

**DIEGO SILVA BATISTA**

**INFLUÊNCIA DE TROCAS GASOSAS, DO ETILENO E DE  
POLIAMINAS NA MORFOGÊNESE *in vitro* DE PIMENTEIRA  
ORNAMENTAL (*Capsicum annuum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

B333i  
2012

Batista, Diego Silva, 1987-

Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na  
morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental  
(*Capsicum annuum* L.) / Diego Silva Batista. – Viçosa, MG,  
2012.

x, 51f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Pimenta - Morfogênese. 2. Plantas - Efeito do etileno.  
3. *Capsicum annuum*. 4. Morfogênese. 5. Putrescina.  
6. Espermina. 7. Espermidina. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.6437

**DIEGO SILVA BATISTA**

**INFLUÊNCIA DE TROCAS GASOSAS, DO ETILENO E DE  
POLIAMINAS NA MORFOGÊNESE *in vitro* DE PIMENTEIRA  
ORNAMENTAL (*Capsicum annuum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2012.

---

Mailson Monteiro do Rêgo  
(Coorientador)

---

Leonardo Lucas Carnevalli Dias  
(Coorientador)

---

Cleber Witt Saldanha

---

Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre e por tudo.

Aos meus pais, Maria de Fátima Silva Batista e Arnaldo Gomes Batista, por terem me ensinado o verdadeiro valor da educação e do conhecimento em seus sentidos mais amplos. Pelo amor, carinho e apoio incondicional, superando a distância e a saudade.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela valiosa oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Wagner Campos Otoni, difícil descrever tudo o que tenho para agradecer. Pela confiança depositada, por acreditar e me incentivar, pela amizade, respeito e, principalmente, pelo exemplo como profissional e ser humano.

A Cleber Witt Saldanha, Leonardo Lucas Carnevalli Dias e Mailson Monteiro do Rêgo, pelas importantíssimas contribuições e sugestões apresentadas durante a construção do trabalho, por toda a ajuda, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Prof. Fernando Luiz Finger e aos estudantes do Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia, especialmente Tania Pires e Teresa Mendes pela ajuda na quantificação do etileno.

À Nívea Moreira e aos estagiários do Laboratório de Anatomia Vegetal do DBV pelo auxílio nas análises anatômicas.

À Prof<sup>ª</sup>. Eny Iochevet Segal Floh, à Amanda Macedo e aos estudantes e funcionários do Laboratório de Biologia Celular (BIOCEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), pela simpática acolhida e por toda a ajuda na quantificação das poliaminas.

Aos amigos/irmãos Moryb Jorge Sapucay e Rusthon Magno Cortez pelo convívio, companheirismo e amizade.

Aos queridos amigos Amaro Afonso Campos, Anderson Rodrigo Silva, Elizanilda Ramalho do Rêgo, Mayana Ferreira, Naysa Flávia, Renata Oliveira Batista e tantos outros que me acompanharam e me apoiaram em diversos momentos em Viçosa.

Ao meu irmão Fábio Silva Batista, pela amizade e carinho que nos une.

À Aline Ellen Duarte de Sousa, por sua presença carinhosa e companheira em todos os momentos.

Aos amigos da turma de pós-graduação da Fisiologia Vegetal. Impossível citar o nome de todos, mas é também impossível deixar de citar alguns como Camilla Pedroza, Daniela Cassol, Danielle Brito, Eduardo Medina, Eduardo Soares, Franklin Magnum, Giuliana Soares, Izabel Chaves, Kelem Silva, João Henrique, Lucilene Oliveira, Maiana Reis, Marcelo Sekita, Neidiquele Maria, Wilka Bispo e Yesid Mariño. Agradeço a todos pelos momentos de estudo e de descontração que passamos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II: Ana Carolina, Ana Cláudia, Andréa Koehler, Bruno Albino, Crislene Silva, Débora Freitas, Denise Fernandes, Élcio Meira, Evelyn Jardim, Elisonete Garcia (Lili), Elyabe Monteiro, Jéssica Azevedo, João Paulo Corrêa, Joyce Máximo, Julyana Viana, Laís Gomide, Leidy Yibeth, Lorena Vieira, Marcela Notini, Marcos Vinícius, Mariana Taquetti, Renato Leonel, Tatiana Moraes, Tiago Araujo, Virgílio Loriato. Enfim, a todos que participam dos trabalhos e dos momentos de companheirismo.

A todos aqueles professores e funcionários da UFV que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional e a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

DIEGO SILVA BATISTA, filho de Maria de Fátima Silva Batista e Arnaldo Gomes Batista, nasceu em 10 de fevereiro de 1987, na cidade de Esperança, estado da Paraíba. Graduou-se em Agronomia em julho de 2010 pela Universidade Federal da Paraíba. Iniciou seu mestrado em Fisiologia Vegetal em agosto de 2010 na Universidade Federal de Viçosa, tendo defendido tese em fevereiro de 2012.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>11</b>
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> .....	15
Morfogênese <i>in vitro</i> .....	16
Avaliações de características de plântulas.....	16
Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	16
Análises histológicas.....	16
Avaliação da capacidade morfogênica.....	17
Delineamento experimental.....	17
RESULTADOS.....	18
Efeito das trocas gasosas nas características morfogênicas.....	18
Efeito das trocas gasosas e do tipo de explante na organogênese.....	20
DISCUSSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>28</b>
RESUMO.....	28

ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO .....	30
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> .....	33
Morfogênese <i>in vitro</i> .....	33
Avaliações .....	35
Delineamento experimental.....	35
RESULTADOS .....	36
Respostas morfogênicas .....	36
Níveis de etileno.....	37
Poliaminas endógenas .....	39
DISCUSSÃO .....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>51</b>

## RESUMO

BATISTA, Diego Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadores: Leonardo Lucas Carnevalli Dias e Mailson Monteiro do Rêgo.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do etileno, das poliaminas e das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental. Sementes de *Capsicum annuum* L. foram desinfestadas e inoculadas em meio MS suplementado com vitaminas B5, mio-inositol, sacarose e ágar. Para a organogênese, explantes cotiledonares e hipocotiledonares foram cultivados no meio descrito, porém adicionado de 6-benziladenina (BA) e ácido indolacético (AIA). O efeito das trocas gasosas foi avaliado utilizando três tipos de vedações dos frascos: tampas de polipropileno rígido sem membrana, com uma e com duas membranas (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent). Análises histológicas, de pigmentos fotossintéticos e de características morfológicas foram realizadas. Também foram realizados tratamentos com inibidores (aminoetoxivinilglicina – AVG, tiossulfato de prata - STS), sequestrador (perclorato de mercúrio – PM) e promotor da produção de etileno (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano - ACC), além da adição de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e de seu inibidor (metilglioxal-bis-guanil hidrazona – MGBG) ao meio de regeneração. Plântulas cultivadas em frascos com tampas com membranas apresentaram estruturas anatômicas diferenciadas e crescimento mais vigorosos comparados ao controle. Estes tratamentos resultaram em plântulas maiores, com folhas mais expandidas, maior número de folhas, maior massa fresca, maior teor de massa seca e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos. Todavia, na indução de organogênese os tipos de vedação não foram significativos, tendo o tipo de explante sido mais determinante na formação de gemas e calos. AVG, STS e o PM induziram alta

frequência de regeneração. O ACC e o MGBG induziram menor taxa de regeneração, elevada calogênese e apresentaram níveis mais altos de etileno. Por outro lado, quando se adicionou as poliaminas ao meio de cultura, os níveis de etileno foram mais baixos que o controle e a frequência de regeneração foi mais alta. Os resultados deste estudo mostram que maiores trocas gasosas são benéficas no cultivo *in vitro* de *Capsicum annuum* L. e que os níveis endógenos de etileno e poliaminas interferem diretamente nas respostas morfogênicas durante a regeneração *in vitro* desta espécie.

## ABSTRACT

BATISTA, Diego Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Influence of gas exchange, ethylene and polyamines in morphogenesis *in vitro* of ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.).** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Leonardo Lucas Carnevalli Dias and Mailson Monteiro do Rêgo.

The present study was conducted to evaluate the influence of ethylene, polyamines and gas exchange in *in vitro* morphogenesis of ornamental pepper. Seeds of *Capsicum annuum* L. were surface-sterilized and inoculated in MS medium supplemented with B5 vitamins, myo-inositol, sucrose and agar. Benzyladenine and 3-indoleacetic acid were added to the medium to elicit organogenesis from cotyledon and hypocotyl segments. The effect of gas exchange was evaluated comparing three flask sealings: rigid polypropylene lid (PRV) without vents; PRV with one or two vents covered with a membrane (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent). Photosynthetic pigments, morphologic characters and histological analyses from each treatment were performed. The effects of ethylene inhibitor, promoter and scavenger (aminoethoxyvinilglycine – AVG, silver tiosulfate – STS, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid – ACC, and mercury perchlorate- MP, respectively), polyamines (spermine, spermidine and putrescine) and its inhibitor (methylglyoxal-bis-guanylhydrazone - MGBG) were also analysed by the addition of these compounds into the regeneration medium. Plants maintained in glass flasks capped with vented lids showed more vigorous growth and differentiated anatomical structures as compared to the control. These treatments resulted in higher plants, higher number and more expanded leaves, greater fresh and dry weights, and photosynthetic pigments. However, for adventitious shoot bud and calli induction, the explant source was more effective than flask sealing. AVG, STS and MP caused a greater regeneration frequency. ACC and MGBG induced a lower regeneration frequency, high callus formation and showed the higher levels of ethylene. On the other

hand, when the polyamines were added to the medium, ethylene levels were lower than control and regeneration frequency was higher. These results indicate that higher air exchange is beneficial for *in vitro* culture of *Capsicum annuum* L. and the endogenous levels of ethylene and polyamines interfere directly in morphogenic responses during *in vitro* regeneration of this species.

## INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* pertencentes à família Solanaceae são olerícolas comercializadas em todo o mundo (BUSO et al., 2001). Dezenas de espécies já foram encontradas e descritas entre domesticadas, semi-domesticadas e silvestres, sendo novas espécies descobertas e nomeadas à medida que expedições de coleta são realizadas (PICKERSGILL, 1971; BOSLAND, 1993). Das espécies de *Capsicum* existentes, apenas cinco foram domesticadas e são cultivadas atualmente: *C. annuum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné, e *C. pubescens* Ruiz e Pavon (OCHOA-ALEJO e RAMÍREZ-MALAGÓN, 2001).

As pimenteiras do gênero *Capsicum* estão intimamente relacionadas à riqueza cultural brasileira e são parte valiosa do patrimônio da biodiversidade, sendo cultivadas em imensa variedade de tipos, tamanhos, cores, sabores e pungências (PEREIRA e RODRIGUES, 2005).

O gênero possui grande variabilidade genética sendo empregada para diferentes fins, com excelente potencial para comercialização como planta ornamental de vaso. A altura e forma de crescimento das plantas variam de acordo com a espécie e as condições de cultivo. As folhas apresentam tamanhos, colorações e formatos variáveis. O fruto destaca-se pelas múltiplas formas, tamanhos, colorações e pungências. A coloração dos frutos maduros, geralmente é vermelha, mas pode variar desde o amarelo-leitoso, alaranjado, salmão, roxo até preto. O formato varia entre e intra-espécies, existindo frutos alongados, arredondados, triangulares ou cônicos, campanulados ou retangulares. A fácil propagação das sementes, o tempo relativamente curto de germinação, a tolerância ao calor e a harmonia de vaso, contribuem para o sucesso na utilização destas plantas como ornamentais (STOMMEL e BOSLAND, 2006).

A espécie *C. annuum* compreende duas importantes olerícolas: os pimentões, que têm frutos grandes (40 a 150g), não apresentam pungência, i.e., são doces, e são consumidos *in natura* na forma de saladas, cozidos ou recheados; e as pimentas, que apresentam frutos pequenos (geralmente menores que 10g), são pungentes e utilizadas como condimento. Todavia, existem cultivares de pimentão de frutos pequenos, assim como mutantes de pimenta não-pungentes. A pungência, característica tão importante economicamente e taxonomicamente no gênero *Capsicum*, é resultante da ação da substância capsaicina (8-metil-N-vanilil 1-6-nonamida) (SUZUKI e IWAI, 1984).

O pimentão consumido *in natura* possui alto valor nutritivo, uma vez que apresenta vitaminas como A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e C. Essa última pode chegar a um teor de 342 mg/100g de massa seca, valor muito superior ao encontrado em variedades de citros como, por exemplo, a Laranja-Natal (84,03 mg 100 mL<sup>-1</sup>) ou a Laranja-Bahia (80,03 mg 100 mL<sup>-1</sup>) (COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010). Além disso, apresenta outras vitaminas e sais minerais tais como niacina, cálcio, ferro e fósforo (INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES - IBPGR, 1983).

A regeneração de plantas a partir da cultura de células, tecidos e órgãos *in vitro* é um processo fundamental para a aplicação da biotecnologia vegetal objetivando a propagação e o melhoramento genético de plantas. Apesar da importância econômica das pimenteiras, os sistemas de regeneração de espécies *Capsicum* não evoluíram tão rápido quanto os de algumas outras solanáceas (como fumo, tomate, batata e petúnia). As espécies de *Capsicum* têm apresentado dificuldades no que diz respeito à regeneração de plantas inteiras a partir de explantes, o que pode ser uma indicação clara de problemas de recalitrância morfogênica (FÁRI e ANDRÁSFALVY, 1994; OCHOA-ALEJO e RAMÍREZ-MALAGÓN, 2001).

A cultura de tecidos facilita a multiplicação rápida de clones superiores e é um pré-requisito para o melhoramento de plantas via engenharia genética. O cultivo *in vitro* tem explorado a criação de variabilidade genética por produzir haplóides, variantes somaclonais e gametoclonais, por meio dos quais as plantas podem ser melhoradas (KOTHARI et al., 2010).

Em combinação com técnicas moleculares, a cultura de tecidos tem sido usada com sucesso para incorporar caracteres através da transferência de genes. A cultura de uma única célula e de meristemas pode ser efetivamente usada para erradicar patógenos de material cultivado e, portanto, aumentando significativamente a produção de cultivares estabelecidos. Com material selecionado tipicamente em laboratório, e posteriormente, introduzido nos programas de melhoramento clássicos, esta tecnologia vem contribuindo de forma impactante no melhoramento das espécies de pimenteiras cultivadas (KOTHARI et al., 2010).

Gunay e Rao (1978) fizeram o primeiro relato da regeneração *in vitro* de plantas de *C. annuum*, onde conseguiram gemas, que se diferenciaram em brotações, a partir de segmentos de cotilédones e hipocótilos. Esses resultados foram reproduzidos por Fári e Czakó (1981), onde utilizando segmentos de hipocótilo de *C. annuum* cv. Hatvani, demonstraram a influência da posição do explante no hipocótilo na capacidade

morfogênica: os segmentos apicais produziram apenas gemas adventícias, os segmentos medianos formaram principalmente raízes enquanto os basais apresentaram calogênese. Já o primeiro relato de regeneração de plantas de pimentão a partir de cultura de protoplastos *in vitro* foi feito por Saxena et al. (1981) com plantas de *C. annuum* L. cv. California Wonder.

Fári et al. (1984) realizaram trabalhos pioneiros em clonagem de populações híbridas de pimentões, onde a habilidade de clonagem da população híbrida em F2 (*C. annuum* cv. Hatvani X *C. chinense* No. 2) foi resgatada em algumas plantas, demonstrando que há uma base genética na capacidade de propagação *in vitro* de pimentão.

Diversos autores realizaram trabalhos visando desenvolver a regeneração via organogênese de pimentão (*C. annuum* L.) (SRIPICHIT et al., 1987; AGRAWAL et al., 1989; ALIBERT, 1990; EBIDA e HU, 1993; GATZ e ROGOZINSKA, 1994; BINZEL et al., 1996). No entanto, esta espécie (a mais importante do gênero *Capsicum*), é notadamente recalcitrante *in vitro*, o que dificulta a indução de respostas morfogênicas (WIJBRANDI e DE BOTH, 1993).

Nas espécies de *Capsicum*, a morfogênese *in vitro* não têm sido bem sucedida devido à formação de gemas em rosetas. Por esta razão seria desejável estabelecer protocolos eficientes para a regeneração da planta inteira na multiplicação *in vitro* (SHARMA et al., 2008).

Vários trabalhos têm verificado a influência das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de diversas espécies (PARK et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009; YOON et al., 2009; ARAGÓN et al., 2010; CHA-UM et al., 2010), inclusive do gênero *Capsicum* (SANTANA-BUZZY et al., 2005; MOHAMED e ALSADON, 2011). Outros trabalhos têm estabelecido uma relação entre a interferência em determinadas etapas da síntese do etileno e as respostas morfogênicas (SHARMA, 2008; SIDDIKEE et al., 2011).

O etileno desempenha importantes funções na ativação de respostas de plantas a estresses diversos. Participa também das redes de sinalização de outros fitormônios como o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o ácido abscísico, tendo assim uma influência direta no processo morfogênico (ADIE et al., 2007; KWON et al., 2009).

Outras substâncias importantes na regulação da morfogênese em plantas são as poliaminas (KUMAR et al., 2009). Estas são aminas alifáticas carregadas positivamente, e, portanto, ligam-se a moléculas carregadas negativamente, como ácidos nucleicos, fosfolipídeos e proteínas. Atuam modulando a replicação, transcrição,

tradução, estabilização da membrana, divisão e expansão celular (KUZNETSOV et al., 2006).

Kumar et al. (2007) demonstraram a influência de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira.

Diversos experimentos utilizando inibidores têm sido realizados para modular o metabolismo endógeno de poliaminas a fim de estudar o papel destas em plantas (EL MESKAOUI e TREMBALY, 2009). Este fitormônio tem sido proposto como uma nova categoria de regulador de crescimento que está envolvido em diversos processos fisiológicos como embriogênese, divisão celular, morfogênese e desenvolvimento (LIU et al., 2006). Além disso, tem-se descoberto que as poliaminas atuam positivamente na longevidade e nos mecanismos de resposta ao estresse em vegetais (EISENBERG et al., 2009; ALCÁZAR et al., 2006; MINOIS et al., 2011).

Embora as poliaminas e o etileno possuam funções biológicas opostas, eles têm um precursor comum: S-adenosilmetionina (SAM). Apesar de ambas terem influência nas respostas morfogênicas, ainda não está totalmente esclarecido como ocorre essa interação (HU et al., 2006).

Observada a importância da cultura de tecidos como ferramenta para o melhoramento de pimenteiras ornamentais do gênero *Capsicum*, a alta recalcitrância *in vitro* apresentada pelos representantes deste gênero e a influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas em sua morfogênese, faz-se necessário um estudo do efeito destes fitormônios, assim como das trocas gasosas e de como estes fatores afetam o processo morfogênico *in vitro* destas pimenteiras. Desse modo, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência do etileno, das poliaminas e das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIE, B.; CHICO, J.M.; RUBIO-SOMOZA, I.; SOLANO, R. Modulation of plant defenses by ethylene. **Plant Growth Regulation**, 26: 160-177, 2007.

ALCÁZAR, R.; MARCO, F.; CUEVAS, J.C.; PATRON, M.; FERRANDO, A.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A.F.; ALTABELLA, T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnology Letters**, 28: 1867-1876, 2006.

ALIBERT, O. Essais de regeneration par organogenese chez le piment (*Capsicum annuum* L.). Memoire pour l'obtention du D.E.S.S. de Productivite Vegetale Universite Paris. **Station d'Amelioration des Plantes**, p.37. 1990.

AGRAWAL, S.; CHANDRA, N.; KOTHARI, S.L. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 16: 47-55, 1989.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, 54: 237-244, 2010.

BAIS, H.P.; SUDHA, G.S.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of putrescine AgNO<sub>3</sub> and polyamine inhibitors on the morphogenetic response in untransformed and transformed tissues of *Cichorium intybus* and their regenerants. **Plant Cell Reports**, 20: 547-555, 2001.

BINZEL, M.L.; SANKHLA, N.; JOSHI, S.; SANKHLA, D. *In vitro* regeneration in chile pepper (*Capsicum annuum* L.) from 'half-seed-explants'. **Plant Growth Regulation**, 20: 287-293, 1996.

BOSLAND, P.W. Breeding for quality in *Capsicum*. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, 12: 25-31, 1993.

BUSO, G.S.C.; LOURENÇO, R.T.; BIANCHETTI, L.B.; LINS, T.C.L.; POZZOBON, M.T.; AMARAL, Z.P.S.; FERREIRA, M.E. **Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na mata atlântica brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 22p.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**, 4: 750-756, 2010.

CHI, C.L.; LIN, W.S.; LEE, J.E.E.; PUA, E.C. Role of polyamines on *de novo* shoot morphogenesis from cotyledons of *B. campestris* spp. *pekinensis* (lour) *olsson in vitro*. **Plant Cell Reports**, 13: 323-329, 1994.

COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30: 15-19, 2010.

DIAS, L.L.C.; RIBEIRO, D.M.; SANTA CATARINA, C.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant Growth Regulation**, 62: 9-19, 2010.

EBIDA, A.I.A.; HU, C.Y. *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explant. **Plant Cell Reports**, 13: 107-110, 1993.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A.; FUSSI, H.; BÜTTNER, S.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RUCKENSTUHL, C.; FAHRENKROG, B.; DESZCZ, L.; HARTL, R.; WEISKOPF, D.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; HERKER, E. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, 11: 1305-1314, 2009.

EL MESKAOUI, A.; TREMBALY F.M. Effects of exogenous polyamines and inhibitors of polyamine biosynthesis on endogenous free polyamine contents and the maturation of white spruce somatic embryos. **African Journal of Biotechnology**, 8: 6807-6816, 2009.

EVANS, P.T.; MALMBERG, R.L. Do polyamines have role in plant development? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 40: 235-269, 1989.

FÁRI, M.; CZAKÓ, M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. **Scientia Horticulturae**, 15: 207-213, 1981.

FÁRI, M.; CSILLÉRY, G.; ANDRÁSFALVY, A. *In vitro* selection procedures for agronomic characters by shoot tip culture of *Capsicum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM PLANT TISSUE AND CELL CULTURE APPLICATION TO CROP IMPROVEMENT, 1984, Olomouc. **Proceedings**, Prague: Czechoslovak Academy of Sciences. 445-446, 1984.

FÁRI, M.; ANDRÁSFALVY, A. Regeneration and cloning of pepper (*Capsicum* sp.) *in vitro*: a review. **Horticultural science**, 26: 9-19, 1994.

GATZ, A.; ROGOZINSKA, J. *In vitro* organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annuum* L. cv. Bryza. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, 63: 255-258, 1994.

GUNAY, A. L.; RAO, P. S. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). **Plant Science Letters**, 11: 365-372, 1978.

HU, W-W.; GONG, H.; PUA, E-C. Modulation of SAMDC expression in *Arabidopsis thaliana* alters *in vitro* shoot organogenesis. **Physiologia Plantarum**, 128: 740-750, 2006.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Genetic Resources of *Capsicum***, FAO/IBPGR. Rome. 49p. 1983.

KOTHARI, S.L.; JOSHI, A.A.; KACHHWAHA, A.S.; OCHOA-ALEJO, A.N. Chili peppers - A review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, 28: 35-48, 2010.

KWON, H-B.; HWANG, E-W.; CHEONG, J-J. Transgenic expression of an ethylene responsive element binding protein of *Capsicum annuum* (CaEREBP-C4) in tobacco confers cold tolerance. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 52: 405-411, 2009.

KUMAR, V.; SHARMA, A.; PRASAD, B.C.N.; GURURAJ, S.B.; GRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. **Acta Physiologiae Plantarum**, 29: 11-18, 2007.

KUMAR, V.; PARVATAM, G.; RAVISHANKAR, G.A. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electronic Journal of Biotechnology**, 12: 1-15, 2009.

KUZNETSOV, V.; RADYUKINA, N.L.; SHEVYAKOVA, N.I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. **Russian Journal of Plant Physiology**, 53: 583-604, 2006.

LIU, J.H.; HONDA, C.; MORIGUCHI, T. Involvement of polyamine in floral and fruit development. **Japan Agricultural Research Quarterly**, 40: 51-58, 2006.

MINOIS, N.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; MADEO, F. Polyamines in aging and disease. **Aging**, 8: 1-17, 2011.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. **Biologia Plantarum**, 55: 370-374, 2011.

OCHOA-ALEJO, N.; RAMÍREZ-MALAGÓN R. *In vitro* chili pepper biotechnology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, 37: 701-729, 2001.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, S.H.; PARK, Y.M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99: 199-205, 2004.

PEREIRA, T.N.S.; RODRIGUES, R. Recursos genéticos em *Capsicum*: situação atual e perspectivas. In: LIMA, M. C. (org) **Recursos genéticos de hortaliças: riquezas naturais**, São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. 137-159. 2005.

PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). **Evolution**, 25: 683-691, 1971.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 45: 421-428, 2009.

SANTANA-BUZZY, N.; CANTO-FLICK, A.; BARAHONA-PÉREZ, F.; MONTALVO-PENICHE, MC.; ZAPATA-CASTILLO, PY.; SOLÍS-RUIZ, A. Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. **Horticultural Science**, 40: 1829-31. 2005.

SAXENA, P.K.; GILL, R.A.; RASHID, A.; MAHESHWARI, S.C. Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering *in vitro*. **Protoplasma**, 108: 357-360, 1981.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 11: 1-6, 2008.

SIDDIKKEE, M.A.; CHAUHAN, O.S.; TONGMIN, S.A. Regulation of ethylene biosynthesis under salt stress in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) by 1-

aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-producing halotolerant bacteria. **Plant Growth Regulation**, 10: 1-8, 2011.

SRIPICHIT, 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: 133-142, 1987.

STOMMEL, J.R., BOSLAND, P.W. Ornamental pepper, *Capsicum annuum*. In: Anderson, N. **Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and opportunities for the 21<sup>st</sup> Century**, Netherlands: Springer. 561-599. 2006.

SUZUKI, T.; IWAI, K. Constituent of bell pepper species: chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. **Alkaloids**, 23: 227-299, 1984.

WIJBRANDI, J.; DE BOTH, M.T.J. Temperate vegetable crops. **Scientia Horticulturae**, 55: 37-63, 1993.

YOON, Y.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Impact of *in vitro* CO<sub>2</sub> enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 65:183-188, 2009.

## CAPÍTULO 1

### Influência das trocas gasosas e do tipo de explante na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)

#### RESUMO

A influência das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental foi avaliada. Sementes de *Capsicum annuum* L. foram desinfestadas e inoculadas em meio MS suplementado com vitaminas B5, mio-inositol, sacarose e ágar. Para a organogênese, explantes cotiledonares e hipocotiledonares foram cultivados no meio descrito, porém adicionado de ácido 3-indolacético e 6-benziladenina. O efeito das trocas gasosas foi avaliado utilizando três tipos de vedações dos frascos: tampas de propileno rígido sem membrana, com uma membrana de 0,45 µm (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent) e com duas membranas. Análises histológicas, de pigmentos fotossintéticos e de características morfológicas foram realizadas. Plântulas cultivadas em frascos com tampas com membranas apresentaram estruturas anatômicas diferenciadas e crescimento mais vigorosos comparados ao controle. Estes tratamentos resultaram em plântulas maiores, com folhas mais expandidas, maior número de folhas, maior massa fresca, maior teor de massa seca e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos. Todavia, na indução de organogênese os tipos de vedação não foram significativos, tendo o tipo de explante sido mais determinante na formação de gemas e calos. Os resultados deste estudo indicam que frascos com membranas promovem trocas gasosas que são benéficas para a morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental.

**Palavras-chave:** trocas gasosas, *Capsicum annuum* L., vedação, morfogênese.

## ABSTRACT

The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of pepper was evaluated. Seeds of *Capsicum annuum* L. were surface-sterilized and inoculated in MS medium supplemented with B5 vitamins, myo-inositol, sucrose and agar. Benzyladenine and 3-indoleacetic acid were added to the medium to elicit organogenesis from cotyledon and hypocotyl segments. The effect of gas exchange was evaluated comparing three flask sealings: rigid polypropylene lid (PRV) without vents; PRV with one vent (10 mm diameter) or two vents covered with a 0.45 µm size pore membrane (MilliSeal® AVS-045 Air Vent). Photosynthetic pigments, morphologic characters and histological analyses from each treatment were performed. Plants maintained in glass flasks capped with vented lids showed more vigorous growth and differentiated anatomical structures as compared to the control. These treatments resulted in higher plants, higher number and more expanded leaves, greater fresh and dry weights, and photosynthetic pigments. However, for adventitious shoot bud and calli induction, the explant source was more effective than flask sealing. These results indicate that the flasks with vents provided air exchange beneficial for *in vitro* morphogenesis of ornamental pepper.

**Keywords:** Air exchange, *Capsicum annuum* L., flask sealing, morphogenesis.

## INTRODUÇÃO

A aclimatização é um dos principais processos na produção de mudas saudáveis antes de seu transplante para as condições *ex vitro*. No entanto, este processo é dificultado pelo fato do ambiente *ex vitro* ser, normalmente, bem diferente das condições *in vitro*, em termos de umidade relativa (UR), temperatura, ventilação de ar, níveis de nutrientes (CHA-UM et al., 2010), dentre outros.

Os baixos níveis de CO<sub>2</sub>, a produção e acúmulo de etileno em recipientes fechados e a inibição de enzimas do ciclo de Calvin pela sacarose adicionada ao meio de cultura são fatores que podem interferir diretamente nas taxas fotossintéticas de plantas cultivadas *in vitro* e, conseqüentemente, em sua taxa de multiplicação e na sobrevivência durante o processo de aclimatização (TANAKA et al., 2005; ARAGÓN et al., 2010). Além disso, a UR no interior dos frascos pode causar anomalias anatômicas que, regra geral, reduzem as taxas de sobrevivência durante a transferência para o ambiente *ex vitro*. Portanto, vedações especiais que facilitem as trocas gasosas podem reduzir a umidade relativa no interior dos frascos e, conseqüentemente, melhorar o crescimento das plantas em casa-de-vegetação (HAZARIKA, 2006).

Visando melhorar a ventilação de frascos de cultura *in vitro*, tampas com membranas que permitem trocas gasosas têm sido utilizadas, reduzindo assim a umidade relativa no interior do frasco de cultura e, conseqüentemente, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta (XIAO et al., 2011; KOZAI, 2010). Além disso, o uso de filmes permeáveis a gases atuam reduzindo a umidade relativa no interior dos frascos, possibilitando assim a redução da hiperhidricidade (KOZAI et al., 1997; IVANOVA e VAN STADEN, 2010).

Diversas espécies já foram propagadas *in vitro* com sucesso usando membranas MilliSeal<sup>®</sup> para melhorar as trocas gasosas do frasco de cultura *in vitro*, dentre essas: *Azadirachta indica* (RODRIGUES et al., 2011), *Aloe polyphylla* (IVANOVA e VAN STADEN, 2010), *Solanum melongena* (RIBEIRO et al., 2009), *Uniola paniculata* (VALERO-ARACAMA et al., 2007), *Hypericum perforatum* (COUCEIRO et al., 2006), *Alha gigaecorum* (ZOBAYED et al., 2006), *Eucalyptus tereticornis* (SHAVALLI KHAN et al., 2002). A utilização de membranas que aumentam as trocas gasosas entre o espaço interno do frasco de cultura e o ambiente pode também ser importante para a produção de metabólitos secundários *in vitro* (RODRIGUES et al.,

2011; TISSERAT et al., 2002; SRIVASTAVA e SRIVASTAVA, 2008; TISSERAT et al., 2009; XIAO et al., 2011).

Yoon et al. (2009) demonstraram em seus estudos em micropropagação de orquídeas do gênero *Phalaenopsis* que plântulas cultivadas sob concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> desenvolveram aparatos fotossintéticos completamente viáveis e se mostraram prontas para serem transferidas para a condição *ex vitro*. Enquanto Cha-Um et al. (2010), demonstraram que orquídeas desse gênero cultivadas *in vitro* sob baixas umidades relativas (60 ± 5% UR), foram bem adaptadas às condições *in vivo*, o que foi evidenciado por seus altos níveis de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, clorofila total e carotenóides totais), maior fotossíntese líquida e baixas taxas de condutância estomática e transpiração, o que levou a um maior crescimento.

Ao contrário de outros membros da família Solanaceae, cujos protocolos de morfogênese são facilmente reproduzidos, as pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* mostram-se recalcitrantes *in vitro*. Todavia alguns protocolos para sua micropropagação têm sido estabelecidos (KOTHARI et al., 2010).

Santana-Buzzy et al. (2005) relataram a alta sensibilidade das pimenteiras do gênero *Capsicum* ao etileno, onde observou-se clorose e abscisão das folhas no desenvolvimento dos primórdios foliares, juntamente com rápida perda de vigor. No entanto, quando esses explantes foram mantidos em recipientes com maiores trocas gasosas, a regeneração e o desenvolvimento das plântulas de pimenteira prosseguiram normalmente.

Mohamed e Alsdon (2011), ao avaliar o efeito de trocas gasosas na micropropagação de *Capsicum annuum*, observaram que o tipo de frasco utilizado afetou a aparência morfogênica dos calos, a organogênese e o crescimento das plântulas *in vitro*. Neste experimento, notou-se que os frascos com uma membrana que permitiam trocas gasosas deram suporte a um cultivo mixotrófico e aumentaram as taxas de regeneração e crescimento das plântulas. Além disso, nos frascos que permitiam trocas gasosas houve maior massa seca e conteúdo de pigmentos fotossintéticos, o que facilitou a aclimação *ex vitro* e o crescimento.

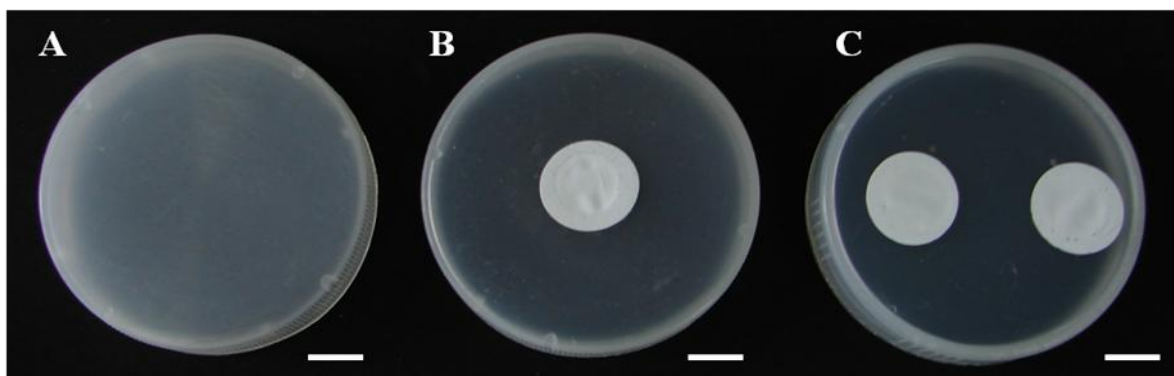
Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito das trocas gasosas e do tipo de explante na morfogênese *in vitro* de *Capsicum annuum* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desinfestação e germinação *in vitro*

Foram utilizadas sementes de um genótipo de *Capsicum annuum* L. (acesso 132) proveniente do Banco de Germoplasma de Hortaliças do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (BAGH-CCA/UFPB).

Sob condições assépticas, a desinfestação das sementes consistiu da imersão inicial em álcool 70% (v/v) por 60 segundos, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5% (v/v) (Super Globo<sup>®</sup>, Brasil), por um período de 10 min. Após esse período, foram realizados quatro enxágues com água desionizada e autoclavada. As sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio de cultura composto pelos de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120°C, 1,1 kPa por 20 min. Foram inoculadas dez sementes por frasco com três tipos de vedações: tampas rígidas de polipropileno (TRP); tampas de polipropileno com um orifício (10 mm) coberto com uma membrana de 0,45 µm (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent), e TRP com dois orifícios cobertos com membranas (Figura 1), com dez repetições para cada tratamento. A germinação ocorreu em ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16h, sob irradiância de 60 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (2 lâmpadas fluorescentes, HO Sylvania T12 - 110 W) e temperatura de 25 ± 2°C.



**Figura 1** - A. tampa rígida de polipropileno (TRP); B. TRP com uma membrana de 0,45 µm de póro (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent); C. TRP com duas membranas. Barra = 1 cm.

## **Morfogênese *in vitro***

Após a germinação, os explantes (segmentos de cotilédones e de hipocótilos) provenientes destas plântulas foram transferidos para meio de indução de morfogênese (MIM), constituído pelo meio MS adicionado de 22,2  $\mu\text{M}$  de benziladenina (BA) e 5,71  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA) (ARROYO e REVILLA, 1991), mantendo-se os mesmos níveis de trocas gasosas nos diferentes tratamentos.

## **Avaliações de características de plântulas**

Durante todo o desenvolvimento *in vitro* foram avaliados os efeitos dos tratamentos nos eventos morfogênicos através dos caracteres: porcentagem de germinação (%), massa fresca (g), comprimento do hipocótilo (cm), comprimento da folha (mm), largura da folha (mm) e número de folhas por planta.

## **Determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos**

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados seis discos foliares (7 mm de diâmetro), da terceira folha expandida a partir do meristema apical, e incubados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio) por 48 horas no escuro (SANTOS et al., 2008). A absorvância das amostras foi determinada em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro de duplo feixe (Modelo Hitachi U-2000). Os comprimentos de ondas (665, 649 e 480 nm) e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenóides totais foram baseados no método descrito por Wellburn (1994).

## **Análises histológicas**

Para a realização de análises histológicas, amostras foram retiradas do caule no terço médio da planta. Cortes transversais foram realizados em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg & Bohering, Comércio e Importação Ltda, Belo Horizonte, Brasil) e submetidos ao Floroglucinol (JOHANSEN, 1940) para evidenciar a presença de lignina.

As observações e registros fotográficos foram realizados em fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

### **Avaliação da capacidade morfogênica**

Na fase de regeneração a capacidade morfogênica de cada fonte de explante (cotilédone e hipocótilo) foi comparada quanto ao número de ramos por explante, número de calos por explante, frequência média de regeneração, massa fresca e massa seca.

### **Delineamento experimental**

Os experimentos foram constituídos por três tratamentos (frascos sem membrana, com uma e duas membranas) com 15 repetições cada em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 1% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES versão Windows/2004.2.1 (CRUZ, 2006).

## RESULTADOS

### Efeito das trocas gasosas nas características morfológicas

O presente estudo mostrou o efeito dos diferentes níveis de trocas gasosas nas seguintes características morfológicas: porcentagem de germinação, massa fresca, massa seca, comprimento do hipocótilo, comprimento da folha, largura da folha, número de folhas por planta, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais (Tabela 1). Para porcentagem de germinação, massa seca, comprimento do hipocótilo, comprimento e largura da folha e número de folhas por planta não houve diferença estatística entre os frascos com uma e duas membranas, porém as médias foram superiores aos frascos sem membranas (Tabela 2).

**Tabela 1** - Resumo da análise de variância das características observadas em plântulas de *Capsicum annuum* L., 30 dias após a germinação.

Fonte de Variação	GL	QM				
		GERM	MF	MS	NF/PL	CHP
Tipo de Vedação	2	5120**	244**	48,15**	24,08**	112,98**
Resíduo	42	489,52	2,22	0,73	0,90	2,57
Média Geral		66,67	12,52	1,58	3,46	8,86
Coefficiente de Variação (%)		33,19	11,90	12,61	27,47	18,11
		CFL	LFL	CLFA	CLFB	CRTN
Tipo de Vedação	2	409**	89,4**	4287,8**	449,11**	114,05**
Resíduo	42	18,45	9,20	9,01	0,69	0,10
Média Geral		23,01	11,96	31,23	10,46	5,07
Coefficiente de Variação (%)		18,66	25,35	9,61	7,95	6,24

<sup>ns</sup> e <sup>\*\*</sup> = não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. GERM = germinação (%); MF = massa fresca (g); MS = massa seca (g); NF/PL = número de folhas por plântula; CHP = comprimento do hipocótilo (cm); CFL = comprimento da folha (mm); LFL = largura da folha (mm); CLFA = clorofila *a* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); CLFB = clorofila *b* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); CRTN = carotenóides totais ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

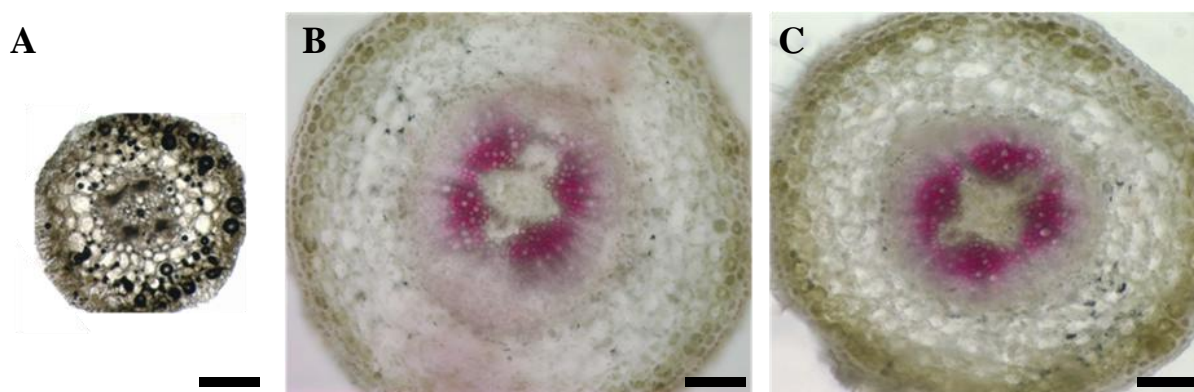
Com relação às características massa fresca, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais, o tratamento no qual foram utilizados frascos com duas membranas foi superior aos demais. No entanto o tratamento com uma membrana se mostrou eficiente em aumentar estas variáveis em relação ao controle sem membrana (Tabela 2).

**Tabela 2** - Agrupamento de médias das características observadas em plântulas de *Capsicum annuum* L., 30 dias após a germinação.

Tipo de Vedação	GERM	MF	MS	NF/PL	CHP
Sem membrana	45,33 b	8,06 c	0,56 b	2,12 b	5,69 b
Uma membrana	77,33 a	13,60 b	2,73 a	3,63 a	10,47 a
Duas membranas	77,33 a	15,91 a	3,83 a	4,63 a	10,42 a
Tipo de Vedação	CFL	LFL	CLFA	CLFB	CRTN
Sem membrana	17,05 b	9,21 b	13,49 c	4,69 c	2,21 c
Uma membrana	26,74 a	13,85 a	37,07 b	11,14 b	5,32 b
Duas membranas	25,25 a	12,83 a	47,15 a	15,57 a	7,71 a

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. GERM = germinação (%); MF = massa fresca (g); MS = massa seca (g); NF/PL = número de folhas por plântula; CHP = comprimento do hipocótilo (cm); CFL = comprimento da folha (mm); LFL = largura da folha (mm); CLFA = clorofila *a* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); CLFB = clorofila *b* ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); CRTN = carotenóides totais ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

O teste histoquímico com Floroglucinol evidenciou a presença de lignina nos tecidos vasculares (xilema) das seções transversais do caule de plântulas cultivadas em frascos com uma e duas membranas, tendo esta última apresentado maior lignificação (maior área corada) que a primeira (Figuras 3B e 3C). No entanto, em plântulas cultivadas em frascos com tampas sem membrana não se observou a coloração avermelhada típica da reação, o que mostra que não há presença de lignina suficiente para reagir com o Floroglucinol (Figura 3A), o que explica o fato destas plântulas terem se apresentado mais tenras em relação aos demais tratamentos.



**Figura 3** - Cortes transversais de caule de *Capsicum annuum* L., 30 dias após a germinação. **A.** plântulas cultivadas em frascos sem membrana; **B.** plântulas cultivadas em frascos com uma membrana; **C.** plântulas cultivadas em frascos com duas membranas. Barra = 100  $\mu\text{m}$  (Reação positiva para lignina: coloração vermelha).

## Efeito das trocas gasosas e do tipo de explante na morfogênese

Na fase de regeneração observou-se que houve influência tanto do tipo de vedação quanto da fonte de explante utilizada no MIM, sendo que a interação entre estes dois fatores não foi significativa (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resumo da análise de variância das características observadas no MIM em *Capsicum annuum* L.

Fonte de Variação	GL	QM			
		NC/E	NB/E	MF	TMS
<b>Tipo de Vedação</b>	2	0,4283**	1,3350**	19,5522**	82,8322**
<b>Tipo de Explante</b>	1	0,5635**	4,2389**	14,7500**	75,7667**
<b>Vedação x Explante</b>	2	0,0092 <sup>ns</sup>	0,0267 <sup>ns</sup>	0,0036 <sup>ns</sup>	2,9233 <sup>ns</sup>
<b>Resíduo</b>	24	0,0458	0,5000	0,4434	3,2851
<b>Média Geral</b>		0,5667	0,9500	0,4800	8,2870
<b>Coefficiente de Variação (%)</b>		37,78	74,43	13,88	21,87

<sup>ns</sup> e \*\* = não significativo e significativo a 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F. NC/E = número de calos por explante; NB/E = número de brotações por explante; MF = massa fresca (g); TMS = teor de massa seca (%).

Os tratamentos que utilizaram segmentos de hipocótilo como fonte de explantes foram os mais eficazes na calogênese e na formação de brotações, além de apresentarem maior massa fresca e massa seca (Tabela 4).

Em relação à indução de brotações (organogênese *de novo*), os explantes cultivados em frascos com membranas mostraram-se mais eficazes. Por outro lado, os explantes cultivados em frascos com uma ou duas membranas apresentaram maiores frequências de regeneração que aqueles cultivados em frascos sem membranas (Tabela 4).

Quando se avaliou a massa fresca e a massa seca, as maiores médias foram obtidas pelo tratamento sem membrana (1,3 g e 0,159 g, respectivamente) e as menores pelo tratamento com duas membranas (0,625 g e 0,049 g, respectivamente). O tratamento representado pelos frascos com uma membrana apresentou valores intermediários, não diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 4).

**Tabela 4** - Influência do tipo de vedação e da fonte de explante sobre a indução de morfogênese em *Capsicum annuum* L., 30 dias após a germinação.

<b>Tipo de explante</b>	<b>NC/E</b>	<b>MF</b>	<b>FMR</b>	<b>MS</b>
<b>Hipocótilo</b>	0,81667 a	1,3 a	0,56 a	0,217 a
<b>Cotilédone</b>	0,31667 b	0,6 b	0,39 b	0,057 b
<b>Tipo de Vedação</b>	<b>NC/E</b>	<b>MF</b>	<b>FMR</b>	<b>MS</b>
<b>Sem membrana</b>	0,625 a	1,300 a	0,26 b	0,159 a
<b>Uma membrana</b>	0,600 a	0,925 ab	0,53 a	0,088 ab
<b>Duas membranas</b>	0,575 a	0,625 b	0,63 a	0,049 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. NC/E = número de calos por explante; MF = massa fresca (g); FMR = frequência média de regeneração (%); TMS = teor de massa seca (%).

## DISCUSSÃO

Vários trabalhos têm verificado a influência das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de diversas espécies (YOON et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; ARAGÓN et al., 2010; CHA-UM et al., 2010), inclusive em *Capsicum annuum* L. (MOHAMED e ALSADON, 2011).

No presente trabalho verificou-se que o incremento das trocas gasosas possibilitado pelo emprego das membranas influenciou no desenvolvimento morfológico de *C. annuum* L. favorecendo as características de rusticidade e maturidade do material evidenciado pelo acréscimo nos valores de massas fresca e seca. Resultados semelhantes foram encontrados com orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, em que houve um acréscimo na produção de biomassa quando as plântulas foram cultivadas em ambiente enriquecido com CO<sub>2</sub> (YOON et al., 2009).

No cultivo *in vitro* de plântulas de berinjela em frascos com tampas com membranas que permitem maiores trocas gasosas, relatou-se que estas mostraram-se mais vigorosas em relação àquelas cultivadas em frascos sem membranas, obtendo assim respostas morfológicas similares às encontradas pelo presente estudo, como maiores massas fresca e seca e folhas mais expandidas (RIBEIRO et al., 2009).

Neste trabalho se pode observar que plântulas cultivadas em frascos com membranas que incrementam as trocas gasosas apresentaram melhores características anatômicas, como sistema vascular mais desenvolvido. Resultados semelhantes foram encontrados em plântulas de *Capsicum chinense* Jacq. cultivadas em recipientes que proporcionam maiores trocas gasosas (SANTANA-BUZZY et al., 2005); estas apresentaram células epidérmicas mais espessas e tecidos vasculares mais diferenciados e com maiores calibres. Essas características são benéficas na micropropagação *in vitro* de pimenteira, uma vez que estas podem ter seu desenvolvimento comprometido ou até mesmo morrerem devido ao desenvolvimento de sistemas vasculares não-funcionais e deficientes conexões vasculares entre raiz e parte aérea (ESTRADA-LUNA et al., 2001).

Maiores trocas gasosas podem aumentar a qualidade das plantas produzidas *in vitro*, assim como influenciar positivamente diversos sistemas de cultura de tecidos, tais como cultura de raízes, suspensões celulares e calos indiferenciados. Rodrigues et al. (2011), ao avaliarem o efeito das trocas gasosas na propagação *in vitro* de nim (*Azadirachta indica*), propuseram que o uso de membranas que permitem maiores

trocas gasosas pode aumentar a qualidade das brotações, diminuindo a ocorrência de clorose e senescência foliar. Da mesma forma, neste experimento observou-se que as plântulas de *C. annuum* L. cultivadas em condições de maiores trocas gasosas apresentaram menor abscisão foliar, senescência mais lenta e menor incidência de clorose e hiperhidricidade.

No presente estudo sugere-se que a umidade relativa no interior dos frascos sem membrana possivelmente foi mais alta do que naqueles com membranas, devido a formação de gotículas de água nas paredes dos frascos, fato este que também foi relatado por Mohamed e Alsadon (2011) em seu experimento com *C. annuum* L.

A presença de maiores teores de pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenóides, como foi observado nos tratamentos com plântulas cultivadas em frascos com membranas que permitem maiores trocas gasosas, tem uma importância ainda mais acentuada para *C. annuum*, uma vez que o acúmulo de carotenóides em *Capsicum* está diretamente relacionado com o valor nutricional do fruto. Estes pigmentos possuem algumas propriedades medicinais e são largamente utilizados na alimentação e em aplicações nutracêuticas (RODRIGUEZ-URIBE et al., 2011; JASWIR et al., 2011).

Na indução de organogênese em *C. annuum* L. não se observou efeito positivo de uma maior aeração na indução de brotações, ao contrário do que foi obtido por Mohamed e Alsadon (2011) com esta mesma espécie, onde relataram que o aumento das trocas gasosas incrementou significativamente a porcentagem de explantes que desenvolveram brotações.

Não se observou uma relação direta entre o desenvolvimento de calos e as trocas gasosas, visto que nesse estudo a calogênese foi mais influenciada pela fonte de explante, sendo os segmentos de hipocótilo mais eficientes que os segmentos de cotilédone na indução de calos. Estes resultados são contraditórios aos de Zobayed et al. (1999), onde foi mostrado uma correlação positiva entre o aumento das trocas gasosas e a calogênese.

O presente estudo demonstrou que o tipo de vedação influenciou na resposta morfogênica, sugerindo que uma maior troca gasosa tem efeito positivo na produção de biomassa e aclimatização das plântulas. Contudo, na indução de organogênese o tipo de explante utilizado parece ter maior influência na formação de calos e brotações em *C. annuum* L.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, 54: 237-244, 2010.

ARROYO, R.; REVILLA, M.A. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant Cell Reports**, 10: 414-416, 1991.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**, 4: 750-756, 2010.

COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI T. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 42: 278-282, 2006.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

ESTRADA-LUNA, A.A.; DAVIES JR, F.T.; EGILLA, J.N. Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 66: 17-24, 2001.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, 108: 105-120, 2006.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, 60:143-150, 2010.

JASWIR, I.; NOVIENDRI, D.; HASRINI, R.F.; OCTAVIANTI, F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. **Journal of Medicinal Plants Research**, 33: 7119-7131, 2011.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**, McGraw-Hill Book, New York. 523p. 1940.

KOTHARI, S.L.; JOSHI, A.A.; KACHHWAHA, A.S.; OCHOA-ALEJO, A.N. Chili peppers - A review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, 28: 35-48, 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51: 49-56, 1997.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10: 188-204, 2010.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annum*. **Biologia Plantarum**, 55: 370-374, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 45: 421-428, 2009.

RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of

neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p.1-6, 2011. *Online First*.

RODRIGUEZ-URIBE, L.; GUZMAN, I.; RAJAPAKSE, W.; RICHINS R.D.; O'CONNELL M.A. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. **Journal of Experimental Botany**, p.1-10, 2011. *Online First*.

SANTANA-BUZZY, N.; CANTO-FLICK, A.; BARAHONA-PÉREZ, F.; MONTALVO-PENICHE, MC.; ZAPATA-CASTILLO, PY.; SOLÍS-RUIZ, A. Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. **Horticultural Science**, 40: 1829-31. 2005.

SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, 55: 356-364, 2008.

SHA VALLI KHAN, P.S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 71: 141-146, 2002.

SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, A.K. *In vitro* azadirachtin production. In: RAMAWAT, K.G.; MERILLON J.M. (eds). **Bioactive molecules and medicinal plants**. Berlin: Springer. 233-254, 2008.

TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 138: 2337-2343, 2005.

TISSERAT, B.; BERHOW, M.; VAUGHN, S.F. Spearmint plantlet culture system as a means to study secondary metabolism. In: JAIN, S.M.; SAXENA, P.K. (eds). **Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants**. New York: Humana Press. 313-324, 2009.

TISSERAT, B.; VAUGHN, S.F.; SILLMAN, R. Influence of modified oxygen and carbon dioxide atmospheres on mint and thyme plant growth, morphogenesis and secondary metabolism *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 20: 912-916, 2002.

VALERO-ARACAMA, C.; WILSON, C.S.B.; KANE, M.E.; PHILMAN, N.L. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 43: 237-246, 2007.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144: 307-313, 1994.

YOON, Y.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Impact of *in vitro* CO<sub>2</sub> enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 65: 183-188, 2009.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 105: 149-158, 2011.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of closed system, diffusive and humidity-induced convective through flow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 59: 113-123, 1999.

ZOBAYED, S.M.A.; MURCH, S.J.; EL-DEMERDASH, M.A.; SAXENA, P.K. NaCl enhances growth and morphogenesis potential of *Alhagi graecorum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 42: 607-613, 2006.

## CAPÍTULO 2

### Influência do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)

#### RESUMO

Poliaminas (PAs) e etileno (ET) desempenham importantes papéis na morfogênese *in vitro* de diversas espécies vegetais e a interação entre estas duas classes de fitormônios tem sido estudada devido ao fato de compartilharem um precursor comum: a S-adenosylmethionine (SAM). Com o objetivo de estudar a influência do ET e de PAs na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental, compostos que atuam na biossíntese e ação do ET ou como sequestrador e PAs e seu inibidor foram adicionados ao meio de regeneração. Os tratamentos com os inibidores de ET, aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (STS), apresentaram alta frequência de regeneração, assim como os tratamentos com o perclorato de mercúrio (PM), que foi eficaz no sequestro do ET produzido pelos explantes. O precursor ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) induziu uma menor taxa de regeneração, elevada calogênese e apresentou os níveis mais altos de etileno, assim como o inibidor da síntese de PAs, metilglioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG). Por outro lado, quando se adicionou as poliaminas putrescina (Put), espermidina (Spd) e espermina (Spm) ao meio de cultura, os níveis de etileno foram mais baixos que o controle e a frequência de regeneração e emissão de gemas adventícias foram mais altas. Esses resultados evidenciam que há uma inter-regulação entre os níveis endógenos de ET e PAs e que os níveis desses hormônios interferem diretamente nas respostas morfogênicas durante a regeneração *in vitro* em *Capsicum annuum* L.

**Palavras-chave:** poliaminas, etileno, *Capsicum annuum* L., morfogênese.

## ABSTRACT

Polyamines (PAs) and ethylene (ET) play important roles in *in vitro* morphogenesis of several plant species, and the interaction between these two classes of hormones has been studied because they share a common precursor: S-adenosylmethionine (SAM). Aiming to study the influence of ET and PAs in *in vitro* morphogenesis of ornamental pepper, compounds that act on ET biosynthesis and action, or as ethylene scavengers, and PAs and their inhibitor were added to the regeneration medium. Treatments with the ET inhibitors aminoethoxyvinylglycine (AVG) and silver thiosulfate (STS) caused a greater regeneration frequency, as well as treatments with mercury perchlorate (MP), which was effective in scavenging the ET produced by the explants. The ET precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) induced a lower regeneration frequency, high callus formation and showed the higher levels of ethylene, as for the PAs inhibitor methylglyoxal-bis-guanilhidrazona (MGBG). On the other hand, when the PAs putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) were added to the medium, ethylene levels were lower than control and regeneration frequency and shoot bud formation were higher. These results show that there is an inter-regulation between the internal levels of ET and PAs and that the levels of these hormones interfere directly in morphogenic responses during *in vitro* regeneration of *Capsicum annuum* L.

**Keywords:** polyamines, ethylene, *Capsicum annuum* L., morphogenesis.

## INTRODUÇÃO

O etileno é um hormônio vegetal gasoso simples que desencadeia ampla variedade de respostas fisiológicas e morfológicas nas plantas, tais como a inibição da expansão celular, a promoção de senescência em folhas e flores, a indução da maturação e abscisão dos frutos, a resistência a patógenos e ao ataque de insetos (BLEECKER e KENDE, 2000; AN et al., 2010). Todavia, diferentes tipos de estresses como inundação, injúrias mecânicas, danos causados por patógenos, déficit hídrico ou seca, toxicidade mineral e salinidade são conhecidos por causarem aumento dos níveis endógenos de etileno, os quais podem agravar os efeitos do estresse (MAYAK et al., 2004; SIDDIKEE et al., 2011).

A produção de etileno nos vegetais é regulada por cascatas de sinalização da cinase da proteína ativada por mitose (MAPKs). Essa ativação se dá em resposta a diversos estímulos internos. O estresse salino, por exemplo, ativa a cascata de MAPK e induz a biossíntese de etileno em plantas (HAHN e MARCH, 2009).

A biossíntese de etileno em plantas superiores se inicia com a conversão da metionina em S-adenosilmetionina (SAM), a qual é convertida em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima sintase do ACC (ACS). O ACC é então convertido em etileno pela enzima oxidase do ACC (ACO). As enzimas ACS e ACO são codificadas por uma família multigênica onde cada gene é regulado independentemente por um estresse específico (BLEECKER e KENDE, 2000; GE et al., 2000; FENG et al., 2011; SIDDIKEE et al., 2011).

Pouco se conhece sobre o efeito do etileno, juntamente com reguladores de crescimento no meio de cultura e suas influências sobre o crescimento de explantes (LIN et al., 2009).

A inibição do etileno pode ser induzida em diferentes etapas em suas vias de biossíntese. A fim de estudar os efeitos do etileno liberado na morfogênese vegetal, os inibidores dos primeiros passos na via de biossíntese, tais como a SAM ou o ACC, têm sido amplamente utilizados. A inibição da atividade da ACC sintase usando aminoetóxi-vinil-glicina (AVG) ou ácido amino-oxiacético (AOA), que impedem a formação de ACC, também pode ser extremamente útil no estudo dos efeitos do etileno (LIN et al., 2009).

Outras substâncias são utilizadas na inibição do etileno, como os íons de prata e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (BARBOSA et al., 2001). O CO<sub>2</sub> pode atuar acidificando o

meio celular, o que reduz a ação da enzima ACO, baixando assim os níveis de etileno (ARIGITA et al., 2005). O íon de prata, aplicado na forma de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) ou tiosulfato de prata (STS), é um potente inibidor da ação desse fitormônio devido à competição por sítios de ligação dos receptores do etileno que estão localizados predominantemente nas membranas (KUMAR et al., 2009).

As poliaminas são compostos de natureza alifática que desempenham várias funções no crescimento e desenvolvimento das plantas (BREGOLI et al., 2006). Elas estão envolvidas em respostas de defesa, uma vez que em condições de estresse, os níveis de biossíntese de poliaminas são significativamente aumentados (FRANCHIN et al., 2007; DIAS et al., 2010).

Estudos realizados por Bais e Ravishankar (2002) mostram que as poliaminas desempenham papel fundamental na morfogênese de plantas. Pua et al. (1996), demonstraram o envolvimento de poliaminas na regeneração de brotos de rabanete. Além disso, estes fitormônios também podem estar relacionados à indução de embriogênese (FEIRER et al., 1984; ROUSTAN et al., 1990), atuam influenciando os eventos organogênicos, tendem a reduzir a oxidação, promovendo diminuição na atividade da peroxidase (TANG et al., 2004) e auxiliam na modulação do aparato fotossintético em plantas superiores (IOANNIDIS et al., 2012).

As poliaminas podem ser classificadas em duas categorias baseado em seu efeito biológico: o primeiro grupo compreende a putrescina e a cadaverina, que estimulam alongamento celular e formação de raízes. O segundo grupo é representado por espermidina e espermina, que controlam a divisão celular e organogênese (KUZNETSOV et al., 2002).

Kumar et al. (2007) demonstraram que a incorporação de inibidores de poliaminas no meio de cultura inibiu completamente a indução de gemas em *Capsicum frutescens* var. KTOC, enquanto a incorporação de poliaminas melhorou a indução de brotação de gemas sob fotoperíodo de 24h.

Apesar de etileno e poliaminas aparentemente possuírem funções biológicas opostas, existe uma relação entre a síntese destes dois fitormônios, uma vez que ambos utilizam o mesmo precursor (SAM) (DIAS et al., 2010). A produção de poliaminas pode desempenhar importante papel na regulação da regeneração *in vitro*, promovendo o alongamento e a divisão celular através da inibição da produção de etileno (HU et al., 2006).

Estudando a consequência da inibição dos efeitos do etileno na morfogênese *in vitro* de pimenteiras do gênero *Capsicum*, Santana-Buzzy et al. (2006) evidenciaram o papel deste fitormônio como um importante fator que contribui para a recalcitrância morfogênica nesse gênero. Além disso, inferiram com seus resultados que essas pimenteiras estão entre as espécies vegetais mais sensíveis ao acúmulo de etileno durante o desenvolvimento *in vitro*.

Baseado nas descrições dos efeitos do etileno e das poliaminas sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, o presente estudo se propôs a investigar a influência do etileno e das poliaminas na indução da morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Desinfestação e germinação *in vitro*

Foram utilizadas sementes de um genótipo de *Capsicum annuum* L. (acesso 132) proveniente do Banco de Germoplasma de Hortaliças do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (BAGH-CCA/UFPB).

Sob condições assépticas, a desinfestação das sementes consistiu da imersão inicial em álcool 70% (v/v) por 60 segundos, seguida pela imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 5% (v/v) (Super Globo<sup>®</sup>, Brasil), por um período de 10 min. Após esse período, foram realizados quatro enxágues com água desionizada e autoclavada. As sementes foram transferidas para frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio de cultura composto pelos de sais MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), complexo vitamínico B5 (GAMBORG et al., 1968), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120°C, 1,1 kPa por 20 min. Foram inoculadas dez sementes por frasco com tampa de polipropileno com uma membrana 0,45 µm (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent) que permite trocas gasosas. A germinação ocorreu em ambiente de sala de crescimento com regime luminoso de 16h, sob irradiância de 60 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (2 lâmpadas fluorescentes, HO Sylvania T12 - 110 W) e temperatura de 25 ± 2°C.

### Morfogênese *in vitro*

Segmentos de hipocótilo (aproximadamente com 10 mm de comprimento) de plântulas de *Capsicum annuum* L. germinadas *in vitro* (Figura 1A), foram inoculados em meio de indução de morfogênese (MIM), suplementado com reguladores de crescimento BA (22,2 µM) + AIA (5,71 µM) (ARROYO e REVILLA, 1991). Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco de vidro (250 mL de capacidade), contendo cinco explantes cada. Estes frascos foram vedados com tampas de polipropileno, nas quais foram fixados septos de silicone para a retirada das amostras da atmosfera interna.

Para avaliar o efeito do precursor ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) e dos inibidores aminoetoxivinilglicina (AVG) e tiosulfato de prata (STS), estes foram adicionados ao meio indutor de morfogênese (MIM), em alíquotas de soluções-estoque filtro-estéreis, correspondentes às concentrações de 3 µM de ACC e AVG, e 10 µM de STS (REIS et al., 2003), após autoclavagem. As soluções de ACC e AVG foram filtro-esterilizadas em membrana com poros de 0,22 µm e 2,5 cm de diâmetro (Millex-GS, Millipore, EUA). O STS foi preparado vertendo-se solução de tiosulfato de sódio sobre cristais de nitrato de prata a uma proporção molar final de 4:1 (tiosulfato:prata) (REID et al., 1980).

A solução de perclorato de mercúrio (PM) (250 mM) foi introduzida ao sistema por meio da fixação de um microtubo de 1,5 mL, previamente autoclavado, ao meio de cultura, sendo o volume de PM utilizado de 500 µL (DIAS et al., 2010). Dois tratamentos foram realizados utilizando o PM: um com este presente no meio de cultura em todo o período de subcultivo e outro com a retirada aos 10 dias de subcultivo.

As poliaminas: putrescina, espermidina e espermina, foram incorporadas ao meio de cultura na concentração de 1 mM, além do inibidor da síntese de poliaminas metilglioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG) (Sigma Chemical Company, USA) na mesma concentração. Todas as soluções tiveram pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e foram filtro-esterilizadas em filtro Millex-GS (Millipore, USA) com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro, sendo acrescidas ao meio de cultura durante o resfriamento, em câmara de fluxo laminar.

Na Tabela 1, tem-se um resumo das substâncias e concentrações utilizadas nos tratamentos utilizados no experimento.

**Tabela 1** - Substâncias adicionadas ao meio de indução de morfogênese (MIM) em cada tratamento e suas concentrações.

<b>Tratamento</b>	<b>Substância</b>	<b>Concentração</b>
<b>1 - Controle</b>	—	—
<b>2 - PUT</b>	Putrescina	1 mM
<b>3 - SPD</b>	Espermidina	1 mM
<b>4 - SPM</b>	Espermina	1 mM
<b>5 - MGBG</b>	Metilglioxal-bis-guanilhidrazona	1 mM
<b>6 - ACC</b>	Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano	3 µM
<b>7 - AVG</b>	Aminoetoxivinilglicina	3 µM
<b>8 - STS</b>	Tiosulfato de prata	10 µM
<b>9 - PM</b>	Perclorato de mercúrio	250 mM
<b>10 - PM*</b>	Perclorato de mercúrio*	250 mM

\* = Perclorato de mercúrio retirado aos 10 dias de subcultivo.

## **Avaliações**

A capacidade morfogênica do material vegetal foi avaliada através da frequência média de regeneração, número de ramos por explante (considerando apenas aqueles de comprimento maior que 2 mm) e número de calos por explante.

Aos 6, 9, 12, 15, 18 e 30 dias de cultivo foram quantificados os níveis de produção de etileno e aos 9, 18 e 30 dias de cultivo os níveis de poliaminas livres nos tratamentos, baseado na metodologia proposta por Reis et al. (2003) e Silveira et al. (2004).

A mensuração dos níveis de etileno foi realizada no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Para tal, utilizou-se uma seringa esterilizada de 1cm<sup>3</sup> para a coleta de amostras do ar contidas no interior dos recipientes. A concentração de etileno, expressa em  $\mu\text{L L}^{-1} \text{C}_2\text{H}_4 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  foi avaliada em cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890, série II, com detector de ionização de chama (FID) a temperatura de 150°C, injetor a 110°C e coluna Porapak-N a temperatura de 60°C, usando como gás de arraste o dinitrogênio.

A quantificação de poliaminas foi realizada no Laboratório de Biologia Celular (BIOCEL), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2004). O fracionamento das poliaminas foi realizado em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna C<sub>18</sub> de 5  $\mu\text{m}$  (Shimadzu Shin-pack CLC ODS), utilizando acetonitrila como fase móvel. O gradiente de acetonitrila absoluta foi programado para 65% nos primeiros 10 minutos, de 65 a 100% entre 10 e 13 minutos e 100% entre 13 e 21 minutos. O fluxo de corrida foi de 1 mL min<sup>-1</sup> a 40°C, sendo o detector de fluorescência calibrado para 340 nm (excitação) e 510 nm (emissão).

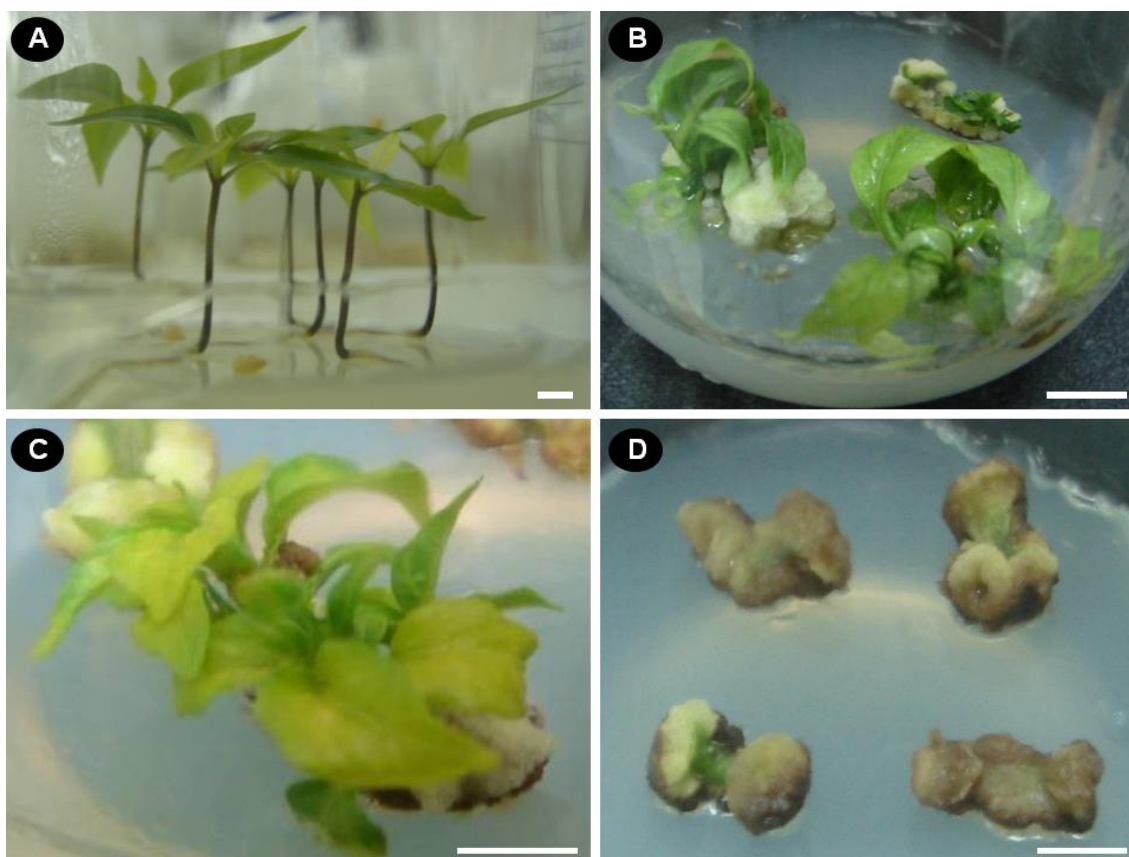
## **Delineamento experimental**

Os experimentos foram constituídos por 10 tratamentos com 5 repetições cada em DIC. Os dados foram submetidos à ANOVA e para a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para todos os experimentos. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa GENES versão Windows/2004.2.1 (CRUZ, 2006).

## RESULTADOS

### Respostas morfogênicas

Três diferentes tipos de respostas morfogênicas foram observados nos tratamentos: tratamentos que apresentaram calogênese e organogênese direta (Figura 1B), organogênese direta com emissão de brotações adventícias (Figura 1C) e apenas calogênese (Figura 1D).



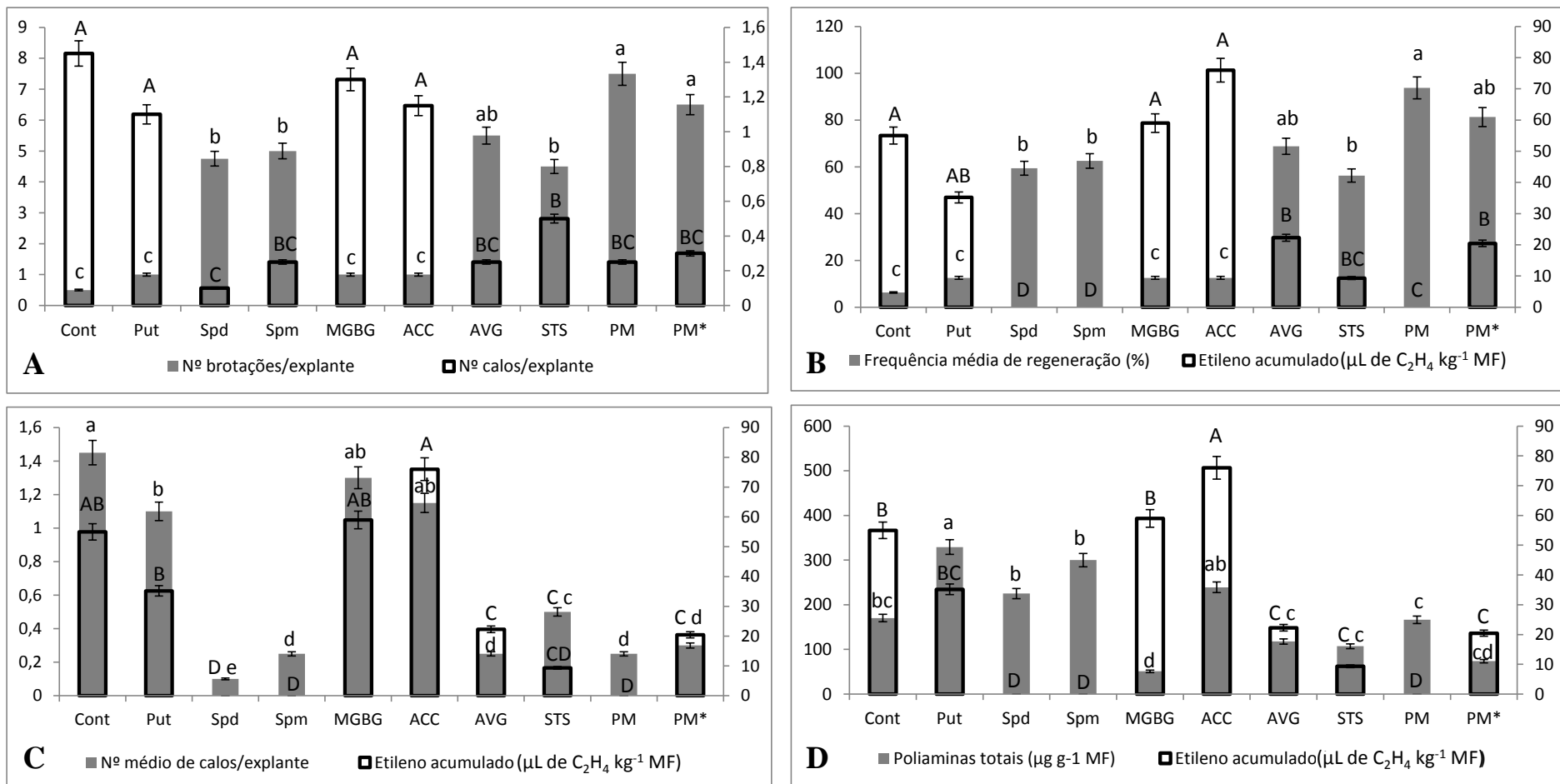
**Figura 1** - Cultivo *in vitro* de *Capsicum annuum* L. **A.** Plântulas aos 30 dias após germinação; **B.** Presença de brotações adventícias e calos em explantes hipocotiledonares após 30 dias de cultivo em meio de indução de morfogênese (MIM); **C.** Folhas expandidas após 30 dias de cultivo em MIM (organogênese direta); **D.** Calogênese em explantes hipocotiledonares após 30 dias de cultivo em MIM. (Barra: 1,0 cm).

Houve correlação negativa entre o número médio de brotações e o número médio de calos nos tratamentos. O tratamento controle e os meios com adição de putrescina (Put), MGBG e ACC produziram maior calogênese, enquanto que os tratamentos com perclorato de mercúrio (PM) e perclorato de mercúrio retirado aos 10 dias de cultivo (PM\*) apresentaram as maiores médias de brotações por explante, seguidos pelos tratamentos acrescidos de AVG, espermidina (Spd), espermina (Spm) e tiosulfato de prata (STS) (Figura 2A). A maior frequência média de regeneração foi obtida pelo PM, o qual não diferiu estatisticamente do AVG e do PM\*. Spm, Spd e STS apresentaram valores intermediários, ao passo que MGBG, ACC, Put e Controle tiveram as menores frequências de regeneração (Figura 2B).

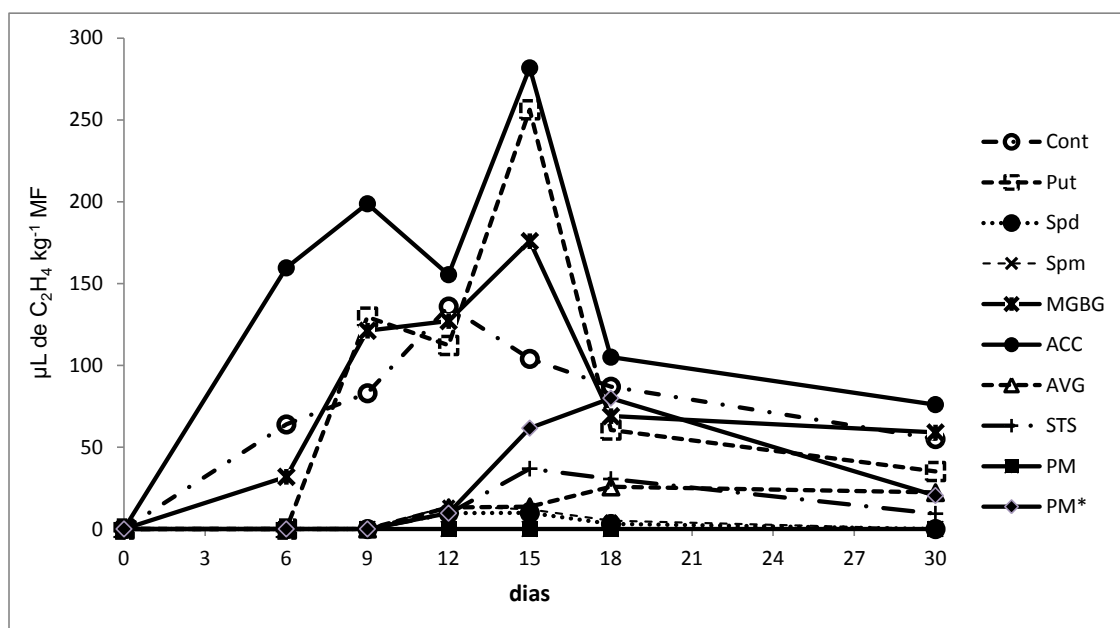
### **Níveis de etileno**

Os níveis mais elevados de etileno (ET), durante os 30 dias de cultivo, foram observados, em ordem decrescente, nos tratamentos ACC, Put, MGBG e Controle. Sendo que nesses três primeiros, o valor máximo foi observado por volta do 15º dia, enquanto que no controle o valor máximo ocorreu próximo ao 12º dia. Os tratamentos AVG, STS, PM\*, Spd e Spm apresentaram valores nulos de ET até o 9º dia de cultivo, no entanto, passaram a apresentar ET a partir do 12º dia, tendo estes dois últimos voltado a apresentar valores nulos de ET ao 30º dia. O tratamento PM foi o único que não apresentou ET, em todos os dias de avaliação (Figura 3).

Os tratamentos que apresentaram os maiores níveis de acúmulo de ET promoveram maior calejamento (Controle, MGBG, ACC e Put) (Figura 2C). Por outro lado, os tratamentos que apresentaram as maiores frequências de regeneração (PM, PM\*, AVG, Spm, Spd e STS) coincidiram com os que tiveram os níveis mais baixos de acúmulo de ET (Figura 2B).



**Figura 2** - Relação entre os níveis de poliaminas, etileno e características morfológicas em *Capsicum annuum* L. **A.** Número de brotações e número de calos; **B.** Níveis de etileno e calogênese; **C.** Níveis de etileno e frequência de regeneração; **D.** Níveis de etileno e poliaminas. Médias indicadas pelas mesmas letras minúsculas nas barras cheias e maiúsculas nas barras vazadas não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.



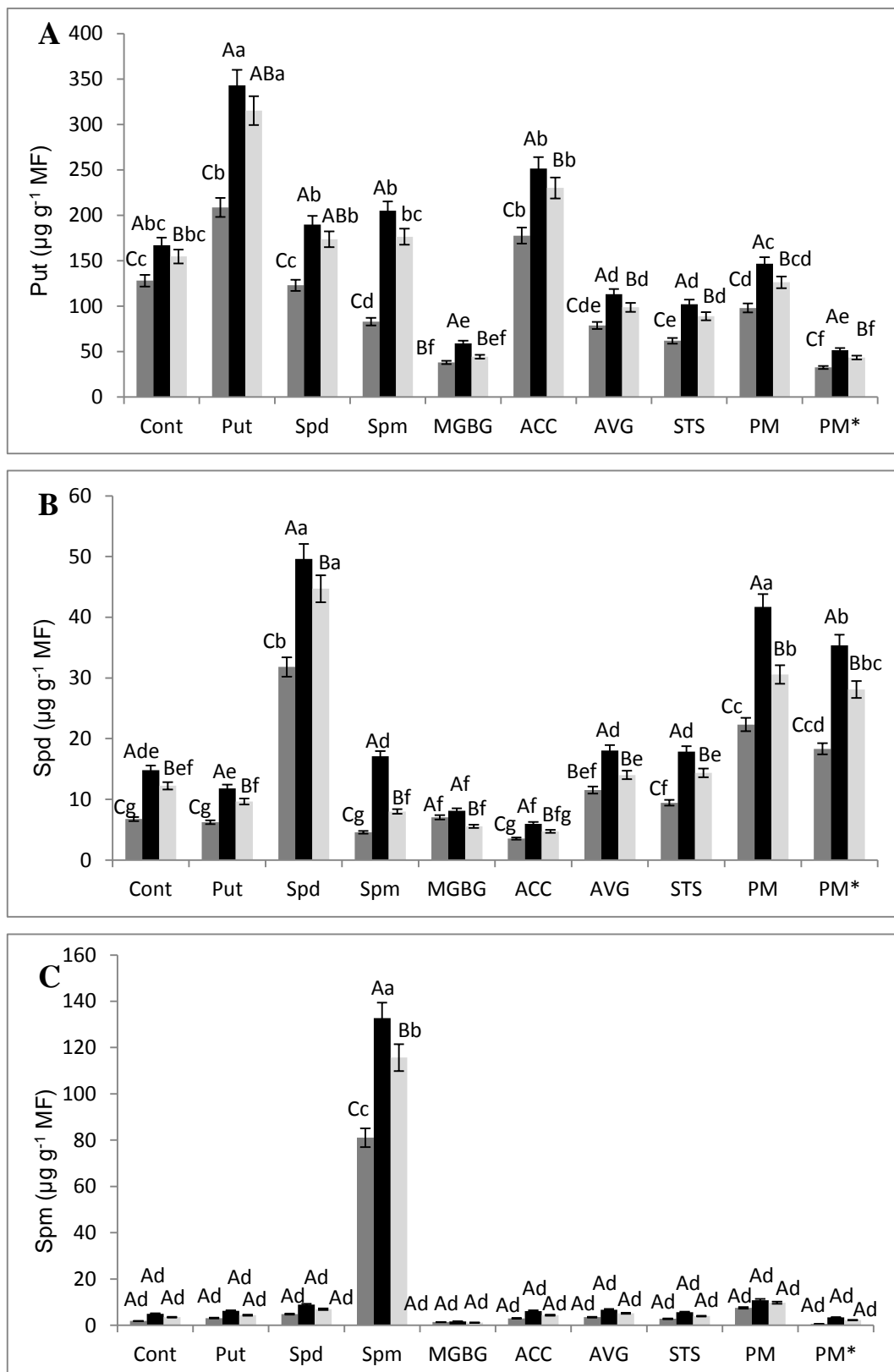
**Figura 3** - Níveis de acúmulo de etileno ( $\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1} \text{ MF}$ ) mensurado ao longo do período de indução de morfogênese. Cont = controle; Put = putrescina; Spd = espermidina; Spm = espermidina; MGBG = metilglioxal-bis-guanilhidrazona; ACC = ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano; AVG = aminoetoxivinilglicina; STS = tiosulfato de prata; PM = perclorato de mercúrio; PM\* = perclorato de mercúrio retirado ao 10º dia de cultivo.

### Poliaminas endógenas

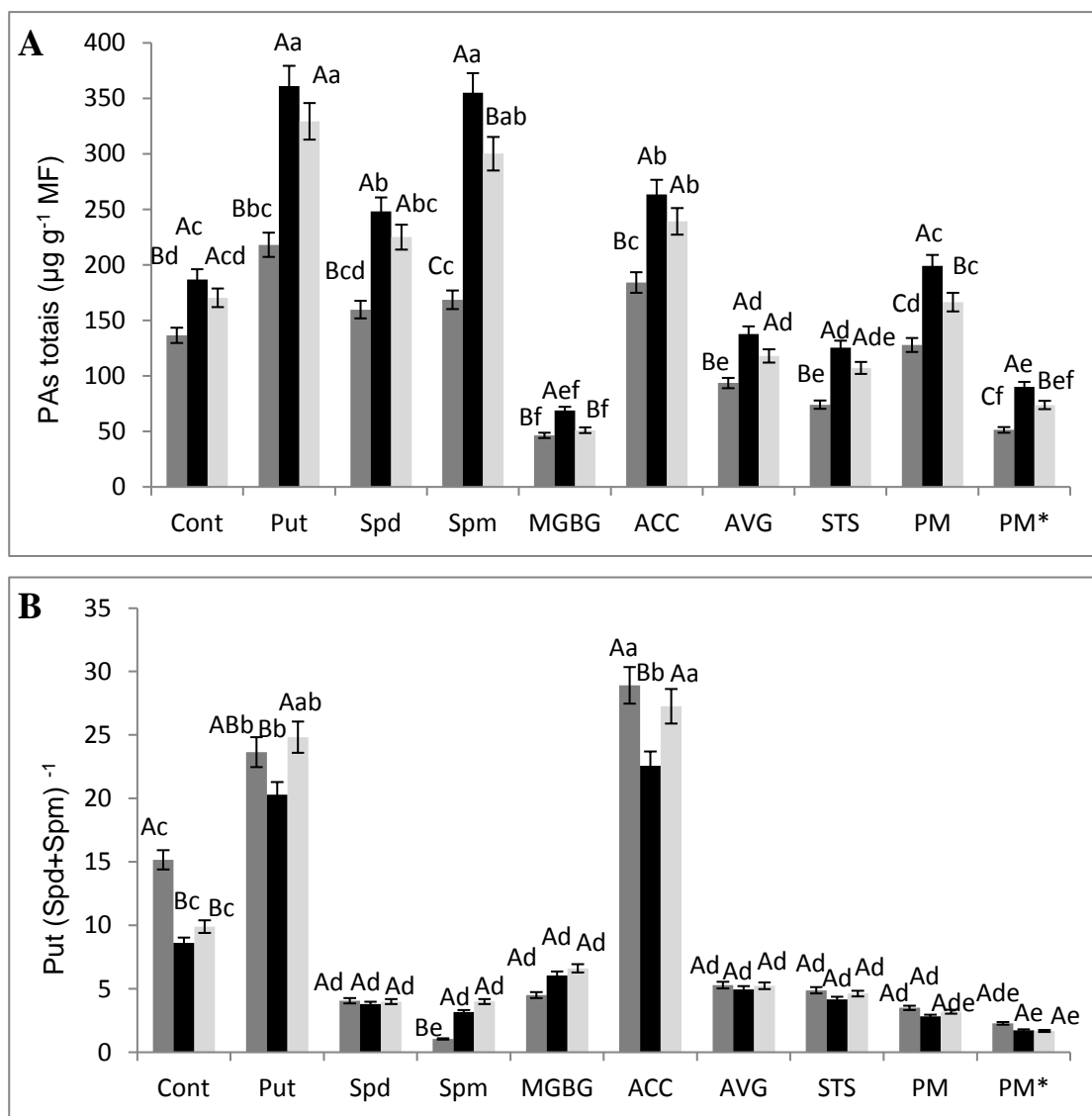
Os níveis mais altos de putrescina (Put) foram observados no tratamento ao qual se adicionou esta poliamina ao meio de cultura; em seguida, ACC, Spm, Spd e o controle; logo após, o grupo com os inibidores PM, AVG e STS e, por fim, os menores teores endógenos de Put ocorreram nos explantes dos tratamentos MGBG e PM\* (Figura 4A).

Assim como aconteceu com a Put, os maiores teores de Spd e Spm ocorreram nos tratamentos aos quais se adicionaram estas PAs ao MIM (Figura 4B, C). PM, contudo, não diferiu estatisticamente da maior média e PM\* apresentou níveis intermediários de espermidina (Figura 4B).

Em relação às PAs totais, Put e Spm obtiveram as melhores médias. Inferiores a estas, porém superiores a PM e ao controle foram ACC e Spd. Os teores mais baixos de PAs totais ocorreram nos tratamentos AVG, STS, PM\* e MGBG (Figura 5A).



**Figura 4** - Níveis de poliaminas livres ( $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4 \text{ kg}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Capsicum annuum* L. **A.** putrescina (Put); **B.** espermidina (Spd); **C.** espermina (Spm). Médias indicadas pelas mesmas letras minúsculas entre todos os tratamentos e maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. ■ 9 dias ■ 18 dias ■ 30 dias



**Figura 5** - Níveis de poliaminas livres ( $\mu\text{L}$  de  $\text{C}_2\text{H}_4$   $\text{kg}^{-1}$  MF) em explantes de hipocótilo de *Capsicum annuum* L. **A.** Poliaminas totais; **B.** Razão Put (Spd+Spm) $^{-1}$ . Médias indicadas pelas mesmas letras minúsculas entre todos os tratamentos e maiúsculas dentro de um mesmo tratamento não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. ■ 9 dias ■ 18 dias ■ 30 dias

As maiores razões putrescina / (espermidina + espermina) foram observadas nos tratamentos com adição de ACC e Put. Estes apresentaram médias superiores ao controle, que por sua vez foi superior aos demais tratamentos (Figura 5B).

Em todos os tratamentos, tanto as PAs analisadas individualmente (putrescina, espermidina e espermina) quanto as PAs totais apresentaram teores mais altos no 18º que no 9º e 30º dias de análise (Figuras 4 e 5).

## DISCUSSÃO

Vários trabalhos têm relatado a influência do ET na morfogênese *in vitro* em diversas espécies (BARTLEY e ISHIDA, 2007; DIAS et al., 2010; LEON-REYES et al., 2010; MENDES et al., 2011). Dentre estas, as pimenteiras do gênero *Capsicum* destacam-se como uma das espécies cultivadas mais sensíveis ao ET durante seu desenvolvimento (SANTANA-BUZZY et al., 2005; SANTANA-BUZZY et al., 2006; NÚÑEZ-PASTRANA et al., 2011).

Observou-se uma relação diretamente inversa entre a produção de ET e a frequência de regeneração, evidenciado pela inibição da emissão de brotações nos tratamentos que apresentaram maiores níveis de ET. Estes resultados são concordantes com os encontrados por Santana-Buzzy et al. (2006) na regeneração *in vitro* de *Capsicum chinense*, onde frascos que acumularam mais ET foram aqueles que apresentaram maior calogênese e menos brotações, demonstrando assim que o ET desempenha papel importante na formação de calos nas espécies deste gênero.

Em concordância com os dados apresentados por Reis et al. (2003) e Dias et al. (2010) em trabalhos com o gênero *Passiflora*, os níveis mais elevados de ET durante todo o período de cultivo foram encontrados no tratamento que se adicionou ACC, o que mostra a eficácia do precursor na síntese deste fitormônio não só nos primeiros dias, mas em todo o período de cultivo, o que provavelmente se deve ao fato do ET liberado poder ativar ou inibir a sua produção autocataliticamente. Esta autorregulação ambígua sugere que o modo de ação do ET é modulado mais pela sua concentração do que simplesmente pela sua presença ou ausência no meio (PIERIK et al., 2006).

Os inibidores AVG e STS foram eficazes na diminuição dos níveis de ET no interior dos frascos de cultura. Estes tratamentos tiveram uma frequência de regeneração mais alta que o tratamento controle e apresentaram baixa taxa de calogênese. De acordo com Gong et al. (2005), a introdução dos antagonistas do ET nos meios de cultura afetam o nível de ACC, que por sua vez afeta os níveis de ET.

Quando o PM foi utilizado, obtiveram-se valores nulos de ET, o que mostra que este foi eficaz na captura do ET produzido, concordando assim com os resultados obtidos por Dias et al. (2010). Entretanto, no tratamento em que o PM foi retirado ao 10º dia de cultivo, baixos níveis de ET foram identificados já ao 12º dia, quando já não estava mais havendo o sequestro do ET.

Put, Spd e Spm desempenham diferentes papéis na morfogênese de diferentes espécies vegetais (ZHU e CHEN, 2005). As PAs adicionadas ao meio de cultura têm sido amplamente utilizadas para o estudo da função deste fitormônio no crescimento e diferenciação celular (MARTIN-TANGUY, 2001).

Neste estudo, Spm e Spd adicionadas exogenamente causaram aumento na frequência de regeneração e na emissão de brotações. Estas PAs causaram aumento na emissão de brotações em orquídeas do gênero *Dendrobium* (KUMARI e GEORGE, 2011) e induziram maior resistência à salinidade em cultivares susceptíveis de arroz, restaurando características inibidas por este estresse como comprimento de raiz e comprimento de parte aérea, além de mostrarem-se imprescindíveis para a indução de gemas adventícias e altas taxas de regeneração (ROYCHOUDHURY et al., 2011). Resultados similares foram encontrados em pimenteiras da espécie *Capsicum frutescens*, onde a incorporação de poliaminas exógenas aumentou o número de brotações e a porcentagem de regeneração dos explantes (KUMAR et al., 2007).

Observou-se neste estudo que Spd e Spm resultaram numa menor frequência de calejamento, baixa produção de ET e altos níveis de poliaminas totais, sugerindo que estas PAs atuem direcionando a SAM para a produção de SAM descarboxilada e, conseqüentemente, das demais PAs em detrimento da rota de produção do ET.

Inversamente ao que ocorreu com Spd e Spm, quando se adicionou Put ao meio houve baixa frequência de regeneração, alta taxa de formação de calos e altos níveis de ET, o que possivelmente foi causado por uma indução de alta atividade da sintase do ACC devido a uma menor demanda desta enzima pela rota de síntese de poliaminas. Neste tratamento e no tratamento em que se adicionou ACC houve um acréscimo na razão Put / (Spd + Spm), o que corrobora com a relação antagônica existente entre estes grupos de PAs (SHOEB et al., 2001; ZHU e CHEN, 2005).

A adição de MGBG ao meio causou baixos níveis de poliaminas e alta produção de ET, neste tratamento houve pouca indução de gemas adventícias e alta calogênese. Resultados semelhantes foram observados em *Malus domestica* Borkh. em que a aplicação de MGBG induziu a um acréscimo nos níveis e uma aceleração no acúmulo de ET e reduziu drasticamente os teores de Put, Spd e Spm, demonstrando que o MGBG pode ter importante influência na expressão de genes-chave envolvidos na síntese do ET (PANG et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos em *Passiflora* sp., em que a inibição das PAs reduziu a taxa de diferenciação (DIAS et al., 2009).

Pode-se concluir que os níveis internos de ET e PAs são inter-regulados pelas concentrações destes próprios hormônios e interferem diretamente nos eventos morfogênicos em *C. annuum* L. Altas concentrações de ET promovem calogênese na fase de regeneração a partir de segmentos de hipocótilo. Maiores concentrações de PAs (Spd e Spm), por sua vez, inibem a produção de ET e induzem a formação de organogênese direta, aumentando a frequência de regeneração, o que pode ser uma importante ferramenta visando atenuar o problema da recalcitrância *in vitro* desta espécie. Entretanto, a maior frequência de regeneração ocorreu na condição de ausência de etileno na atmosfera do frasco de cultura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, F.; ZHAO, Q.; JI, Y.; LI, W.; JIANG, Z.; YU, X.; ZHANG, C.; HAN, Y.; HE, W.; LIU, Y.; ZHANG, S.; ECKER, J.R.; GUO, H. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE<sub>3</sub> and EIN<sub>3</sub>-LIKE<sub>1</sub> is mediated by proteasomal degradation of EIN<sub>3</sub> binding F-box 1 and 2 that requires EIN<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, 22: 2384-2401, 2010.

ARIGITA, L.; MAJADA, J.P.; GONZALEZ, A.; SANCHEZ-TAMES, R. Controle Ambiental en cultivo *in vitro*: CO<sub>2</sub> y etileno. In: SANCHEZ-OLATE, M.E.; LEAL, D.G.R. (eds.). **Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal**, Universidad de Concepcion, Concepcion - Chile. p.105-117, 2005.

ARROYO, R.; REVILLA, M.A. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant Cell Reports**, 10: 414-416, 1991.

BAIS, H.P.; RAVISHANKAR, G.A. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 69: 1-34, 2002.

BARBOSA, W.M.; OTONI, W.C.; CARNELLOSSI, M.; SILVA, E.; AZEVEDO, A.A.; VIEIRA, G. Rhizogenesis *in vitro* shoot cultures of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) is affected by ethylene precursor and by inhibitors. **International Journal of Horticultural Science**, 7: 47-51, 2001.

BARTLEY, G.E.; ISHIDA, B.K. Ethylene-sensitive and insensitive regulation of transcription factor expression during *in vitro* tomato sepal ripening. **Journal of Experimental Botany**, 58: 2043-2051, 2007.

BLEECKER, A.B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 16: 1-18, 2000.

BREGOLI, A.M.; ZIOSI, V.; BIONDI, S.; CLAUDIO, B.; COSTA, G.; TORRIGIANI, P. A comparison between intact fruit and fruit explants to study the effect of polyamines and aminoethoxyvinylglycine (AVG) on fruit ripening in peach and nectarine (*Prunus persica* L. Batch). **Postharvest Biology and Technology**, 42: 31-40, 2006.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

DIAS, L.L.C.; SANTA-CATARINA, C.; RIBEIRO, D.M.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine production patterns during *in vitro* shoot organogenesis of two passion fruit species as affected by polyamines and their inhibitor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 99: 199-208, 2009.

DIAS, L.L.C.; RIBEIRO, D.M.; SANTA CATARINA, C.; BARROS, R.S.; FLOH, E.I.S.; OTONI, W.C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers. **Plant Growth Regulation**, 62: 9-19, 2010.

FEIRER, R.P.; MIGNON, G.; LITVAY, J.D. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. **Science**, 223: 1433-1435, 1984.

FENG, H-Y.; WANG, Z-M.; KONG, F-N.; ZHANG, M-J.; ZHOU, S-L. Roles of carbohydrate supply and ethylene, polyamines in maize kernel set. **Journal of Integrative Plant Biology**, 53: 388-398, 2011.

FRANCHIN, C.; FOSSATI, T.; PASQUINI, E.; LINGUA, G.; CASTIGLIONE, S.; TORRIGIANI, P.; BIONDI, S. High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). **Physiologia Plantarum**, 130: 77-90, 2007.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968.

GE, L.; LIU, J.Z.; WONG, W.S.; HSIAO, W.L.W.; CHONG, K.; XU, Z.K.; YANG, S.F.; KUNG, S.D.; LI, N. Identification of a novel multiple environmental factor-responsive 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene, *NTACS2*, from tobacco. **Plant, Cell & Environment**, 23: 1169-1182, 2000.

GONG, Y.; GAO, F.; TANG, K. *In vitro* high frequency direct root and shoot regeneration in sweet potato using the ethylene inhibitor silver nitrate. **South African Journal of Botany**, 71: 110-113, 2005.

HAHN, A.; MARCH, H.K. Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both? **Plant Physiology**, 149: 1207-1210, 2009.

HU, W-W.; GONG, H.; PUA, E-C. Modulation of SAMDC expression in *Arabidopsis thaliana* alters *in vitro* shoot organogenesis. **Physiologia Plantarum**, 128: 740-750, 2006.

IOANNIDIS, N.E.; CRUZ, J.A.; KOTZABASIS, K.; KRAMER, D.M. Evidence that putrescine modulates the higher plant photosynthetic proton circuit. **Plos One**, 7: 1-6, 2012.

KUMAR, V.; SHARMA, A.; PRASAD, B.C.N.; GURURAJ, S.B.; GRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. **Acta Physiologiae Plantarum**, 29: 11-18, 2007.

KUMAR, V.; PARVATAM, G.; RAVISHANKAR, G.A. AgNO<sub>3</sub> - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. **Electronic Journal of Biotechnology**, 12: 1-15, 2009.

KUMARI, I.P.; GEORGE, T.S. *In vitro* clonal shoot morphogenesis of commercial *Dendrobium* orchid cultivars in polyamines supplemented medium. **Journal of Tropical Agriculture**, 49: 118-120, 2011.

KUZNETSOV, V.V.; RAKITIN, V.Y.; SADOMOV, N.G.; DAM, D.V.; STETSENKO, L.A.; SHEVYAKOVA, N.I. Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants? **Russian Journal of Plant Physiology**, 49: 120-130, 2002.

LEON-REYES, A.; DU, Y.; KOORNNEEF, A.; PROIETTI, S.; KÖRBES, A.P.; MEMELINK, J.; PIETERSE, C.M.J.; RITSEMA, T. Ethylene Signaling Renders the Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 23: 187-197, 2010.

LIN, Z.; ZONG, S.; GRIESON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, 60: 3311-3336, 2009.

MARTIN-TANGUY, J. Metabolism and function of polyamines in plants: Recent developments (new approaches). **Plant Growth Regulation**, 34: 135-148, 2001.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 565-572, 2004.

MENDES, A.F.S.; CIDADE, L.C.; OTONI, W.C.; SOARES-FILHO, W.S.; COSTA, M.G.C. Role of auxins, polyamines and ethylene in root formation and growth in sweet orange. **Biologia Plantarum**, 55: 375-378, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15: 473-497, 1962.

NÚÑEZ-PASTRANA, R.; ARCOS-ORTEGA, G.F.; SOUZA-PERERA, R.A.; SÁNCHEZ-BORGES, C.A.; NAKAZAWA-UEJI, Y.E.; GARCÍA-VILLALOBOS F.J.; GUZMÁN-ANTONIO A.A.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. **European Journal of Plant Pathology**, 131: 669-683, 2011.

PANG, X.M.; NADA, K.; KUROSAWA, T.; BAN, Y.; MORIGUCHI, T. Effect of methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) on polyamine and ethylene biosynthesis of apple fruit after harvest. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32: 1005-1010, 2010.

PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H.; VISSER, E.J.; VOESENEK, L.A. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends in Plant Science**, 11: 176-183, 2006.

PUA, C.E.; SIM, E.G.; CHI, L.G.; KONG, F.L. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyls explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L var Longipinnatus Bailey) *in vitro*. **Plant Cell Reports**, 15: 685-690, 1996.

REID, M.S.; PAUL, J.L.; FARHOOMAND, M.B.; KOFRANEK, A.M.; STABY, G.L. Pulse treatments with the silver thiosulfate complex extend the vase life of cut carnations. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 105: 25-27, 1980.

REIS, LB.; PAIVA NETO, V.B.; PICOLI, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; RÊGO, M.M.; CARVALHO, C.R.; FINGER, F.L.; OTONI, W.C. Axillary bud development of passion fruit as affected by ethylene precursor and inhibitors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 39: 618-622, 2003.

ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO<sub>3</sub> an inhibitor of ethylene action effect on arginine decarboxylase activity. **Plant Science**, 67: 89-95, 1990.

ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S.; SENGUPTA, D.N. Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, 168: 317-328, 2011.

SANTANA-BUZZY, N.; CANTO-FLICK, A.; BARAHONA-PÉREZ, F.; MONTALVO-PENICHE, MC.; ZAPATA-CASTILLO, PY.; SOLÍS-RUIZ, A.

Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. **Horticultural Science**, 40: 1829-31, 2005.

SANTANA-BUZZY, N.; CANTO-FLICK, A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; MONTALVO-PENICHE, M.C.; LÓPEZ-PUC, G.; BARAHONA-PÉREZ, F. Improvement of *in vitro* culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. **Horticultural Science**, 41: 405-409, 2006.

SHOEB, F.; YADAV, J.S.; BAJAJ, S.; RAJAM, M.V. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. **Plant Science**, 160: 1229-1235, 2001.

SIDDIKKEE, M.A.; CHAUHAN, O.S.; TONGMIN, S.A. Regulation of ethylene biosynthesis under salt stress in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-producing halotolerant bacteria. **Plant Growth Regulation**, 10: 1-8, 2011.

SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W.; GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 76: 53-60, 2004.

TANG, W.; NEWYON, R.J.; OUTHAVONG, V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. **Physiologia Plantarum**, 122: 386-395, 2004.

ZHU, C.; CHEN, Z. Role of polyamines in adventitious shoot morphogenesis from cotyledons of cucumber *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 81: 45-53, 2005.

## CONCLUSÕES GERAIS

- As concentrações internas de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e etileno, alteradas de acordo com o tipo de vedação do frasco de cultura, afetaram diretamente o desenvolvimento morfogênico em *Capsicum annuum* L., onde maiores trocas gasosas proporcionaram plântulas com características morfológicas mais interessantes para a micropropagação.

- Durante a indução de morfogênese em *C. annuum* L., frascos com membranas que permitem trocas gasosas possibilitaram uma maior frequência média de regeneração e explantes hipocotiledonares mostraram-se mais efetivos que explantes cotiledonares.

- Os níveis de etileno acumulado no interior dos frascos de cultura mostraram-se diretamente relacionados com as diferentes vias de regeneração de *C. annuum* L., sendo que baixas concentrações de etileno ocorreram quando houve presença de gemas adventícias (organogênese direta), enquanto que altas concentrações ocorreram quando houve maior calogênese.

- Os níveis endógenos de poliaminas interferiram diretamente na produção de etileno, indicando que a competição entre as duas rotas biossintéticas promove uma inter-regulação na produção destes dois fitormônios.