os resultados da Tabela 3 mostram que a formação de raízes a partir de brotos, ocorreu no tratamento sem BAP e as raízes foram regeneradas diretamente do explante na sua parte basal.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Ficou evidente que os diferentes tipos de explantes de *Capsicum* podem induzir respostas diferenciadas quanto à formação de raízes, calos e brotações, dependendo do tipo e da concentração de reguladores de crescimento adicionado ao meio de cultura. Estas mesmas observações foram também relatadas por GUNAY & RAO (1978), trabalhando com explantes cotiledonares e hipocotiledonares de três variedades de *Capsicum*.

Neste trabalho, os segmentos apicais proporcionaram uma maior formação de calos em comparação com os demais tipos de explantes. Sabe-se que, regiões maristemáticas (apicais) são locais de síntese de auxinas, e que seu movimento ocorre polarmente. Isto sugere que, a ocorrência de maiores níveis endógenos de auxinas, balanceados com níveis de citocininas provenientes do meio de cultura, acarretou em intensa formação de calos.

De acordo com NIEWKERK et al. (1986), o tidiazuron apresenta excelente efeito na proliferação *in vitro* de brotos de macieira. O mesmo não ocorreu no cultivo *in vitro* de explantes apicais e cotiledonares de pimentão, sendo observada uma intensa formação de calos com o aumento das doses de tidiazuron no meio de cultura. Corroboram os resultados obtidos por GRIBANDO & FRONDA (1991), trabalhando com *Vitis vinifera* L. cv. Barbera, onde observaram intensa formação de calos com doses mais elevadas de tidiazuron (1 e 10 μ M). Sintomas hiperhídricos, conforme descrito por DELBERGH et al. (1992) e folhas mal formadas foram também observadas nas concentrações mais elevadas de tidiazuron. Entretanto, o emprego deste produto no cultivo *in vitro* de *Capsicum* deve ser melhor investigado, principalmente em cotilédones.

Brotos adventícios foram regenerados a partir de calos na presença de 1 a 10 μ M de tidiazuron e de 13,32 a 39,96 μ M de BAP. Segundo SADHANA AGRAWAL & CHANDRA (1983) e SADHANA AGRAWAL et al. (1989), a indução de gemas adventícias por organogênese indireta é desvantajosa, pois não assegura a preservação do nível de ploidia dos tecidos obtidos,

o que é essencial para o sucesso da multiplicação clonal. No presente estudo, a multiplicação através da proliferação de gemas axilares ocorreu somente quando utilizou-se como explante, brotações regeneradas *in vitro* de comprimento variando entre 1,5 a 2,0cm, sendo obtidos em média, 2,08 e 2,17 novos brotos em meio com 26,64 e 39,96 μ M de BAP, respectivamente, aos 25 dias de cultura *in vitro*. De maneira semelhante, SADHANA AGRAWAL & CHANDRA (1983) e SADHANA AGRAWAL et al. (1989) produziram numerosas brotações axilares subcultivando os brotos obtidos *in vitro* em meio MS suplementado com 5mg/l (22,20 μ M) de BAP. De outra forma, SRIPICHTT et al. (1987), conseguiram regenerar brotos adventícios diretamente dos cotilédones na região do corte do pecíolo. A concentração de 3 a 7 mg/l (13,32 a 31,08 μ M) de BAP induziram maior número de brotos por explante, ao passo que, as auxinas AIA e ANA (ácido naftaleno acético), não induziram formação de brotos em nenhum dos níveis testados.

Sabe-se que a taxa de auxina difere nos vários tecidos das plantas, acarretando respostas morfogênicas diversas. Isto foi observado para explantes provenientes de plântulas desenvolvidas *in vitro*. Tais explantes apresentaram maior formação de calos, dificultando a obtenção de múltiplas brotações na fase de estabelecimento da cultura. Por outro lado, brotações regeneradas *in vitro* a partir de explantes de "seedlings", foram mais indicadas para a micropropagação através de brotações axilares. As novas brotações poderão ser subcultivadas dando origem a novos explantes, que por sua vez, poderão ser utilizados para repetirem o mesmo processo. Uma melhor taxa de multiplicação poderá ser obtida se forem otimizados os inúmeros fatores que afetam à organogênese *in vitro*.

FONTE DE AQUISIÇÃO

a - Agar-agar: Vitec Química e Representações Ltda.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAMPOS, H. *Estatística experimental não paramétrica*. Piracicaba: ESALQ-Imprensa Universitária, 1983. 349 p.
- DELBERGH, P., AITKEN-CHRISTIE, J., COHEN, D. et al. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 30, p. 135-140, 1992.
- FARI, M., CZAKO, M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explant cultured *in vitro*. *Scientia Horticultura*, v. 15, n. 3, p. 207-213, 1981.

- GRIBANDO, I., FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v. 26, n. 8, p. 1083, 1991.
- GUNAY, S., RAO, P.S. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). **Plant Science Letter**, v. 11, p. 365-372, 1978.
- MIRANDA, J.E.C. de. **Análise genética de um cruzamento dialélico em pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. Piracicaba, 1987. 159 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento e Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, 1987.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NIEWKERK, J.P. van, ZIMMERMAN, R.H., FORDHAN, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, v. 21, p. 516-518, 1986.
- PHILLIPS, G.C., HUBSTENBERGER, J.F. Organogenesis in pepper tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, n. 3, p. 261-269, 1985.
- SADHANA AGRAWAL, CHANDRA, N. Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *C. annuum* var. Mathani. **Current Science**, v. 52, p. 645-646, 1983.
- SADHANA AGRAWAL, CHANDRA, N., KOTHARI, S.L. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. var. Matthania). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 16, n. 1, p. 47-55, 1989.
- SRIPICHITT, P., NAWATA, E., SHIGENAGAS, *In vitro* shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsupusa). **Japanese Journal of Breeding**, v. 37, n. 2, p. 133-142, 1987.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. **Principles and procedures of Statistics**. New York: McGraw-Hill, 1980. 633 p.
- SWAMY, T.C.N. Tissue culture multiplication of chillies (*Capsicum annuum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). **Thesis Abstracts**, v. 9, n. 4, p. 340-341, 1983.