



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

TESE

**CULTURA DE ANTERAS E DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS
IMATUROS NO MELHORAMENTO DE PIMENTEIRAS
ORNAMENTAIS (*Capsicum annum* L.)**

PRISCILA ALVES BARROSO

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA**



**CULTURA DE ANTERAS E DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS
IMATUROS NO MELHORAMENTO DE PIMENTEIRAS
ORNAMENTAIS (*Capscium annum L.*)**

PRISCILA ALVES BARROSO

Sob a Orientação do Professor
Mailson Monteiro do Rêgo

e Coorientação da Professora
Elizanilda Ramalho do Rêgo

Tese submetida como requisito
para obtenção do grau de Doutor
em Agronomia, no Programa de
Pós-Graduação em Agronomia.

Areia, PB
Fevereiro de 2016

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

B277c Barroso, Priscila Alves.

Cultura de anteras e de embriões zigóticos imaturos no melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.) / Priscila Alves Barroso. - Areia: UFPB/CCA, 2016.

ix, 74 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo.

Coorientadora: Elizanilda Ramalho do Rêgo

1. Pimenta 2. Cultura de tecidos 3. Melhoramento genético vegetal 4. Androgênicos
5. Embriogênese I. Rêgo, Mailson Monteiro do II. Rêgo, Elizanilda Ramalho do
III. Título.

UFPB/CCA

CDU: 633.842(043.2)


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

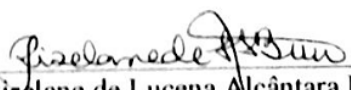
**Cultura de anteras e de embriões zigóticos imaturos no melhoramento
de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.)**

AUTOR: PRISCILA ALVES BARROSO

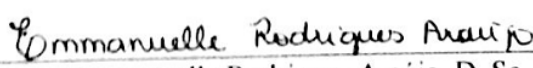
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em
AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:



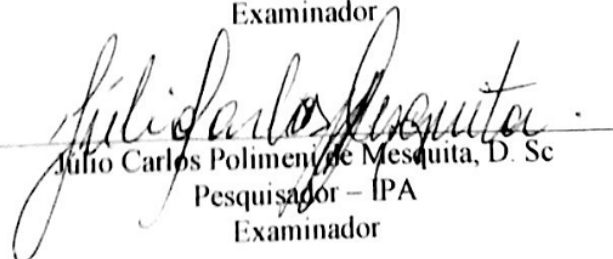
Prof.º Mailson Monteiro do Rêgo, Ph.D
CCA/UFPB
Orientador



Prof.ª Riselane de Lucena Alcântara Bruno, D. Sc
CCA/UFPB
Examinador



Emmanuelle Rodrigues Araújo, D. Sc
Bolsista Pós Doutorado - IPA
Examinador



Julio Carlos Polimeni de Mesquita, D. Sc
Pesquisador – IPA
Examinador

Data da realização: 17 de fevereiro de 2016

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. Mailson Monteiro do Rêgo

A minha mãe Vera Lúcia Alves da Silva Barroso
Ao meu pai Severino Ramos Nogueira Barroso
A minha irmã Karol Alves Barroso
A minha pequena prima e afilhada Maria Letícia
Em especial a minha avó Letice Alves Silva (in memorian)
Dedico

“Nenhum dever é mais importante ao homem do que a gratidão”

Henry Ford

A Deus pai todo poderoso e a Santíssima Virgem Maria por nunca perder a fé, por não permitir que eu perca o equilíbrio e minha força em todas as batalhas vencidas nesta caminhada.

A minha família, principalmente aos meus pais Ramos e Vera e minha irmã Karol pelo amor e apoio em horas difíceis

A Raylson de Sá Melo pelo amor, incentivo, ensinamentos, companheirismo, paciência e compreensão.

A minha grande incentivadora Prof.^a Dr. Flávia Cartaxo Ramalho Vilar por ter acreditado, apoiado e aconselhado para que eu pudesse chegar até aqui.

A todos os meus amigos Tecnólogos que mesmo longe torcem por mim. Em especial a Wilza Souza, Paulo Nogueira e Juliane Alves que estiveram comigo este período.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa.

A Universidade Federal da Paraíba e aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia em especial a Prof.^a Riselane Bruno pelo apoio direto nas pesquisas

Ao meu orientador professor Dr.^o Mailson Monteiro do Rêgo, pelo incentivo, pelos valiosos ensinamentos tanto do ponto de vista profissional como pessoal e principalmente pela confiança depositada, minha eterna gratidão.

A minha coorientadora professora Dr.^a Elizanilda Ramalho do Rêgo pela amizade, atenção, críticas, ensinamentos e sugestões sempre no momento exato, minha admiração e gratidão sempre.

Aos membros da banca Prof.^a Riselane, Dr.^a Emmanuelle e Dr.^o Júlio Mesquita pela disponibilidade e contribuições no trabalho

Aos Funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CCA/UFPB) “Seu Max” e “Seu Beto” e “Seu Omar” pela atenção e colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos queridos da cultura de tecidos Kaline, Bruna, Maiara e Joelson pelos momentos de trabalho e diversão

Aos companheiros de laboratório Gláucia, Angela, Marcelo, Lindamara, Tainá, Cristine, Michele, Laís, Márcia, Junior, Fernanda, Wilca, Ayron, Clint, Giovana e Monique pela ajuda e disposição, são todos muito especiais.

As “amigas-irmãs”, Ana Carolina, Lindamara Costa, Gláucia Medeiros, Wilza Carla, Geisa Mayana e Miriam Tavares pela amizade, paciência, ajuda em todos os momentos.

Ao meus amigos Wellington Soares, João Neto, Naysa Flávia e Mayana por todo incentivo e companheirismo e a todas as meninas de Viçosa: Helen, Emily e Fernanda

Aos amigos de sempre Grace Liz, Ítalo Anderson, Raul Marçal, Larissa Felix e Samiris Andrade pela torcida e amizade.

*E a todos que de alguma forma participaram da realização desta obra
Agradeço!*

RESUMO GERAL

BARROSO, Priscila Alves. **Cultura de anteras e de embriões zigóticos imaturos no melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.)**. 2016. 83f. Universidade Federal da Paraíba. Orientador: Mailson Monteiro do Rêgo. Coorientadora: Elizanilda Ramalho do Rêgo.

As pimenteiras cultivadas em vaso têm se destacado no mercado de ornamentais por suas características estéticas que envolvem, entre outros atributos, a coloração do frutos e folhas e harmonia com o vaso. O melhoramento de pimenteiras ornamentais tem sido realizado a longo prazo, envolvendo vários ciclos de autofecundação. Técnicas biotecnológicas, como a cultura de anteras e de embriões zigóticos imaturos, podem auxiliar os programas de melhoramento reduzindo o tempo para o lançamento das novas cultivares. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi induzir embriões androgênicos a partir de anteras de diferentes genótipos de pimenteiras ornamentais e regenerar plantas viáveis a partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos nos diferentes genótipos de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.). Para a técnica de cultura de anteras, foram utilizadas anteras de nove genitores e cinco híbridos. Estas, foram mantidas a 4°C por 3 dias e posteriormente cultivadas em meio dupla camada, com e sem regulador de crescimento e mantidas em B.O.D. a 9°C por uma semana e posteriormente a 28°C na ausência de luz. No cultivo de embriões zigóticos, foram coletados frutos de três genótipos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA). Os frutos foram caracterizados e determinados o estágio de desenvolvimento do embrião. Os embriões foram inoculados em discos de Petri contendo os meios: MS ½ e MS força total. Foi determinado o número de embriões germinados e as perdas durante a aclimatização e transplântio, realizada também a caracterização das plântulas e das plantas em casa de vegetação. Além disso, foi determinado o ciclo de melhoramento das plantas obtidas por embriões imaturos e pelo método convencional. Houve influência dos meios e genótipos na indução de embriões androgênicos. Embriões totalmente desenvolvidos foram observados nos genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099 porém, uma grande quantidade de embriões anormais foi observada. Embriões zigóticos em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser encontrados no mesmo fruto, caracterizando o desenvolvimento assíncrono. Menores taxas de germinação e desenvolvimento das plântulas foram observadas em frutos mais precoces, sendo observada também influência do genótipo. A interação entre os períodos, genótipos e meios influenciaram a caracterização morfológica das plantas em casa de vegetação. Foi observada uma redução de em média 30% no ciclo de melhoramento, nos três genótipos. Estudos mais aprofundados devem ser realizados buscando aumentar a conversão em embriões androgênicos normais e no caso dos embriões zigóticos, aumentar as taxas de germinação nos períodos de 20 e 25 DAA e reduzir as perdas durante a aclimatização e transplântio. Ainda assim, uma redução considerável no ciclo de melhoramento foi conseguida, como também a identificação de genótipos responsivos a cultura de anteras. Sendo assim, será uma ferramenta valiosa para o programa de melhoramento de ornamentais.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*, Cultura de tecidos, Androgênese, Embriogênese zigótica, Melhoramento de ornamentais

ABSTRACT

BARROSO, Priscila Alves. **Anther culture and immature zygotic embryos in the breeding of ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.)**. 2016 83F. Universidade Federal da Paraíba. Orientador: Mailson Monteiro do Rego. Coorientador(a): Elizanilda Ramalho do Rego.

The pepper cultivates in pots have stood out in the ornamental market for its aesthetic features that include, among other attributes, the fruits and leaves color and harmony with the pots. The ornamental pepper breeding has been carried out over the long-term, involving multiple cycles of selfing. Biotechnological techniques, such as the culture of anther and immature zygotic embryos, can assist breeding programs reducing the time for the release of new cultivars. Thus, the objective was to induce androgenic embryos from anthers of different genotypes of ornamental pepper and regenerate viable plants from *in vitro* culture of immature zygotic embryos in different genotypes of ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). For anther culture technique were used anther of nine parents and five hybrids. These were maintained at 4°C for 3 days and subsequently cultured in double layer, with and without growth regulator and maintained in B.O.D. at 9 ° C for one week and then at 28° C in the absence of light. The cultivation of zygotic embryos, fruit of three genotypes were collected 20, 25, 30 and 35 days after selfing (DAA). Fruits were characterized and determined the embryo stage of development. The embryos were inoculated in the petri dishes containing the media: ½ MS and MS overall strength. It was recorded the number of embryos germinated and losses during acclimatization and transplantation, also the characterization of seedlings and plants in a greenhouse. In addition, it was determined breeding cycle plant of immature embryos and by the conventional method. There was influence of the media and genotypes in the induction of androgenic embryos. Fully developed embryos were observed in genotypes UFPB 001, UFPB 004 and UFPB 099 but a lot of abnormal embryos was recorded. Zygotic embryos at different developmental stages can be found in the same fruit characterizing the asynchronous development. Lower rates of germination and development of seedlings were observed in earlier fruit, being observed also influences the genotype. The interaction between the periods, genotypes and media influenced the morphological characterization of the plants in the greenhouse. On average a reduction of 30% was observed in the breeding cycle in the three genotypes. Further studies should be conducted to increase the conversion of normal androgenic embryos and in the case of zygotic embryos, increase germination rates in periods of 20 and 25 DAA and reduce losses during acclimatization and transplantation. Still, a considerable reduction in cycle improvement was achieved as well as the identification of genotypes responsive to anther culture. Thus, it will be a valuable tool for ornamental breeding program.

Keywords: *Capsicum annuum*, Tissue culture, Androgenesis, Zygotic embryogenesis, Ornamental breeding

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I - Indução <i>in vitro</i> de embriões androgênicos em cultura de anteras de pimenteiras ornamentais (<i>Capsicum annuum</i> L.)	7
RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Local do experimento	9
2.2. Material Vegetal	9
2.3. Cultura de anteras	10
3. RESULTADOS	13
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II - Germinação e desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões imaturos de pimenteiras ornamentais: uma alternativa para acelerar o programa de melhoramento	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Local do experimento	29
2.2. Material Vegetal	29
2.3. Obtenção e cultura dos embriões <i>in vitro</i>	30
2.4. Análise estatística	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Caracterização dos frutos imaturos e determinação do estágio de desenvolvimento do embrião	31
3.2. Germinação e desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões imaturos.....	35
4. CONCLUSÃO	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO III - Desenvolvimento de Plantas de Pimenteiras Ornamentais Derivadas de Embriões Zigóticos Imaturos Cultivados <i>in vitro</i>: Uma Alternativa para Reduzir o Ciclo de Melhoramento	45

RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Local do experimento	47
2.2. Material Vegetal	47
2.3. Obtenção e cultura dos embriões zigóticos imaturos <i>in vitro</i> (EZI)	48
2.4. Aclimação e caracterização das plantas	49
2.5. Determinação do ciclo de melhoramento	49
2.6. Análise estatística	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1. Germinação e perdas na aclimação no sistema EZI.....	50
3.2. Caracterização morfológica das plantas.....	54
3.3. Determinação do ciclo de melhoramento nos sistemas EZI e SCC.....	63
4. CONCLUSÃO	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	1

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os segmentos produtivos agroindustriais, a floricultura tem se destacado, de forma crescente, nos cenários nacional e internacional, mostrando-se como um dos mais dinâmicos e promissores (Lírio et al., 2015). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura, em 2014, o mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, obteve o faturamento anual de US\$ 5,7 bilhões, com perspectiva de crescimento de 8% no ano de 2015 (Ibraflor, 2015). Esta atividade é desenvolvida, na maioria das vezes, por pequenos e microempresários que empregam quantidade expressiva de trabalhadores, contribuindo para o desenvolvimento de pequenas áreas de produção, associada à geração de empregos diretos e indiretos, minimização da evasão no setor agrário e melhoria da qualidade de vida do trabalhador rural (Lírio et al., 2015).

O setor de floricultura é muito diversificado, engloba a produção de plantas de corte (flores e folhagens), plantas ornamentais em vaso, plantas para paisagismo e jardinagem, além da produção de sementes e bulbos (Landgraf e Paiva, 2009). Dentre as plantas ornamentais cultivadas em vaso, as pimenteiras (*Capsicum* spp.) têm se destacado pela crescente e contínua aceitação pelo mercado consumidor (Junqueira e Peetz, 2011; Rêgo et al., 2011).

O gênero *Capsicum*, pertence à família Solanaceae e compreende cinco espécies domesticadas de pimentas que são comercializadas em todo o mundo: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens* R. & P. (Bosland, 1994). As pimentas deste gênero apresentam ampla diversidade genética e grande versatilidade de uso além da alimentação (Neitzke et al., 2016). Fazem parte da formulação de produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria bélica, devido principalmente ao valor agregado ao fruto que contém alto teor de capsaicina, matéria seca, vitaminas A, C e do complexo B, minerais, óleos essenciais, carotenoides, entre outros. Além disso, são empregadas como plantas ornamentais devido às características estéticas que apresentam (Bosland, 1993; Irikova et al., 2011; Rêgo et al., 2012a; Rêgo et al., 2015; Neitzke et al., 2016).

As características estéticas são principalmente a variação na cor e forma dos frutos e folhas, que despertou o interesse das pimenteiras como planta ornamental de vaso e jardim. Segundo Stummel e Bosland (2006), um pequeno grupo de pimenteiras, porém importante, pode ser classificado como plantas ornamentais, principalmente as

pimenteiras da espécie *Capsicum annuum*, que apresentam grande diversidade para estes atributos. O mérito da pimenteira ornamental no vaso inclui também a fácil propagação por semente, harmonia com o vaso, tempo de cultivo relativamente curto e tolerância ao calor e a seca (Stummel e Bosland, 2006; Rêgo et al., 2011), aspectos que contribuem para melhor rentabilidade do agronegócio.

Ainda assim, há apenas algumas opções de cultivares disponíveis para uso ornamental (Finger et al., 2015). Em geral, as sementes de variedades de pimenteiras ornamentais disponíveis no mercado são híbridos ou cultivares incluindo 'Gion Vermelho', 'Pirâmide', 'Espaguetinho Ornamental' e 'Grisu F1' (Fabri, 2008). Até o momento, os esforços para melhoramento do gênero, para o uso ornamental, foram limitados (Rêgo et al., 2015). O grande desafio dos melhoristas de plantas ornamentais é desenvolver novas cultivares que atendam às necessidades do mercado da floricultura, sempre em busca de novidades (Neitzke et al., 2016).

O programa de melhoramento de pimenteiras ornamentais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), há duas décadas, vêm avaliando e selecionando linhagens, assim como, promovendo a hibridação entre as linhas selecionadas e distribuindo para pequenos agricultores (Rêgo et al., 2015). Hoje em dia, conta com dois novos cultivares a “Elizas Rainbow” e a cultivar “Ouro Negro”. Rêgo et al., 2012b; 2015) demonstraram que a produção de novas variedades de pimenteiras ornamentais permitiu o incremento na renda de agricultoras familiares do Estado da Paraíba, propiciando a geração de novos empregos e a fixação dessas agricultoras rurais e de suas famílias, no campo.

Assim, o melhoramento de pimenteiras ornamentais tem sido realizado principalmente a partir de ciclos de seleção massal em raças crioulas ou a partir de hibridação e posterior condução de populações segregantes (Rêgo et al., 2011; Rêgo et al., 2015), objetivando principalmente, a obtenção de linhagens puras para a produção de híbridos (Seguí-Simarro, 2016).

A obtenção de linhagens homozigóticas, pode durar de 7 a 8 ciclos em plantas autógamas (Seguí-Simarro, 2010) a exemplo das pimenteiras. O ciclo de melhoramento das mesmas, ou seja, desde o cruzamento ou autofecundação até a colheita de sementes no fruto maduro, é considerado relativamente longo quando comparado a outras solanáceas como tomate e berinjela, geralmente superior a 200 dias (Manzur et al. 2013). Dependendo também, do genótipo e das condições climáticas locais (Bosland e Votava, 2000; Manzur et al. 2014). Além do tempo, as pimenteiras apresentam altas taxas de

fecundação cruzada, que pode variar entre 2 a 90% (Tanksley, 1984; Pickergsgill, 1997). Por este motivo, precauções durante o melhoramento a fim de prevenir a polinização cruzada não controlada, devem ser tomadas, como a cobertura de plantas individuais com organza (Rêgo et al., 2011), o que deixa o processo mais trabalhoso e oneroso.

No entanto, nos últimos anos, a biotecnologia tem sido uma ferramenta suporte aos programas de melhoramento. Duas técnicas podem ser utilizadas no processo de desenvolvimento de novas cultivares: a produção de duplo-haplóides e a cultura de embriões zigóticos *in vitro* (Thomas et al., 2003; Dunwell, 1986).

Utilizando as condições adequadas, é possível regenerar plantas haploides (n) a partir de cultura de anteras, cultura de micrósporos e de óvulos não fertilizados (Maraschin et al., 2005; Germanà, 2011; Irikova et al., 2011). Os haploides são importantes na produção de duplo-haploides (DH), extremamente úteis nos programas de melhoramento (Seguí-Simarro, 2010), dentre outros aspectos, por reduzir o tempo para obtenção de linhagens homozigóticas para 1 a 2 anos (Taskin et al., 2011) e apresentar plantas com todos os loci em homozigose (Seguí-Simarro, 2010). Atualmente, a cultura de anteras tem sido a técnica mais empregada para a obtenção de haploides androgênicos devido a simplicidade, a gama de genótipos que pode ser aplicada e ao “fator parede”, que atua como uma barreira contra elementos tóxicos do meio (Pelletier e Ilami, 1972; Kupper et al., 2000; Pulido et al., 2005; Germanà, 2011).

A segunda técnica que pode auxiliar os programas de melhoramento é a cultura de embriões zigóticos. Tem sido útil, entre outras estratégias, para acelerar os ciclos de melhoramento e permitir a regeneração de híbridos interespecíficos (Bhojwani e Dantu, 2013).

A fase mais longa do ciclo reprodutivo de pimenteiras engloba o crescimento da planta até a maturação do fruto e conseqüentemente extração das sementes para estabelecer o novo ciclo (Manzur et al., 2013). O uso de sementes imaturas em pimenteiras não é viável, pois apresenta taxas muito baixas ou nulas de germinação (Sánchez et al. 1993; Nuez et al. 2003). A partir do isolamento e crescimento do embrião zigótico *in vitro*, em estadio muito precoce, em condições estéreis e em meio nutritivo adequado é possível obter uma planta viável em menor tempo (Bridgen, 1994).

O estabelecimento e o uso eficiente das duas técnicas envolve uma gama de fatores como: genótipo, meios de cultura, estágio de desenvolvimento do micrósporo para a primeira técnica e do embrião imaturo, para a segunda técnica, entre outros, devendo estes serem estudados para o uso eficiente no melhoramento de pimenteiras ornamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhojwani SS; Dantu PK (2013). Plant tissue culture: an introductory text. India: Springer.
- Bosland PW (1993) Breeding for quality in Capsicum. *Capsicum Eggplant Newsl* 12:25–31
- Bosland PW. (1994) Chiles: history, cultivation, and uses. p. 347-366. In: G. Charalambous (ed.), *Spices, herbs, and edible fungi*. Elsevier Publ., New York.
- Bosland PW; Votava EJ. (2000). *Peppers: Vegetable and spice Capsicums*. CABI Publishing, New York
- Bridgen MP (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29(11), 1243-1246.
- Dunwell, JM (1986) Embryogenesis from pollen in vitro. In: Zaitlin P, Day P, Hollaender A (eds) *Biotechnology in plant science*. Academic Press, Orlando, pp 49–76
- Fabri EG. (2008). Pimenta, *Revista Globo Rural*, 270, Editora Globo.
- Finger FL; Silva TPD; Segatto FB; Barbosa JG (2015). Inhibition of ethylene response by 1-methylcyclopropene in potted ornamental pepper. *Ciência Rural*, 45(6), 964-969.
- Germanà, MA (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104: 283-300.
- IBRAFLOR. (2015) Análise conjuntural das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil. 2015. Disponível em <http://www.ibaflor.com.br>. Acessado em Janeiro de 2016.
- Irikova T, Grozeva S and Rodeva V (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiol. Plant* 33: 1559-1570.
- Junqueira, AH; Peetz, MS. (2011) Balanço do comércio exterior da floricultura Brasileira. *Hortica: Boletim Técnico*, 2011, 5p.
- Kupper H; Lombi E; Zhao FJ; Mcgrath SP. (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyper accumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212:75–84.
- Landgraf P; Paiva P (2009). Agronegócio da floricultura brasileira. *Magistra*, Cruz das Almas, 21(4), 253-261.
- Lirio VS; Silva CAB; Reis, SB; de Aguiar DRD; Stringheta, ÂC (2015) Uma análise do setor de distribuição de flores e plantas ornamentais no estado do rio de janeiro. *revista de economia e agronegócio–rea*, 1(2).

- Manzur JP; Oliva-Alarcón M; Rodríguez-Burruezo A. (2014). In vitro germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 170, 203-210.
- Manzur JP; Penella C; Rodríguez-Burruezo A. (2013). Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161, 181-187.
- Maraschin SDF, De Priester W, Spaink HP and Wang M (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56: 1711-1726.
- Neitzke RS; Fischer SZ; Vasconcelos CS; Barbieri RL; Treptow RO (2016). Ornamental peppers: acceptance and preferences by consumers. *Horticultura Brasileira*, 34(1), 102-109.
- Pelletier G; Ilami M.(1972) Les facteurs de l'androgenese in vitro chez *Nicotiana tabacum*. *Z Pflanzenphysiol* 68:97–114.
- Pickersgill B (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96: 129-133.
- Pulido A; Bakos F; Castillo A; Valle´s MP; Barnabas B; Olmedilla A. (2005) Cytological and ultrastructural changes induced in anther and isolated-microspore cultures in barley: Fe deposits in isolated-microspore cultures. *J Struct Biol.*149:170–181.
- Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2011). *Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (Capsicum spp.)*. Recife: Imprima, 223p.
- Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2012a). Types, uses and fruit quality of Brazilian chili peppers. In: *Spices: Types, Uses and Health Benefits* (Kralis JF, ed.). Nova Science Publishers, 131-144.
- Rêgo ER; Rêgo MM; Finger FL (2015). Methodological basis and advances for ornamental pepper breeding program in brazil. *Acta Hortic.* 1087, 309-314
- Rêgo ER; Santos RMC; Rêgo MM; Nascimento MF; Nascimento NFF; Silva AM (2012b) *Produção de mudas e disponibilização de cultivares de pimenteiras: sustentabilidade, inclusão social e geração de trabalho e renda nas comunidades de Macacos e Furnas no brejo paraibano*. In: Miranda VCM, Sobrinho RGS & Rêgo ER (Eds.) *Sustentabilidade, Inclusão Social e Geração de Trabalho e Renda – Perspectivas de Extensão Universitária*. Areia, Universidade Federal da Paraíba. p.11-30.
- Sanchez VM; Sundstrom FJ; McClure GN; Lang NS (1993). Fruit maturity, storage and postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae*, 54(3), 191-201.
- Seguí-Simarro JM (2010). Androgenesis revisited. *Bot. Rev.* 76: 377-404.

Seguí-Simarro, JM. (2016). Androgenesis in solanaceae. In *Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 209-244.

Stommel JR; Bosland PW (2006). Ornamental pepper. In: *Flower Breeding and Genetics* (Anderson, ed.). Springer Netherlands, 561-599

Tanksley SD (1984) High Rates of cross-pollination in chile pepper, *HortScience*. 19:580-582

Taskin H; Büyükalaca S; Keles D; Ekbiç E. (2013) Induction of microspore-derived embryos by anther culture in selected pepper genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 10:17116-17121.

Thomas WTB; Forster BP; Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in breeding. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 337-349). Springer Netherlan

CAPÍTULO I

Indução *in vitro* de embriões androgênicos em cultura de anteras de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.)

Priscila Alves Barroso¹², Mailson Monteiro do Rêgo¹³, Elizanilda Ramalho do Rêgo¹³,
Joelson Germano Crispim¹⁴

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil. ²Doutoranda em Agronomia: pa.barroso@hotmail.com; ³Professor Adjunto: mailson@cca.ufpb.br, elizanilda@cca.ufpb.br; ⁴Graduando em Biologia: joelson@biologo.bio.br

RESUMO

A tecnologia duplo-haploide é uma ferramenta importante no melhoramento de plantas para reduzir o tempo e os custos necessários para produção de linhas puras. A indução de embriões androgênicos haploides, a partir da cultura de anteras, é o principal fator limitante para a aplicação desta tecnologia. Assim, o objetivo deste trabalho foi induzir embriões androgênicos a partir de anteras de diferentes genótipos de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.). Foram utilizadas anteras de 9 genitores e 5 híbridos de pimenteiras ornamentais pertencentes ao banco de germoplasma de *Capsicum* da UFPB. As anteras foram mantidas a 4 °C por 3 dias e, posteriormente, cultivadas em meio dupla camada, sem e com regulador de crescimento (M1 e M2, respectivamente) e mantidas em BOD a 9 °C por uma semana e depois a 28 °C sempre na ausência de luz. Em um segundo experimento, três genótipos foram incubados a 9 °C por uma semana, 28 °C por três semanas e posteriormente mantidas a 21 °C até a obtenção dos embriões. Foram observados embriões androgênicos nos genótipos UFPB 001, UFPB 004, UFPB 099 e nos híbridos UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB 134 x UFPB 004. O genótipo UFPB 004 foi o mais responsivo, induzindo um maior número de embriões, quando cultivado no meio M2. O genótipo UFPB 099 apresentou um maior número de embriões no meio M1, na ausência de reguladores de crescimento, e também foi o que apresentou resposta mais tardia. Uma grande quantidade de embriões anormais foi observada em todos os genótipos. Ao alterar a temperatura de incubação foi possível a diferenciação de embriões cotiledonares nos genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099. Apesar do grande número de embriões anormais, foi possível identificar genótipos responsivos para as condições testadas, necessitando de estudos posteriores para otimização das condições de cultivo.

Palavras-chave: Androgênese, Cultura de anteras, Melhoramento

1. INTRODUÇÃO

O mercado consumidor de pimenteiros (*Capsicum* spp.) tem registrado grande crescimento em função da versatilidade de aplicações e formas de uso, dentre eles, o uso como planta ornamental (Rêgo et al. 2012a; Santos et al. 2013). O comércio de plantas ornamentais em vasos está crescendo em taxas mais elevadas quando comparado ao mercado de flores de corte (Rêgo et al. 2015). Entre as plantas ornamentais em vasos, as pimenteiros encontram-se entre as mais populares para os mercados de varejo, por agregar beleza, diferentes formas e cores de frutos e folhas, arquitetura adequada e longevidade no vaso (Stommel e Bosland, 2006; Rêgo et al. 2012a). Ainda assim, há apenas algumas opções de cultivares disponíveis para uso ornamental (Finger et al. 2015), dando aporte a programas de melhoramento para este fim.

O melhoramento de pimenteiros ornamentais tem sido realizado principalmente a partir de ciclos de seleção massal ou a partir de hibridação e posterior condução de populações segregantes (Rêgo et al. 2011; Rêgo et al. 2015), objetivando principalmente, a obtenção de linhagens puras para a produção de híbridos (Seguí-Simarro, 2016). Ferramentas biotecnológicas, como a produção de duplo-haplóides (DH), apresentam potencial para auxiliar o processo de desenvolvimento de novas cultivares (Thomas et al., 2003).

Em comparação aos métodos convencionais, os DH apresentam a vantagem de reduzir o tempo e os custos para obtenção de linhagens homozigotas, por reduzir o número de gerações de autofecundação necessárias, além de obter todos os locos em homozigose (Seguí-Simarro, 2010). No caso particular das pimenteiros, além do tempo, outro grande problema para obtenção de linhagens homozigóticas pelo melhoramento convencional é a alta taxa de fecundação cruzada observada na espécie, que pode variar entre 2 a 90% (Tanksley, 1984; Pickergsgill, 1997), tornando o trabalho durante os ciclos de autofecundação mais oneroso e cuidadoso devido a necessidade de prevenir a polinização cruzada não controlada. Ainda dentro do contexto do melhoramento, as linhas DH podem ser utilizadas no mapeamento genético, na obtenção de transgênicos, entre outros (Seguí-Simarro e Nuez, 2008; Supena et al, 2008, Seguí-Simarro, 2010; Germaná, 2011).

Mesmo com todas as vantagens, a tecnologia DH está longe de ser utilizada, para a grande maioria das espécies, como rotina nos laboratórios (Salas et al. 2012). Três

fatores principais podem ser considerados chave neste processo: o genótipo, o estágio de desenvolvimento do microsporo e as condições de cultivo.

Desde que a competência androgênica está sob controle genético (Beckert 1998; Rudolf et al. 1999), algumas espécies respondem melhor do que outras, ou mesmo existe resposta diferencial entre genótipos da mesma espécie. Muitos genótipos de pimenteiras são recalcitrantes para a androgênese e regeneração de haplóides (Irikova et al. 2011a). Neste sentido, muitos trabalhos buscam identificar genótipos responsivos a androgênese (Rodeva et al. 2004, 2006; Koleva-Gudeva et al. 2007; Irikova et al. 2011b; Cheng et al. 2013; Olszewska et al. 2014; Barroso et al. 2015). Em relação ao segundo fator, estágio de desenvolvimento do microsporo, é consenso que a melhor fase é aquela em que o microsporo foi recém liberado da tétrade meiótica até, no máximo, o início do estágio binucleado (Mityko e Fari 1997; Lantos et al. 2009; Rêgo et al., 2012b). Barroso et al. (2015), tentaram estabelecer uma medida de correlação entre o tamanho do botão floral, dividido em classes, e o estágio de desenvolvimento do microsporo em pimenteiras ornamentais. Como não foi observada correlação, foi possível determinar, para os genótipos utilizados, o tamanho do botão ideal para encontrar a maior quantidade de microsporos no estágio uninucleado, utilizando como padrão para determinação da classe, pétalas e sépalas com tamanho, aproximados. Por fim, as condições de cultivo, que envolvem, a composição do meio de cultura, os reguladores de crescimento, temperatura e fotoperíodo são fatores primordiais que determinam a regeneração de embriões haplóides (Nowaczyk e Kisiala 2006; Irikova et al., 2011a)

Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi induzir embriões androgênicos a partir de anteras de diferentes genótipos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

2.2. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de nove acessos e cinco híbridos de pimenteiras ornamentais, totalizando quatorze genótipos (Tabela 1), todos pertencentes ao Banco de

Germoplasma de *Capsicum* localizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CCA/UFPB). Estes acessos e híbridos foram testados previamente para o potencial ornamental a partir de uma análise dialélica (Pessoa, 2015 – dados não publicados; Nascimento, 2015).

Tabela 1. Descrição básica de genótipos de pimenteira ornamental pertencentes ao banco de germoplasma de *Capsicum* (CCA-UFPB) utilizados no experimento (Pessoa, 2016).

Genótipo	Espécie	Cor do fruto maduro	Cor da folha
UFPB 001	<i>Capsicum annuum</i>	Amarelo	Verde
UFPB 004	<i>Capsicum annuum</i>	Vermelho escuro	Verde
UFPB 045	<i>Capsicum annuum</i>	Vermelho escuro	Jaspeada
UFPB 77.3	<i>Capsicum annuum</i>	Vermelho escuro	Jaspeada
UFPB 099	<i>Capsicum annuum</i>	Laranja	Verde
UFPB 132	<i>Capsicum annuum</i>	Vermelho escuro	Verde
UFPB134	<i>Capsicum annuum</i>	Laranja	Verde Claro
UFPB 137	<i>Capsicum annuum</i>	Laranja	Verde
UFPB 390	<i>Capsicum annuum</i>	Vermelho	Verde Claro
UFPB 001x UFPB 099	<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>	Amarelo claro	Verde escuro
UFPB 001 x UFPB 390	<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>	Vermelho escuro	Verde Claro
UFPB 004 x UFPB 390	<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>	Vermelho escuro	Verde Claro
UFPB 099 x UFPB 77.3	<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>	Vermelho escuro	Verde
UFPB 134 x UFPB 004	<i>C. annuum</i> x <i>C. annuum</i>	Vermelho escuro	Verde

As sementes foram semeadas em bandejas de isopor com 200 células utilizando substrato Plantmax®. Posteriormente, 10 plântulas de cada genótipo, com 6 folhas definitivas foram transplantadas para vasos de 900 ml também contendo o substrato comercial Plantmax® e mantidas em casa de vegetação até o período de floração em que foram coletados os botões florais para execução do experimento.

2.3.Cultura de anteras

Desinfestação

Na indução dos embriões haplóides, foram coletados botões florais com tamanho de pétalas iguais ou ligeiramente superior ao tamanho das sépalas, que contém a maioria dos micrósporos no estágio uninucleado (Kim et al. 2004; Lantos et al. 2009, Irikova et al. 2011a, Rêgo et al. 2012b; Barroso et al. 2015). No laboratório, em câmara de fluxo

laminar, os botões florais foram desinfestados em 100 mL solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) adicionando-se 3 gotas de Tween 20, permanecendo imersos nesta solução por 10 min. Posteriormente, os botões foram lavados três vezes em água destilada, deionizada e autoclavada (DDA).

Pré-tratamento

Devidamente desinfestados os botões foram acondicionados em discos de Petri devidamente esterilizados contendo um papel de filtro autoclavado e levados para o freezer com temperatura de 4°C por 3 dias.

Obtenção de embriões

Após o pré-tratamento, sob microscópio estereoscópico com aumento de 10x, as anteras foram retiradas cuidadosamente dos botões florais com o auxílio de pinças previamente autoclavadas, e posteriormente, inoculadas em placas de Petri descartáveis de 60x15mm contendo 10 ml do meio de cultura dupla camada, seguindo a metodologia de Supena et al., (2006) com modificações.

O meio foi composto de uma dupla camada, em que a fase inferior é semi-sólida e a superior líquida. Ambas as camadas foram constituídas dos componentes do meio N (Nitsch e Nitsch, 1969), com pH ajustado para 5,8 (Tabela 2). Os meios diferem quanto a presença dos reguladores de crescimento AIA (ácido indolacético) e Cinetina.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados na indução de embriões androgênicos em pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L)

	Meio 1 (M1)	Meio 2 (M2)
Camada inferior	Meio N* + 2% de maltose + 1% de carvão ativado + 0.6% Agar	Meio N + 2% de maltose + 1% de carvão ativado + 0.6% Agar
Camada superior	Meio N + 2% de maltose	Meio N + 2% de maltose + 5µM de ácido indolacético (AIA) + 2,5µM de cinetina

* Meio N (Nitsch e Nitsch, 1969)

Os meios foram esterilizados em autoclave a temperatura de 120° por 15 minutos. Os reguladores de crescimento foram filtro-esterilizados em filtros Millex (Millipore) de 0,22 µM e acrescidos ao meio após a autoclavagem.

As culturas foram colocadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de 9 °C durante 1 semana, após este período a temperatura foi alterada para 28°C até o surgimento dos embriões. Todo o período de indução ocorreu na ausência de luz.

Foi determinado o número de dias para o surgimento dos embriões e a presença de anteras deiscentes, atribuindo 0 para ausente ou 1 para presente, e após sete semanas determinou-se o número de embriões globulares, cordiformes, torpedo e cotiledonar, além do número de embriões anormais.

Realizada esta primeira etapa, os genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UPPB 099 foram novamente inoculados somente no meio M2, da mesma forma descrita anteriormente, constituindo a segunda parte do experimento. Porém, estas placas foram colocadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de 9°C durante 1 semana, após este período, a temperatura foi alterada para 28°C por 3 semanas e, por fim, para 21°C até o surgimento dos embriões, conforme alterações recomendadas por Supena e Custers, (2011). Todo o período de indução também ocorreu na ausência de luz. Após 8 semanas, foi quantificado o número total de embriões, número de embriões cotiledonares e número de embriões anormais.

2.4. Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 15 (meios x genótipos). Em cada placa foram inoculadas 10 anteras, em um total de 5 placas por genótipo, o que constituiu uma repetição. Os dados foram submetidos a análise de variância, quando detectadas diferenças significativas aplicou-se o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

A segunda parte do experimento, foi realizada em delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos e 10 repetições, cada repetição constituiu-se de uma placa contendo 10 anteras. Os dados foram submetidos a uma análise de variância e, posteriormente, as médias foram separadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS

De acordo com os dados da Tabela 3, pode-se observar diferenças significativas, pelo teste F, a 1% de probabilidade, para todas as variáveis estudadas. Com exceção de Dias para o surgimento de embriões (DSE), foi observada interação entre genótipos x meios nutritivos significativa ($p \leq 0.01$), indicando o efeito adicional devido à ação conjunta dos dois fatores. Para a variável DSE, foi observada diferença apenas entre os genótipos ($p \leq 0.01$).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para indução de embriões androgênicos em pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L).

F.V	GL	Q.M.						
		PAD	TE	DSE	NG	NC	NT	NA
Genótipo	13	1.23352 **	242.67 **	2064.99 **	68.48 **	6.55 *	0.79 **	17.42 **
Meio	1	0.35 ns	231.42 ns	404.6 ns	89.6 **	3.45 ns	2.06 **	6.01 ns
G x M	13	0.38077**	254.93 **	620.81 ns	73.96 **	7.94 *	0.81 **	17.80 **
C.V (%)		72.81	270.99	182.68	311.51	468.66	326.11	310.11

PAD: presença de anteras deiscuentes; TE: Total de embriões; DSE: dias para o surgimento de embriões; NG: número de embriões globulares; NC: número de embriões cordiformes; NT: número de embriões torpedos; NA: número de embriões anormais. *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente.

Com a inoculação no meio de dupla camada, as anteras permaneceram flutuando sobre a superfície da camada líquida, até que foi observada, após algumas semanas de cultivo, uma deiscência das anteras (Fig. 1B). Com este rompimento, os micrósporos foram liberados no meio de cultura culminando no desenvolvimento dos embriões (Fig. 1A). Entretanto, foi observado também, o desenvolvimento de alguns embriões em anteras que não se romperam, porém foi bem menos comum (Fig. 1C).

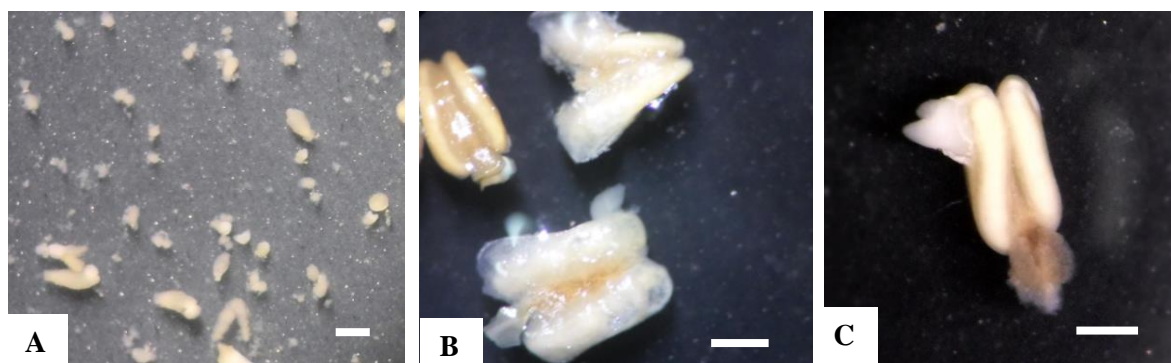


Figura 1. Indução de embriões androgênicos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.).
 A) Embriões dispersos na placa contendo meio dupla camada. B) Características de anteras deiscuentes e uma antera que não houve rompimento. C) Embrião se desenvolvendo a partir de antera não deiscente. Barras = 1mm.

Ao analisar a presença de anteras deiscuentes (Tabela 4) pode-se observar que houve diferença entre os meios estudados para os genótipos UFPB 004, UFPB 045, e o híbrido UFPB 004 x UFPB 390. Para o genótipo UFPB 045, anteras deiscuentes foram observadas apenas no meio M1. Por outro lado, nos genótipos UFPB 004 e no híbrido UFPB 004 x UFPB 390 foram observados a presença de anteras deiscuentes em ambos os meios, porém no meio M2, ocorreu em maior quantidade. Dentro do M1, apenas os híbridos UFPB 001 x UFPB 390 e UFPB 099 x UFPB 77.3 não apresentaram deiscência de anteras, não diferindo, porém, dos genótipos UFPB 004, UFPB 77.3, UFPB 132, UFPB 134, e UFPB 004 x UFPB 390. Os genótipos UFPB 045, UFPB 77.3, UFPB 134, UFPB 001 x UFPB 390 e UFPB 099 x UFPB 77.3 não apresentaram anteras deiscuentes no meio M2. Os genótipos UFPB 001, UFPB 004, UFPB 137, UFPB 390 e o híbrido UFPB 004 x UFPB 390 apresentaram 100% de deiscência de suas anteras quando inoculadas no meio M2.

Tabela 4. Médias para indução de embriões androgênicos em pimenteiros ornamentais (*C. annuum* L.).

Meios Genótipos	PAD		NTE		NEG		NEC		NET		NEA	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
001	0.80Aa	1 Aa	4.2 Aa	8.2 Ab	0.4Ba	5.2 Ab	1.8 Aa	0 Ab	0.2 Aa	0.4Ab	1.8 Ab	2.6 Ab
004	0.2Bb	1 Aa	0.2Ba	35.8Aa	0Ba	19.40Aa	0 Ba	6 Aa	0 Ba	2 Aa	0.2 Bb	8.4 Aa
099	0.6Aa	0.2 Ab	10.8Aa	0Bb	4.2 Aa	0Ab	1.4 Aa	0 Ab	0.2 Aa	0 Ac	5 Aa	0Bb
45	0.6Aa	0 Bb	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
77,3	0.2Ab	0 Ab	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
132	0.2Ab	0.40 Ab	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
134	0.2Ab	0 Ab	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
137	0.80Aa	1 Aa	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
390	0.80Aa	1 Aa	0Aa	0Ab	0 Aa	0Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
001x099	0.80Aa	1 Aa	0.6Aa	2.6Ab	0.2 Aa	0.6Ab	0Aa	1.2 Ab	0 Aa	0.6 Ab	0.40Ab	0.2 Ab
001x390	0Ab	0 Ab	0Aa	0Ab	0 Aa	0 Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0Ac	0Ab	0 Ab
004x390	0.2Bb	1 Aa	0Aa	2Ab	0 Aa	0.2Ab	0Aa	0.2 Ab	0 Ba	0.8 Ab	0Ab	0.80Ab
099x77.3	0 Ab	0 Ab	0Aa	0Ab	0 Aa	0 Ab	0Aa	0 Ab	0 Aa	0 Ac	0Ab	0Ab
134x004	0.6 Aa	0.80 Aa	0.6Aa	3.8Ab	0 Aa	1.8Ab	0.2Aa	0.4 Ab	0 Aa	0 Ac	0.40Ab	1.6 Ab

PAD: presença de anteras deiscuentes; NTE: número total de embriões; NG: número de embriões globulares; NC: número de embriões cordiformes; NT: número de embriões torpedos; NA: número de embriões anormais

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula no horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A presença de anteras deiscuentes não indica, necessariamente, a diferenciação em embriões. Como pode ser observado na Tabela 4, genótipos como UFPB 45, UFPB 77.3, UFPB 132, UFPB 134, UFPB 137e UFPB 390 que apresentaram deiscência de anteras, porém não formaram de embriões, independente do meio utilizado. Os híbridos UFPB 001 x UFPB 390 e UFPB 099 x UFPB 77.3 também não apresentaram embriões. Não houve diferenças entre os genótipos para o número total de embriões quando cultivados

no M1. No meio M2, maior número de embriões foi observado no genótipo UFPB 004, com média de 35.8 embriões/placa.

Os primeiros embriões foram observados, aos 12 dias após a inoculação, porém esse período pode se estender até aos 43 dias, a depender do genótipo utilizado (Tabela 5). Os genótipos UFPB 004, UFPB 099 e os híbridos UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB 134 x UFPB 004 foram mais precoces. O genótipo UFPB 001 foi considerado, o mais tardio, uma vez que os embriões só foram observados 43 dias após a inoculação. Para os demais genótipos, não foi observada a formação de embriões.

Tabela 5. Agrupamento de médias para a variável dias para o surgimento de embriões entre os diferentes genótipos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L).

Genótipo	Dias para o surgimento dos embriões
UFPB001	43.1a
UFPB004	29.3b
UFPB 99	17.8b
UFPB 45	0c
UFPB 77,3	0c
UFPB132	0c
UFPB 134	0c
UFPB 137	0c
UFPB 390	0c
UFPB001 x UFPB 099	25.3b
UFPB 001 x UFPB390	0c
UFPB 004 x UFPB 390	12.5b
UFPB 099 x UFPB 77.3	0c
UFPB 134 x UFPB 004	21b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Embriões globulares (Fig. 2A) foram observados em ambos os meios no genótipo UFPB 001 e no híbrido UFPB 001 x UFPB 099. Quando o genótipo UFPB 001, foi inoculado no meio M2, foram observados maior número de embriões. Comportamentos similares também foram observados nos genótipos UFPB 004 e nos híbridos UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB 134 x UFPB 004, quando cultivados nesse mesmo meio, enquanto que no híbrido UFPB 001 x UFPB 099, não houve diferenças significativas entre os meios utilizados. Por outro lado, no meio M1 surgiu maior número de embriões apenas no genótipo UFPB 099. Desta forma, para a maior parte dos genótipos testados, o M2 foi mais eficiente. Dentro do M2 o genótipo UFPB 004, produziu maior número de embriões globulares (19,4 embriões/placa).

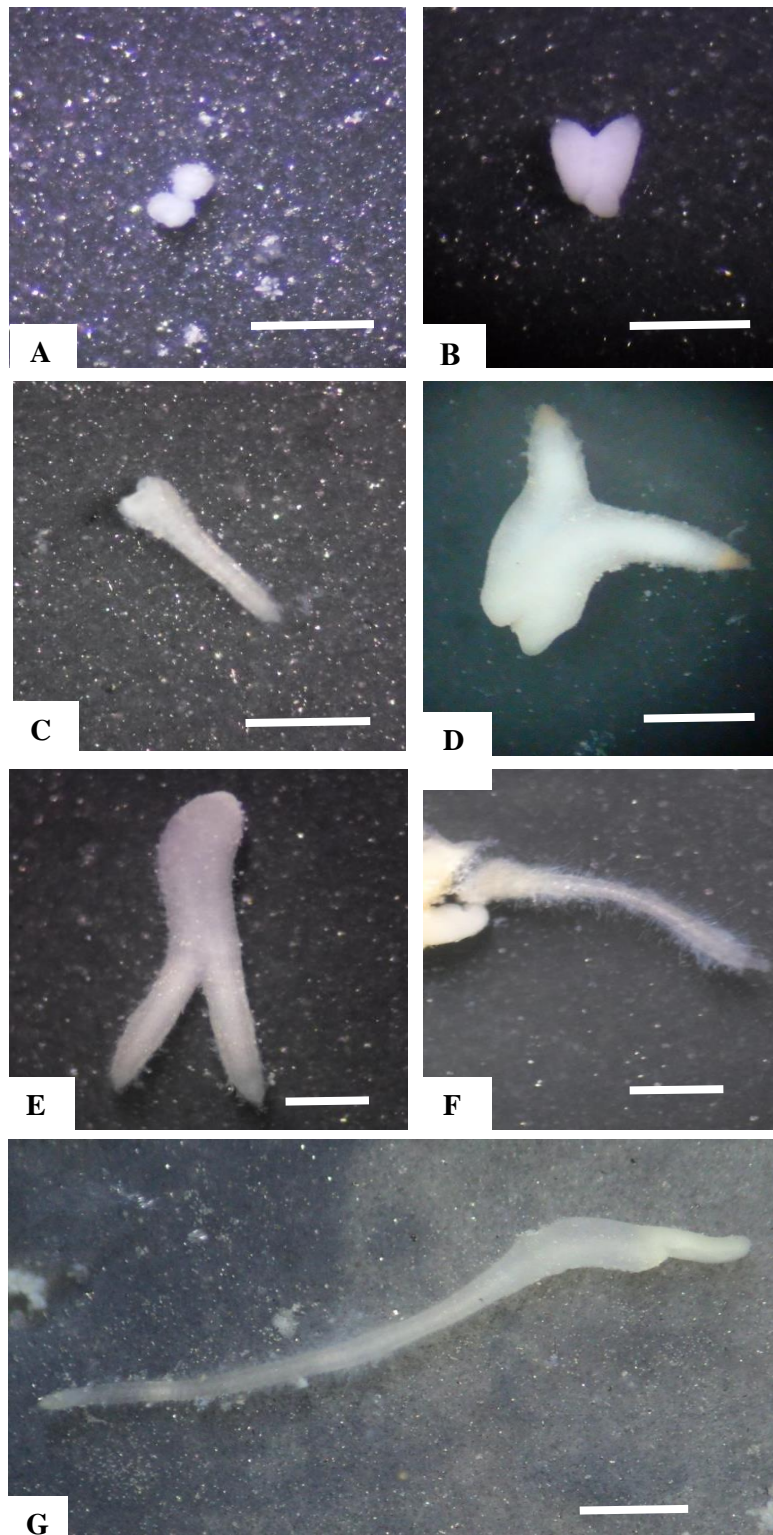


Figura 2. Embriões androgênicos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.) A) Embriões globulares; B) Embrião cordiforme; C) Embrião em estágio de torpedo; D), E), F) e G) Embriões anormais, Barras = 0.5mm

Embriões em estágio cordiforme e torpedo foram encontrados nos genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099 e nos híbridos UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB 134 x UFPB 004 (Fig. 2B e C). Dentre os genótipos citados, apenas o genótipo UFPB 004 comportou-se de modo diferente entre os meios utilizados, para o número de embriões cordiformes (NEC). Em relação ao número de embriões em estágio de torpedo (NET), além do UFPB 004 o híbrido UFPB 004 x UFPB 390, também diferiram entre os meios. Em ambos os casos, maior quantidade de embriões foi observada, quando cultivados no M2.

Dentro do M1, não houve diferença entre os genótipos para o número de embriões em estádios cordiforme e torpedo. No genótipo UFPB 004, novamente, foi observado uma maior quantidade de embriões cordiformes e torpedo, quando cultivado no M2.

No primeiro experimento, não foram encontrados nenhum embrião no estágio cotiledonar, em nenhum dos genótipos e meios utilizados. Por outro lado, foi observada grande quantidade de embriões anormais (Tabela 4). As principais anormalidades encontradas foram a ausência de um ou dos dois cotilédones, a fusão de vários embriões, impedindo o desenvolvimento normal ou apenas a presença de radícula (Fig. 2D-G).

Em todos os genótipos responsivos (UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099, UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB134 x UFPB 004) foram encontrados embriões anormais. Maior número de embriões anormais forma encontrados nos genótipos UFPB 099 e UFPB 004, quando cultivados nos meios M1 e M2, respectivamente. Uma média de 5 embriões anormais/placa foram encontrados no genótipo UFPB 099, quando cultivados no M1, os demais genótipos não diferiram estatisticamente entre si neste M1. No M2, o maior número de embriões anormais, foi observado no genótipo UFPB 004 (8 embriões/placa).

No segundo experimento, observa-se diferenças significativas a partir da análise de variância ($p \leq 0.01$) entre os genótipos testados em todas as variáveis analisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para indução de embriões androgênicos em pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L).

F.V	GL	Q.M.		
		NTE	NEC	NEA
Genótipo	2	2715.6*	13.73 *	1771.6**
C.V (%)		79	148	84

NTE: número total de embriões; NEC: número de embriões cotiledonar; NEA: número de embriões anormais. *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente.

Quando comparado ao primeiro experimento, foi observado um aumento no número de embriões totais ao utilizar a temperatura de 21 °C no período de desenvolvimento dos embriões (Tabela 7). O número total de embriões variou, em média, de 15,4 a 47,2 embriões/placa. Esta alteração na temperatura também proporcionou a diferenciação de embriões cotiledonares (Fig. 3), não observado anteriormente. O genótipo UFPB 004, apresentou maior número de embriões cotiledonares, quando comparado aos genótipos UFPB 001 e UFPB 099.

Tabela 7. Médias para indução de embriões a partir de anteras de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.), utilizando alternância de temperatura (9 - 28 - 21°C).

Genótipo	NTE	NEC	NEA
UFPB 001	15.4 b	0.7 b	8.5 b
UFPB 004	47.2 a	2.5 a	33.9 a
UFPB 099	23.8 b	0.3 b	14.3 b

NTE: número total de embriões; NEC: número de embriões cotiledonar; NEA: número de embriões anormais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O número de embriões em estágio cotiledonar (NEC) ainda foi muito pequeno, quando comparado ao número de embriões anormais (NEA), que também ocorreu em maior quantidade, quando comparado ao experimento anterior. Maior número de embriões com anormalidades, novamente, foi observado no genótipo UFPB 004.

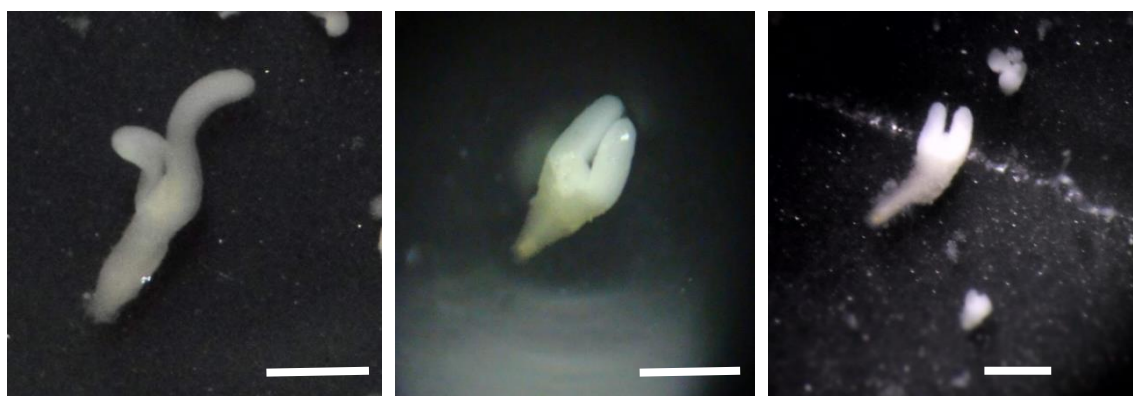


Figura 3. Embriões cotiledonares induzidos a partir de anteras dos genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099 de pimenteiras ornamentais (*C. annuum*). Barras = 0.5mm.

4. DISCUSSÃO

A interação significativa entre os fatores estudados (genótipos e os meios), confirma que a resposta androgênica depende de vários fatores e também da interação entre eles.

A primeira resposta observada neste experimento, foi a deiscência das anteras, uma característica específica do protocolo utilizado. O rompimento da antera leva a liberação dos micrósporos por um meio não-mecânico (Segui-Simarro, 2016), como foi observado neste experimento para quase totalidade dos genótipos estudados em ambos os meios. A deiscência das anteras foi descrita, justificada pelo fato de haver um acúmulo de amido no núcleo dos esporófitos, o que leva a um rompimento da parede da antera e a dispersão das células no meio de cultura líquido, de média a alta osmolaridade, composto geralmente por maltose ou manitol (Ziauddin et al. 1990; Supena et al. 2006; Germaná, 2011; Segui-Simarro, 2016).

Os primeiros embriões foram observados após algumas semanas de cultivo. O tempo para a obtenção destes foi em função apenas dos genótipos. Germaná (2011) relata que os diversos genótipos mostram comportamento diferencial, a depender do meio basal utilizado, para induzir a formação de embriões e plantas derivadas de pólen. Este comportamento diferencial pôde ser observado neste experimento para as demais características. Entretanto, em alguns casos, a otimização das condições de crescimento para um dado genótipo não é suficiente para ultrapassar as barreiras impostas por ele mesmo (Kristiansen e Andersen, 1993). Por este motivo, o genótipo da planta doadora é considerado o fator chave para resposta androgênica (Kristiansen and Andersen 1993; Mityko et al. 1995; Germaná, 2011; Irikova et al. 2011a).

Após as 7 semanas de cultivo, desconsiderando os meios, foram observadas no genótipo UFPB 001, UFPB 004, UFPB 099 e nos híbridos UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB390 e UFPB 134 x UFPB 004 embriões globulares, cordiformes e torpedo, o que demonstra o desenvolvimento assincrônico do grão de pólen (Kim et al. 2004; Rêgo et al. 2012b). É importante destacar, que os híbridos UFPB 004 x UFPB 390 e UFPB 134 x UFPB 004, envolveram dois genitores que não foram responsivos, o UFPB 390 e o UFPB 134, que quando cruzados com o genótipo responsivo UFPB 004, apresentaram embriões. Isto é um indicativo que a característica pode ser herdada pelos descendentes, podendo ser introduzida por meio de cruzamentos em outras linhagens não responsivas

(Beckert, 1998; Rudolf et al. 1999). A herança da resposta androgênica deve ser objeto de estudos posteriores em pimenteiras ornamentais.

A interação significativa entre genótipos e meios para o número de embriões globulares, cordiformes e torpedo, torna possível identificar o melhor meio para cada genótipo. Para o genótipo 004, por exemplo, maior número de embriões foram observados no meio M2, que é composto de 5 μ M de ácido indolacético (AIA) + 2,5 μ M de cinetina, enquanto que o genótipo 001, foi responsivo em meio livre de reguladores, o meio M1. A androgênese sem a presença de reguladores de crescimento já foi relatada em pimentas e pimentão (Supena et al. 2006; Kim et al. 2008; Lantos et al. 2012). No entanto, acredita-se que estes reguladores são essenciais para sustentar o crescimento e promover a diferenciação, qualidade e quantidade de estruturas derivadas de micrósporos (Lantos et al. 2012). A resposta androgênica é, portanto, dependente da predeterminação genética do genótipo utilizado e a razão entre os teores endógenos e exógenos de reguladores de crescimento (Irikova et al. 2011a).

O protocolo utilizado neste trabalho, "shed-microspore", tem sido utilizado com êxito para a androgênese em algumas cultivares de trigo, tabaco, pimenta e pimentão (Touraev et al. 1997; Dunwell 1985; Supena et al. 2006, Supena e Custers, 2011; Parra-Vega et al. 2013). Neste experimento, embriões derivados de micrósporos foram observados em 5 dos 14 genótipos testados, porém, foi observada uma grande quantidade de embriões globulares que não seguiram a ontogênese normal do embrião e não foi observada a conversão em embriões cotiledonares. Barany et al. (2005) também descreveram a formação de embriões derivados de micrósporos em pimenta, porém, o desenvolvimento embrionário para além da fase de embrião globular não pode ser promovido. Da mesma forma, Barroso et al. (2015) trabalhando com anteras de pimenteiras ornamentais, conseguiram induzir embriões sob a superfície de calos embriogênicos, porém estes não se desenvolveram.

O desenvolvimento e a germinação de embrião haplóide tem sido citado como o inconveniente principal para a produção eficiente de duplo-haplóides em pimenta (Segui-Simarro, 2016). Para a grande maioria dos métodos publicados, uma quantidade significativa de embriões derivados de micrósporos são perdidos durante a transição do embrião ainda em estágio embrionário indiferenciado em globular, ou de globular para a forma de coração (Segui-Simarro et al. 2011). Fato que foi observado para todos os genótipos responsivos utilizados neste experimento.

Um embrião é considerado normal e completo, quando é constituído por radícula, hipocótilo e cotilédones. Muitos embriões anormais foram observados nos genótipos responsivos neste experimento, em que a formação anormal dos cotilédones foi o maior deles. Problemas na formação do meristema apical e nos cotilédones, por vezes, limitam uma germinação adequada do embrião, acredita-se que a liberação de toxinas durante a cultura micrósporo pode inibir a indução e o desenvolvimento do embrião (Huang et al. 1990). O uso do carvão ativado também pode estar relacionado com a presença de embriões anormais. Substancias orgânicas e os hormônios presentes no meio podem ser adsorvidos pelo carvão e ficar indisponível para a cultura (Vagera 1990, Jonhansson et al. 1990; Dolcet Sanjuan, 1997). Supena et al. (2006) relataram que em pimenta apenas 20% dos embriões tinham aparência normal, aproximadamente 30% dos embriões não apresentaram cotilédones e, aparentemente, não tem um meristema apical, e os restantes 50% pareciam consistir de apenas uma única radícula. Kim et al. (2008), utilizando cultura de micrósporos de pimenteiros também relataram uma baixa qualidade dos embriões gerados. Desta forma, este parece ser a principal limitação na androgênese em pimenteiros.

Por este motivo, Supena e Custers (2011) tentaram otimizar o protocolo de dupla camada e conseguiram incrementos superiores a 50% no numero de embriões normais enriquecendo o meio líquido da camada superior com 2,5 μM de Zeatina e 5 μM de AIA, e reduzindo a temperatura de incubação de 28°C para 21°C, após 3 semanas de cultura. O efeito da redução da temperatura foi favorável a indução de maior número de embriões e a diferenciação de embriões cotiledonares, nos três genótipos testados neste experimento. Rokka et al. (1996) também relataram o efeito benéfico na indução de embriões normais com a redução da temperatura de incubação na cultura de anteras em batata (*Solanum tuberosum*).

Segundo Maraschin et al. (2005), a androgênese pode ser dividida em três fases: (i) aquisição do potencial embriogênico; (ii) primeiras divisões celulares e (iii) liberação da estrutura pré-embriônica da parede da exina e desenvolvimento do embrião. Sinais específicos em cada fase seriam necessários para o desenvolvimento normal do embrião: por exemplo, fatores de transcrição que desempenham função chave reguladoras na morfogênese e nas fases de maturação da embriogênese são observados após as primeiras divisões celulares (Harada,2001). Por este motivo, seria necessário um conhecimento mais profundo das exigências destes embriões, especialmente em fases para além globular, quando inicia a diferenciação de tecidos em paralelo ao alongamento e

maturação do embrião (Segui-Simarro et al. 2011). A redução da temperatura após algumas semanas de cultivo pode está relacionada com a regulação de genes específicos durante este processo, demandando estudos mais aprofundados.

Com este trabalho, foi possível identificar genótipos responsivos para as condições experimentais testadas, apesar do grande número de embriões anormais. Uma vez que a resposta é genótipo-dependente, esforços devem ser concentrados para otimizar o protocolo, buscando o desenvolvimento normal dos embriões androgênicos e, conseqüentemente, a redução do número de embriões anormais, para que desta forma, a tecnologia DH possa ser utilizada futuramente no programa de melhoramento de pimenteiros ornamentais.

5. CONCLUSÃO

A resposta androgênica é dependente da interação entre os genótipos e as condições de cultivo;

Os genótipos UFPB 001, UFPB 004, UFPB 099 e os híbridos UFPB 001 x UFPB 099, UFPB 004 x UFPB390 e UFPB 134 x UFPB 004 foram responsivos nos meios testados;

Os reguladores de crescimento não são essenciais para indução de embriões em todos os genótipos; e

A redução da temperatura no período de incubação promove a diferenciação de embriões cotiledonares nos genótipos UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099 quando cultivados no meio M2.

6. REFERÊNCIAS

- Barany, I; Gonzalez-Melendi, P; Fadón, B; Mityko, J; Risueño, MC; Testillano, PS (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell* 97:709–722
- Barroso, PA; Rêgo, MM; Rêgo, ER.; Soares, WS (2015). Embryogenesis in the anthers of different ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 13349-13363.
- Beckert, M. (1998) Genetic analysis of in vitro androgenetic response in maize. Pp 24 37. In: Y. Chupeau, M. Caboche, & Y. Henry (eds). *Androgenesis and haploid plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Cheng, Y; Ma, RL; Jiao, YS; Qiao, N; Li, TT. (2013) Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany*, 88, 306-309.

- Cruz, CD (2006). Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística. UFV, Viçosa.
- Dolcet-Sanjuan, R; Claveria, E; Huerta, A. (1997) Androgenesis in *Capsicum annuum* L – effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. J Am Soc Hort Sci 122:468–475
- Dunwell, JM (1985) Embryogenesis from pollen in vitro. In: Zaitlin P, Day P, Hollaender A (eds) Biotechnology in plant science. Academic Press, Orlando, pp 49–76
- Finger, FL; Silva, TPD; Segatto, FB; Barbosa, JG. (2015). Inhibition of ethylene response by 1-methylcyclopropene in potted ornamental pepper. Ciência Rural, 45(6), 964-969.
- Germanà, MA (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. Plant Cell Tissue Organ Cult. 104: 283-300.
- Harada JJ.(2001). Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. Journal of Plant Physiology 158, 405–409
- Huang, B; Bird, S; Kemble, R.; Simmonds, D; Keller, W; Miki, B. (1990). Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. Plant cell reports, 8(10), 594-597.
- Irikova T, Grozeva S and Rodeva V (2011a). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. Acta Physiol. Plant 33: 1559-1570.
- Irikova T, Grozeva S, Popov P, Rodeva V, et al. (2011b). In vitro response of pepper anther culture (*Capsicum annuum* L.) depending on genotype, nutrient medium and duration of cultivation. Biotechnol. Biotechnol. Eq. 25: 2604-2609.
- Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Rep 27:425–434
- Kim M, Kim J, Yoon M, Choi DI, Lee KM (2004) Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 77:63–72.
- Koleva-Gudeva L, Spasenoski M and Trajkova F (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. Sci. Hort. 111: 114-119.
- Kristiansen, K; Andersen, SB. (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. Euphytica, 67(1-2), 105-109.
- Lantos C, Juhasz AG, Vagi P, Mihaly R, Kristof Z, Pauk J (2012) Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Biotechnol Rep 6:123–132

- Maraschin SDF, De Priester W, Spaink HP and Wang M (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *J. Exp. Bot.* 56: 1711-1726.
- Mityko J and Fari M (1997). Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. *Acta Hort.* 447: 281-287.
- Mityko J, Andrasfalvy A, Csillery G, Fari M (1995) Anther culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum Annuum* L). *Plant Breed* 114:78–80
- Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85–87
- Nowaczyk P and Kisiala A (2006). Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J. Appl. Genet.* 47: 113-117
- Olszewska, D., Kisiala, A., Niklas-Nowak, A., & Nowaczyk, P. (2014). Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 118-124.
- Parra-Vega V, Renau-Morata B, Sifres A, Seguí-Simarro JM (2013) Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum*) *Plant Cell Tiss Org Cult* 112:353–360
- Pickersgill B (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96: 129-133.
- Rêgo ER, Finger FL, Rêgo MM (2012a). Types, uses and fruit quality of Brazilian chili peppers. In: *Spices: Types, Uses and Health Benefits* (Kralis JF, ed.). Nova Science Publishers, 131-144.
- Rêgo MM, Rêgo ER, Farias Filho LP (2012b) Induced Anther Callogenesis of *Capsicum annuum* L.. *Acta Horticulturae* 929:411-416.
- Rêgo, ER; Rêgo, MM; Finger, FL. (2015). Methodological Basis and Advances for Ornamental Pepper Breeding Program in Brazil. In *XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders 1087* (pp. 309-314).
- Rêgo, ER; Finger, FL; Rêgo, MM (2011). Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.). Recife: Imprima, 223p.
- Rodeva V, Irikova T and Todorova V (2004). Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 3: 34-38.
- Rodeva, V; Grozeva, S; Todorova, V. (2006). In vitro answer of Bulgarian pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetika*, 38(2), 129-136.

- Rokka, VM; Pietilä, L; Pehu, E. (1996). Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. spp. *Tuberosum*) clones. *Amer. Potato J.* 73, 1–12.
- Rudolf, K., B. Bohanec; M. Hansen. 1999. Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breeding* 118: 237–241.
- Salas, P; Rivas-Sendra, A; Prohens, J; Seguí-Simarro, JM. (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184(2), 235-250.
- Santos, RMC; Nascimento, MF; Nascimento, NFF; Borém, A; Finger, FL; Costa, DS; Rego, MM. (2013). Ethylene resistance in a F2 population of ornamental chili pepper (*Capsicum annum*). *Acta horticulturae*.
- Seguí-Simarro JM, Nuez F (2008) How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plant* 134:1–12
- Seguí-Simarro, JM; Corral-Martinez, P; Parra-Vega, V; Gonzalés-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep.* 30, 765–778.
- Seguí-Simarro, JM (2010). Androgenesis revisited. *Boanical. Review.* 76: 377-404.
- Seguí-Simarro, JM. (2016). Androgenesis in solanaceae. In *Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 209-244.
- Stommel JR; Bosland PW (2006). Ornamental pepper. In: *Flower Breeding and Genetics* (Anderson, ed.). Springer Netherlands, 561-599.
- Supena, EDJ; Winarto, B; Riksen, T; Dubas, E; Van Lammeren, A; Offringa, R.; Custers, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of experimental botany*, 59(4), 803-814.
- Supena, EDJ; Custers, JBM. (2011). Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae*, 130(4), 769-774.
- Supena, EDJ; Suharsono, S; Jacobsen, E; Custers, JBM. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant cell reports*, 25(1), 1-10.
- Tanksley SD (1984). High rates of cross-pollination in chile pepper. *HortScience* 19: 580-582.
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci* 2:297–302

- Thomas, W. T. B., Forster, B. P., & Gertsson, B. (2003). Doubled haploids in breeding. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 337-349). Springer Netherlands.
- Vagera, J. (1990). Pepper (*Capsicum* spp.): In vitro induction of haploids. In *Haploids in Crop Improvement I* (pp. 374-392). Springer Berlin Heidelberg.
- Ziauddin, A; Simion, E; Kasha, KJ. (1990). Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri. *Plant cell reports*, 9(2), 69-72.

CAPÍTULO II

Germinação e desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos de pimenteiras ornamentais: uma alternativa para acelerar o programa de melhoramento

Priscila Alves Barroso¹², Mailson Monteiro do Rêgo¹³, Elizanilda Ramalho do Rêgo¹³, Joelson Germano Crispim¹⁴

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil. ²Doutoranda em Agronomia: pa.barroso@hotmail.com; ³Professor Adjunto: mailson@cca.ufpb.br ,elizanilda@cca.ufpb.br; ⁴Graduando em Biologia: joelson@biologo.bio.br

RESUMO

O melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum* spp.) pode ser auxiliado por ferramentas biotecnológicas. O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos, representa uma alternativa viável para reduzir o tempo de obtenção de novas cultivares. Assim, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a influência do genótipo, do estágio de desenvolvimento do fruto imaturo no momento da coleta e do meio de cultura sobre a germinação e o desenvolvimento de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais. Foram coletados frutos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA), de três genótipos de pimenteira ornamental: UFPB-001, UFPB-004 e UFPB-099. Os frutos foram caracterizados e determinados os estádios de desenvolvimento do embrião. Os embriões imaturos foram inoculados em discos de Petri contendo dois meios de cultura: Murashige & Skoog com metade dos sais basais (MS ½ força) e MS força total. Foi quantificado o número de embriões germinados e caracterizado o desenvolvimento das plântulas. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Embriões em dois e até três estádios de desenvolvimento dentro do mesmo fruto, caracterizando um desenvolvimento assincrônico. Embriões globulares foram encontrados aos 20 e 25 DAA. Aos 35DAA todos os embriões já se encontram em estágio cotiledonar. Os genótipos diferiram entre si apenas aos 20 DAA, apenas o genótipo 001 apresentou embriões germinados. Aos 25, 30 e 35 DAA os embriões não diferiram estatisticamente para germinação e desenvolvimento das plântulas. Plântulas obtidas de embriões aos 20 DAA no genótipo 001 foram menos desenvolvidas em relação as obtidas nos demais períodos. Os meios de cultura não influenciaram significativamente as variáveis estudadas neste experimento. A técnica de cultivo de embriões zigóticos imaturos apresenta potencial para ser utilizado no melhoramento de pimenteiras ornamentais, porém outros fatores como outros genótipos, aclimatização e desenvolvimento das plantas no campo devem ainda ser estudados.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*, cultura de tecidos, embriogênese zigótica, melhoramento de ornamentais

1. INTRODUÇÃO

A pimenteira (*Capsicum* spp.) é uma das hortaliças mais importantes cultivadas em todo o mundo (Bosland e Votava, 2000), estima-se que sejam plantados em torno de 3,91 milhões de hectares (FAO, 2013). As pimenteiras desempenham papel importante nas indústrias alimentícias, farmacêutica e cosmética (Bosland e Votava, 2000; Yamamoto e Nawata, 2005). São caracterizadas por seus altos níveis de capsaicina, vitamina C (ácido ascórbico), provitamina A (caroteno) e cálcio, também são ricas em compostos antioxidantes e de ação anticancerígena (Rêgo et al. 2012a; Mateos et al. 2013; Shetty et al. 2013).

A variação na cor e forma dos frutos e folhas das pimenteiras despertou o interesse destas como planta ornamental de vaso e jardim (Rêgo et al. 2009; Finger et al. 2012). Segundo Stummel e Bosland (2006), um pequeno grupo de pimenteiras, porém importante, pode ser classificado como plantas ornamentais, principalmente as pimenteiras da espécie *C. annuum*, que apresentam grande diversidade para estes atributos. A procura por pimenteiras ornamentais em vasos tem apresentado um grande crescimento, em ambos os mercados: brasileiro e internacional, e mesmo assim, há apenas algumas poucas opções de cultivares disponíveis para fins ornamentais (Neitzke et al. 2010; Rêgo et al. 2015; Finger et al. 2015), justificando o surgimento de programas de melhoramento com este fim.

O desenvolvimento de linhas puras para a produção de híbridos tem sido um dos principais alvos no melhoramento de pimenteiras ornamentais (Rêgo et al. 2011; Rêgo et al. 2015). Este processo requer vários ciclos de autofecundação, demandando tempo e custos. Manzur et al. (2013), relatam que o ciclo de melhoramento de *Capsicum*, ou seja, desde o cruzamento ou autofecundação até a obtenção de novas flores para nova polinização, é relativamente longo quando comparado a culturas como tomate, berinjela e pepino. Desta forma, qualquer procedimento que venha a reduzir o tempo para obtenção das novas cultivares no melhoramento trará grandes vantagens em relação ao tempo e custos.

A cultura de embriões zigóticos imaturos é uma das principais técnicas de cultura *in vitro* aplicadas a problemas práticos no melhoramento vegetal (Dunwell, 1986). Tem sido útil para acelerar os ciclos de melhoramento, permitir a regeneração de híbridos interespecíficos, obtenção de materiais haploides, superação de dormência de sementes, na micropropagação, entre outras estratégias (Tukey, 1933; Randolph, 1945; Chen e

Adachi, 1996; Acebedo et al. 1997; Lofti et al. 2003; Leng e Yamamura, 2006; Yoon et al. 2006; Tamaki et al. 2011; Tang et al., 2011; Manzur et al. 2013).

Para um sistema eficiente de regeneração é preciso considerar, dentre outros fatores, o meio de cultura, o estágio de desenvolvimento do embrião e o genótipo. O meio de cultura utilizado deve sustentar o crescimento e desenvolvimento do embrião *in vitro*, e esta composição, está diretamente relacionada com o estágio de desenvolvimento do embrião. Embriões em estádios de desenvolvimento globular e cordiforme, por exemplo, são mais exigentes em relação ao meio de cultivo, pois quanto mais jovens os embriões, mais difícil é o cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho, danos durante a excisão e, mais complexas são suas exigências nutricionais pela dependência do endosperma (Hossain, 2003; Raghavan 2003; Yoon et al., 2006; Bhojwani e Dantu, 2013). Além destes fatores, existem diferenças entre genótipos para uma mesma espécie na cultura *in vitro* de embriões (Pierik, 1997), e estes genótipos ainda podem interagir com os meios de cultura utilizados (Hossain et al. 2003; Yoon et al. 2006).

Ainda não foram realizados estudos para o uso efetivo do cultivo de embriões zigóticos imaturos no melhoramento de pimenteiras ornamentais. Diante disso, como estudo inicial, o objetivo deste trabalho foi primeiramente caracterizar os frutos imaturos e determinar o estágio de desenvolvimento de embriões em diferentes períodos de coleta de frutos em genótipos de pimenteiras ornamentais. O segundo objetivo foi estudar o efeito do meio de cultura, genótipos e períodos de coleta de fruto após a autofecundação na germinação e no desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

2.2. Material Vegetal

Foram utilizados três acessos de pimenteiras ornamentais: UFPB-001, UFPB-004 e UFPB-099, pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Capsicum*, localizado no

Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CCA/UFPB). Estes acessos foram testados previamente para o potencial ornamental a partir de uma análise dialélica (Pessoa, 2015 – dados não publicados; Nascimento, 2015) e estão sendo testados para capacidade androgênica *in vitro* (Barroso et al. 2016, dados não publicados)

Semeou-se, em bandejas de isopor contendo 200 células preenchidas com substrato Basaplant®, 20 sementes de cada acesso. Posteriormente, uma média de 10 plântulas de cada acesso, com 6 folhas definitivas, foram transplantadas para vasos de 900 ml contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação até o período da floração.

2.3.Obtenção e cultura dos embriões *in vitro*

No momento da floração, foram escolhidos botões florais em estágio de balão para realização da autofecundação utilizando metodologia proposta por Rêgo et al., (2012b). Os botões autofecundados foram marcados e identificados com o respectivo dia em que foi realizada a autofecundação. Foram coletados frutos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA), que constituíram os tratamentos.

No laboratório três frutos de cada período foram caracterizados quanto ao peso do fruto (PF), comprimento do fruto (CF), maior diâmetro do fruto (MDF) e menor diâmetro do fruto (MEDF). Logo após, foram desinfestados em câmara de fluxo laminar utilizando 100 mL de solução de hipoclorito de sódio (2%) e água destilada na proporção de 1:1 (v/v), acrescida de 5 gotas de Tween 20. Após 10 minutos, os frutos foram enxaguados em água destilada, deionizada e autoclavada por três vezes. Os frutos foram seccionados e determinou-se o número de sementes/fruto (NS). Sob microscópio estereoscópico, 12 sementes de cada fruto foram retiradas da porção inicial, mediana e terminal do fruto, e os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento em globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

Posteriormente, os embriões foram inoculados em discos de Petri (60x15mm) contendo o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) em que, o M1: MS com 1/2 da concentração dos nutrientes e M2: MS força total. Ambos os meios foram acrescidos de 40g/L de sacarose + 8g/L de ágar + 0,01 mg/L de ácido indol-3-acético (AIA) e 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA₃) e pH ajustado para 5.7 (Manzur et al. 2013). O meio foi previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos, e os reguladores de crescimento foram filtro-esterilizados em filtros Millex (Millipore) de 0,22 µM e acrescidos ao meio após a

autoclavagem. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sob luz fluorescente com fotoperíodo de 16h de luz.

Foi determinado o percentual de embriões germinados, estes, foram considerados germinados, quando apresentaram raiz e parte aérea desenvolvidas. Quando as plântulas atingiram a parte superior da placa, foram transferidas para potes de vidro contendo meio MS (1/2) por mais 7 dias. Após este período, as plântulas foram caracterizadas quanto ao comprimento da plântula em cm (CPL), diâmetro da plântula em cm (DPL), comprimento da folha cotiledonar em cm (CFC); largura da folha cotiledonar em cm (LFC), comprimento da raiz em cm (CR) e número de raízes (NR).

2.4. Análise estatística

Para análise dos dados de caracterização dos frutos e determinação dos estádios do embrião, seguiu-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida no tempo (3x4). Em que foram 3 genótipos (UFPB-001, UFPB-004 e UFPB-099) e 4 períodos de coleta de frutos (20, 25, 30 e 35 DAA). Foi realizada análise de variância ($p\leq 0,01$) e quando detectado diferenças significativas as médias foram submetidas ao teste de Tukey ($p\leq 0,05$). Foram caracterizados três frutos e 12 sementes de cada fruto.

A análise de germinação dos embriões e desenvolvimento das plântulas também foi realizada em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida no tempo (2x3x4). Em que foram 2 meios (M1 e M2), 3 genótipos (UFPB-001, UFPB-004 e UFPB-099) e 4 períodos de coleta de frutos (20, 25, 30 e 35 DAA). Cada placa foi considerada uma repetição, totalizando 3 repetições, contendo 6 embriões cada.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização dos frutos imaturos e determinação do estágio de desenvolvimento do embrião

Foi observada interação significativa pelo teste F, a 5% de probabilidade, entre os genótipos e os dias após a autofecundação (DAA) para a variável número de embriões

em estágio cotiledonar. Os genótipos diferiram significativamente ($p \leq 0.05$) para as variáveis peso do fruto, comprimento de fruto e o menor diâmetro do fruto. Foi detectada diferença significativa ainda, entre os períodos de coleta dos frutos (20, 25, 30 e 35 DAA) para as variáveis comprimento do fruto, maior diâmetro do fruto, número de embriões globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Tabela 1).

O número de sementes não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1), assim, pode-se coletar a mesma quantidade de explantes para o cultivo de embriões imaturos em qualquer um dos genótipos utilizados, independentemente do período de coleta, visto que os embriões são extraídos das sementes.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para caracterização dos frutos aos 20, 25, 30 e 35 DAA em três genótipos de pimenteiros ornamentais (*C. annuum* L)

F.V	GL	QM								
		PF	CF	MDF	MEDF	NS	GLOB	CORD	TORP	COT
Genótipo (G)	2	32.04**	5.33*	0.49ns	0.27*	375.86ns	3.08ns	6.75ns	36.11ns	16.44ns
DAA (D)	3	10.62ns	0.72*	0.47**	0.055ns	509.66ns	82.1**	39.21*	102.76**	310.81**
G x D	6	6.32ns	0.07ns	0.18ns	0.051ns	1314.52ns	3.6ns	4.71ns	11.96ns	13.48*

PF: peso do fruto; CF: comprimento do fruto, MDF: maior diâmetro do fruto, MEDF: menor diâmetro do fruto, NS: número de sementes/fruto; GLOB: número de embriões globulares, CORD: número de embriões em estágio cordiforme, TORP: número de embriões em estágio de torpedo, COT: número de embriões em estágio cotiledonar. ns: não significativo; *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente.

Os dados morfológicos dos frutos imaturos diferiram apenas para os fatores isolados (Tabela 2). O genótipo UFPB-004 apresenta frutos mais pesados e as maiores médias para o menor diâmetro do fruto quando comparados aos genótipos UFPB-001 e UFPB-099. As maiores médias para comprimento do fruto foram observadas nos genótipos UFPB-004 e UFPB-099. Nascimento (2015), estudando a diversidade genética entre acessos de pimenteiros ornamentais, também observaram, que quando maduros, os frutos do acesso UFPB-001 são menores e menos pesados, quando comparado ao acesso UFPB-099. Possivelmente esta seja uma característica inerente do próprio genótipo, uma vez que os valores estimados de herdabilidade para estas características, citados neste trabalho, foram acima de 90%.

Os frutos com 20 DAA foram menores quando comparados aos frutos com 25, 30 e 35 DAA. Frutos mais jovens com 20 e 25 DAA apresentam também as menores médias para o maior diâmetro do fruto, 1.57 e 1.72 cm, respectivamente. Esta diferença é esperada decorrente do desenvolvimento normal do fruto, que inclui, entre outras, a fase

de incremento exponencial da taxa de crescimento (Rasthore, 1976; Chitarra e Chitarra, 2005).

Tabela 2. Médias para caracteres morfológicos de frutos imaturos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.)

Genótipo	PF	CF	MEDF
001	2.69 b	2.49 b	1.08 b
004	5.87 a	3.76 a	1.31 a
099	3.6 b	3.46 a	1.03 b
DAA	CF	MDF	
20	2.94 b	1.57 b	
25	3.07 ab	1.72 b	
30	3.57 a	2.11 a	
35	3.37 ab	1.90 ab	

PF: peso do fruto; CF: comprimento do fruto, MDF: maior diâmetro do fruto, MEDF: menor diâmetro do fruto. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisar o estágio de desenvolvimento do embrião, foi possível encontrar embriões em dois e até três estágios de desenvolvimento dentro do mesmo fruto (Fig. 1), evidenciando uma assincronia no desenvolvimento, já descrito em algumas solanáceas como o tomate (Berry and Bewley, 1992) e em pimentas e pimentões (Manzur et al. 2013).

Pode-se observar que o maior número de embriões globulares foi encontrado em frutos com 20 DAA, uma média de 6,11 embriões (Fig. 1A, 2A). Aos 20 DAA foi observado algumas “sementes vazias”, cujos os embriões ainda não haviam se desenvolvido (dados não mostrados). Acebedo et al. (1997), também descreveram a presença de “sementes vazias” em frutos imaturos de diferentes genótipos de oliveira (*Olea europaea*). Este fato, além de outros aspectos, pode limitar o uso de frutos muito jovens para a extração dos embriões. Embriões em estágio cordiforme foram presentes nos frutos por um maior período de tempo, desde os 20 até 30 DAA, porém, o maior número foi encontrado aos 20 e 25 DAA (Fig. 1B e 2B). Embriões em estágio de torpedo podem ser observados as 25, 30 e 35 DAA, não diferindo estatisticamente aos 25 e 30 DAA em que são mais frequentes (Fig. 1C e 2C).

O número de embriões cotiledonares diferiu em relação aos dias e aos genótipos. Aos 20 e 25 DAA não foram encontrados embriões cotiledonares em nenhum dos genótipos estudados (Fig. 1D). Aos 30 DAA os genótipos UFPB-001 e UFPB-099 apresentaram o maior número de embriões em estágio cotiledonar (Fig. 2D), 8 e 12

embriões, respetivamente, demonstrando o desenvolvimento mais precoce do embrião em relação ao genótipo UFPB-004, que não apresentou diferença estatística entre os frutos coletados aos 20, 25 e 30 DAA. Não foi observada diferenças entre os genótipos aos 35 DAA, que apresentaram a totalidade de embriões em estágio cotiledonar.

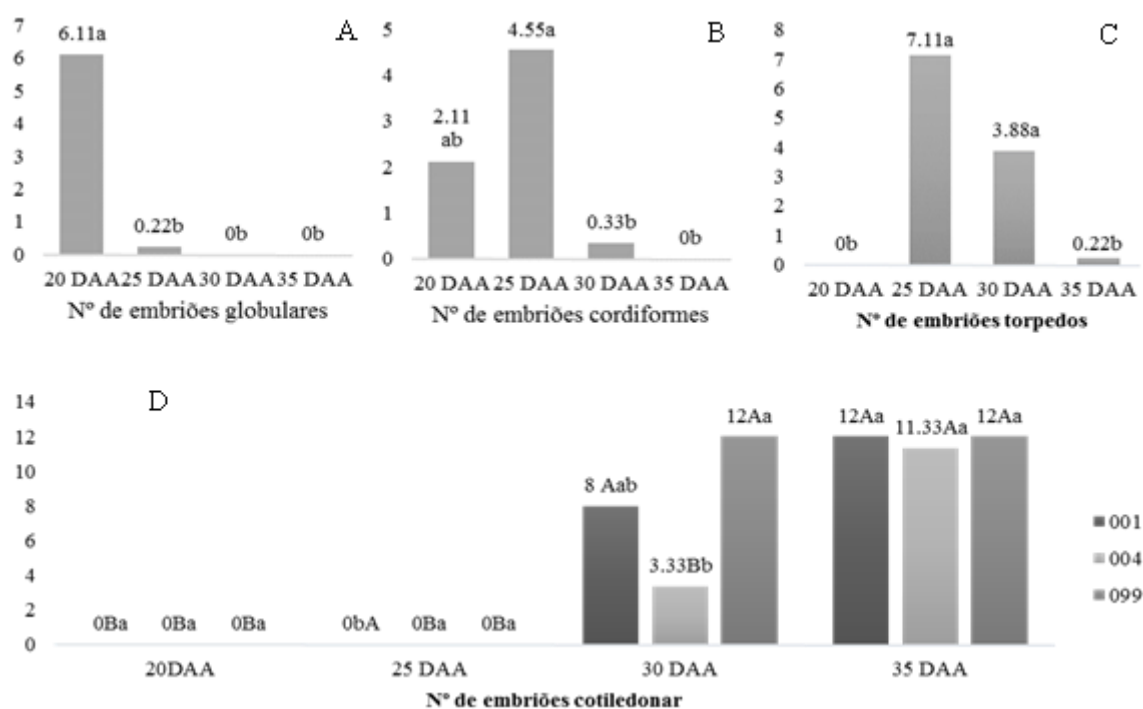


Figura 1. Número de embriões em cada estágio de desenvolvimento encontrados em frutos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA). A) embriões em estágio globular; B) embriões em estágio cordiforme; C) embriões em estágio de torpedo, e D) embriões em estágio cotiledonar. Médias seguidas pela mesma letra minúscula e maiúscula, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre os genótipos e períodos, respectivamente.

A associação das características morfológicas dos frutos autofecundados nos diferentes períodos (20, 25, 30 e 35 DAA) com os estádios dos embriões permitirá definir a melhor época de coleta de frutos característicos com embriões viáveis para o cultivo de *in vitro* de embriões imaturos, que deverá ser utilizado como padrão para o melhoramento de pimenteiras utilizando os genótipos estudados. Para Manzur et al. (2013), o estágio do embrião deve ser utilizado como o padrão no cultivo *in vitro* de embriões imaturos ao invés do período de coleta dos frutos, diferentemente do descrito por Hossain et al. (2003) que utilizaram dias após a antese. Porém, acredita-se que devido o desenvolvimento assincrônico dos embriões na semente, o isolamento de embriões todos no mesmo estágio de desenvolvimento pode tornar o processo oneroso. De qualquer forma, a associação

entre os períodos e as fases de desenvolvimento do embrião realizadas neste estudo é essencial, uma vez que não encontra-se na literatura relatos sobre o uso da técnica em pimenteiras ornamentais nas condições climáticas brasileiras.

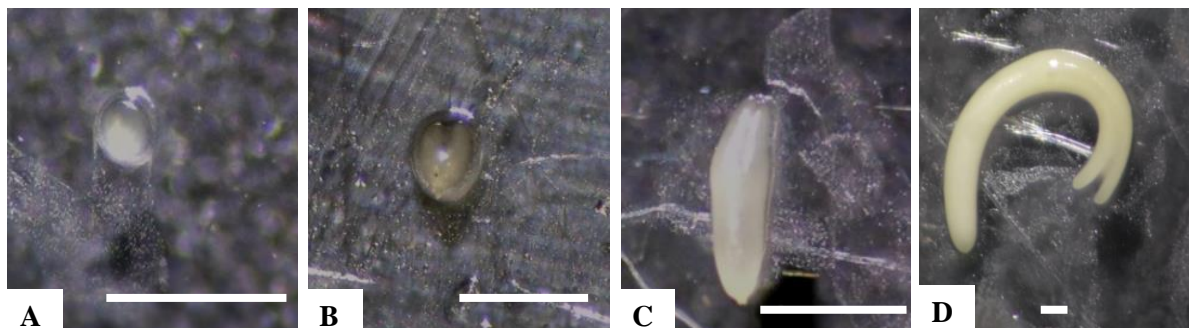


Figura 2. Embriões em cada estágio de desenvolvimento encontrados em frutos de pimenteira ornamental A) embriões em estágio globular; B) embriões em estágio cordiforme; C) embriões em estágio de torpedo; D) embriões em estágio cotiledonar – barra: 1mm.

3.2. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de embriões imaturos

Após a caracterização e determinação dos estádios de desenvolvimento dos embriões nos diferentes DAA e genótipos, foi avaliada a germinação e o desenvolvimento *in vitro* dos mesmos em dois meios de cultura. Pode-se observar na Tabela 3, que os períodos de coleta dos frutos imaturos influenciaram significativamente ($p \leq 0.05$) todas as características estudadas, diferentemente dos meios de cultura utilizados, que não apresentaram diferenças significativas. Houve diferenças significativas entre os genótipos para as variáveis comprimento da plântula, diâmetro da plântula e diâmetro da folha cotiledonar. Em relação ao efeito das interações, entre os fatores acima mencionados, apenas a interação DAA x Genótipos contribuiu significativamente para a germinação *in vitro* dos embriões, comprimento da plântula, diâmetro da plântula, comprimento e largura da folha cotiledonar e número de raízes.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e desenvolvimento de plântulas de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L).

F.V	GL	QM						
		GER	CPL	DPL	CFC	LFC	CR	NR
DAA (D)	3	23333.41**	8.08**	21.64**	6.65**	0.30**	52.03**	285.25**
Meio (M)	1	138.88ns	0.08ns	0.18ns	0.05ns	0.01ns	0.1ns	0.61ns
Genótipos (G)	2	304.31ns	0.61*	1.08*	0.17ns	0.02*	6.9ns	15.75ns
D x M	3	107.51ns	0.32ns	0.38ns	0.03ns	0.1ns	2.40ns	8.08ns
D x G	6	870.13*	1.17**	1.06 *	0.33**	0.05**	2,75ns	36.78**
M x G	2	936.87ns	0.60ns	0.52ns	0.40ns	0.2ns	7.89ns	17.62ns
D x M x G	6	103.54ns	0.14ns	0.2 ns	0.16ns	0.1*	1.74ns	4.35ns
CV (%)		28.5	27.22	22.33	24.59	22.27	39.41	33.55

GER: germinação, CPL: comprimento da plântula, DPL: diâmetro da plântula, CFC: comprimento da folha cotiledonar, LFC: largura da folha cotiledonar, CR: comprimento da raiz e NR: número de raízes. ns: não significativo; *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente.

Para a variável porcentagem de germinação, observa-se que os genótipos diferiram entre si apenas aos 20 DAA. Neste período, não foram observados embriões germinados para os acessos UFPB-004 e UFPB-099, enquanto o acesso UFPB-001 apresentou, em média, 30,53% dos embriões germinados (Tabela 4). Aos 20 DAA foram encontrados embriões em estágio globular, conforme visto na Fig. 1. Estes embriões ainda são dependentes do endosperma e dos tecidos maternos circundantes, e desta forma, são mais exigentes quando cultivados *in vitro*, exigindo meios de cultura mais complexos e com elevada pressão osmótica, suplementados com combinações de vitaminas, aminoácidos, hormônios de crescimento, e, em alguns casos, extratos naturais (Brindgen 1994; Raghavan et al. 2003; Bhojwani, e Dantu, 2013). Nos genótipos UFPB-004 e UFPB-099 foram observados alguns embriões globulares com germinação anormal (Fig. 3C), que pode ter sido influenciada, além dos fatores já mencionados, pela dificuldade de excisão destes embriões causando danos físicos.

Dentro de cada um dos genótipos, não existiu diferença nos percentuais de germinação observados aos 25, 30 e 35 DDA (Fig. 3A e 3B). Isto indica que desde os 25 DAA já se encontram embriões viáveis para germinação *in vitro*, com médias de 77 a 80% no genótipo UFPB-001, 72 a 94% do genótipo UFPB-004 e 61 a 91% no genótipo UFPB-099. Utilizando os métodos convencionais de germinação de sementes, Pereira et al. (2014), estudaram a germinação de sementes imaturas de pimenta dedo de moça (*C. baccatum*) em gerbox seguindo as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009). As sementes coletadas de frutos com 20 e 25 dias após a antese, apresentaram germinação nula, enquanto que a germinação das sementes de 35 e 45 dias não ultrapassaram os 40%. Demir e Ellis (1992), também não observaram a germinação de sementes imaturas de

frutos de pimenta (*C. annuum*) com 20, 30 e 40 dias, germinação acima de 50% só foi observada aproximadamente 60 dias após a antese. Em pimentão (*C. annuum*) sementes coletadas de frutos com 20, 30 e 40 dias após a antese, também não apresentaram germinação (Sanchez, et al. 1993; Vidigal et al. 2011). Desta forma, a germinação de embriões imaturos *in vitro* pode ser considerada uma técnica vantajosa para indução de germinação precoce quando comparado ao período necessário para maturação fisiológica das sementes de *Capsicum*, necessário para uma germinação satisfatória pelos métodos convencionais.

Estes resultados podem ser explicados, nesses períodos, predominantemente, os embriões encontram-se em estágio de torpedo e/ou cotiledonar (Fig. 1), ou seja, estádios mais avançados de desenvolvimento, sendo os ideais para o resgate *in vitro*. Manzur et al. (2013) já relataram que a eficiência do cultivo *in vitro* de embriões imaturos de pimenteira cresce gradualmente com estágio de desenvolvimento do embrião, com taxas variando de 5% (globular) a 70% (cotiledonar). Nesta fase, mais tardia, o embrião é metabolicamente capaz de sintetizar substâncias necessárias para o seu crescimento a partir de sais e açúcares disponíveis no meio de cultura, podendo germinar e crescer em um meio de cultura simples, suplementado com uma fonte de carbono (Brindgen 1994; Bhojwani, e Dantu, 2013). Neste experimento, a sacarose e o meio MS, independente da concentração dos sais, foi eficiente para germinação dos embriões.

Tabela 4. Desdobramento da interação DAA x G para as variáveis (GER) germinação, (CPL) comprimento da plântula, (DPL) diâmetro da plântula, (CFC) comprimento da folha cotiledonar, largura da folha cotiledonar (LFC) e (NR) número de raízes no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L).

DAA	GER			CPL			DPL		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099
20	30.53Ab	0Bb	0Bb	1.4Aa	0Bb	0Bb	1.25Ab	0Bb	0Bb
25	77.75Aa	72.18Aa	61.08Aa	2.0Aa	2.08Aa	1.90Aa	2.93Aa	2.45Aa	2.52Aa
30	74.96Aa	88.86Aa	83.3Aa	1.57Aa	1.71Aa	1.65Aa	2.48Aa	2.48Aa	2.68Aa
35	80.53Aa	94.43Aa	91.65Aa	1.51Aa	1.77Aa	1.71Aa	2.42Aa	2.46Aa	3.02Aa
DAA	CFC			LFC			NR		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099
20	0.62Ab	0Bb	0Bb	0.29Aa	0Bb	0Bb	2.55Aa	0Ab	0Ab
25	1.17Aab	1.23Aa	1.20Aa	0.33Aa	0.35Aa	0.34Aa	4.29Aa	3.96Aa	3.46Aa
30	1.25Aa	1.22Aa	1.66Aa	0.33Aa	0.38Aa	0.4Aa	4.45Aa	4.18Aa	4.51Aa
35	1.64Aa	1.53Aa	1.54Aa	0.34Aa	0.32Aa	0.35Aa	4.65Aa	4.54Aa	3.92Aa

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula no horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para as características relacionadas ao desenvolvimento das plântulas (Fig. 3D): comprimento e diâmetro das plântulas, comprimento e largura da folha cotiledonar e número de raízes (Tabela 4), foi observado o mesmo comportamento descrito para a variável germinação. Os genótipos diferiram entre si apenas aos 20 DAA, uma vez que, foi observada germinação apenas no genótipo UFPB-001. É importante ressaltar, que mesmo muito jovens, os embriões aos 20 DAA germinaram e conseguiram desenvolver-se em plântulas normais (Fig. 1E), porém menos desenvolvidas em relação ao diâmetro da plântula (1.25cm) e comprimento da folha cotiledonar (0.62cm), quando comparada as plântulas obtidas de embriões aos 25, 30 e 35 DAA no genótipo UFPB-001 (Fig. 1F), que apresentaram médias variando de 2,42 -2,43cm e 1,17 -1,64cm, para diâmetro da plântula e comprimento da folha cotiledonar, respectivamente. Para os demais genótipos, não foram observadas diferenças estatísticas entre as plântulas obtidas aos 25, 30 e 35 DAA. A obtenção de plântulas bem desenvolvidas *in vitro* é de extrema importância para o sucesso na aclimação. Alguns autores relatam que esta fase é dependente da quantidade de material armazenado nos seus tecidos, ou seja, a biomassa (raiz e parte aérea), que serve como fonte de carbono a ser consumido no início do processo de aclimação, até a emergência de novas folhas (Grout e Millan, 1985; Desjardins et al. 1987). Desta forma, plântulas viáveis podem ser obtidas desde os 25 DAA em todos os genótipos estudados.

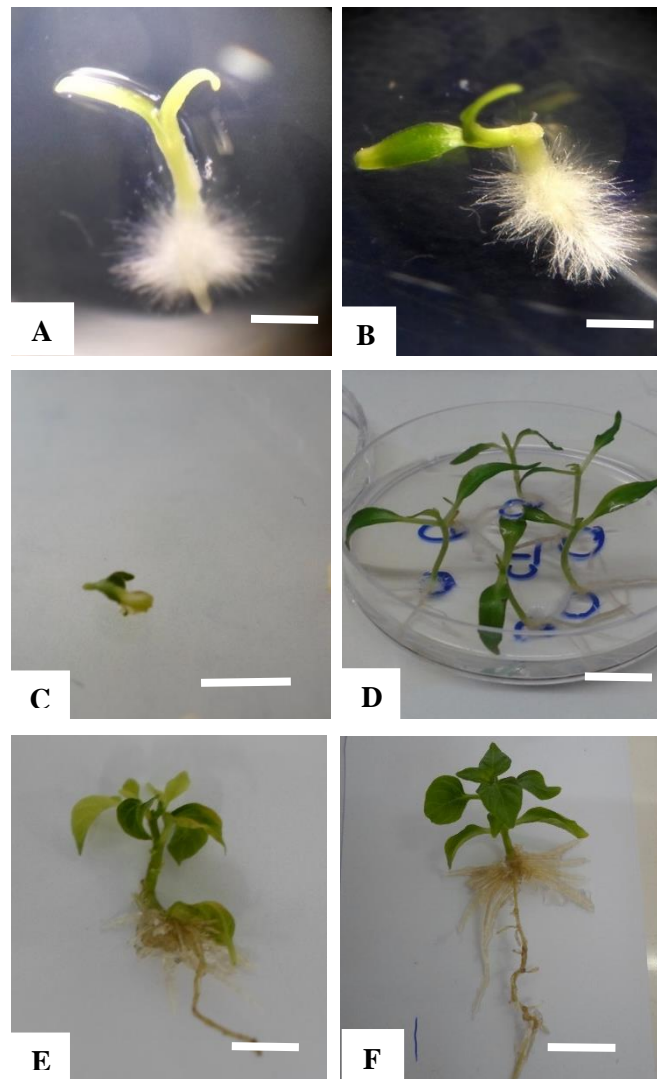


Figura 3. Germinação e desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.). A) e B) Embriões germinados; - barra: 1mm. C) Embrião de 20 DAA não desenvolvido, genótipo UFPB-099; - barra: 1mm D) Plântulas desenvolvidas; - barra: 1 cm. E) Plântula obtida de embriões com 20 DAA, genótipo UFPB-001 - barra:1cm; e F) Plântula obtidas de embriões com 30 DAA, genótipo UFPB-001. Barra:1cm.

A variável comprimento da raiz não foi influenciada por nenhuma das interações, então considerou-se o efeito significativo do fator isolado DAA. Como pode ser observado na tabela 5, os comprimentos das raízes variam de 0,84 – 4,37cm. A menor média foi observada aos 20DAA (0,84cm). Não foi observada diferenças significativas entre os períodos de 25, 30 e 35 DAA. Barroso et al. (2015), estudando a germinação em família de pimenteiras ornamentais, obtiveram plântulas oriundas de sementes, com comprimento de raiz variando de 0,87–3,28cm. Estes resultados são semelhantes aos

encontrados neste experimento com plântulas derivadas de embriões zigóticos imaturos, demonstrando a eficiência da técnica. A formação de um sistema radicular funcional e bem desenvolvido *in vitro* é importante para sobrevivência das plântulas durante as fases de aclimatização (Hazarika, 2003).

Tabela 5. Influência do período de coleta de frutos (20, 25, 30 e 35 DAA) no comprimento das raízes de plântulas oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.)

DAA	Comprimento da Raiz
20	0.84 b
25	3.9a
30	4.38a
35	4.37a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora não tenha sido observada diferenças estatísticas entre a germinação e desenvolvimento das plântulas obtidas com embriões aos 25, 30 e 35 DAA, os frutos aos 25 DAA apresentaram ainda uma quantidade significativa de embriões em estágio globular levando a uma germinação reduzida (Fig. 1B), além disso, o isolamento destes embriões é mais difícil pelo seu tamanho, sendo mais suscetíveis a fermentos e desidratação, exigindo do técnico maior habilidade, tempo e atenção (Rangan 1984 e Bridgen 1994). Desta forma, recomenda-se a coleta de frutos aos 30 DAA ou 35 DAA, nos quais encontram-se, predominantemente, embriões em estágio de torpedo e cotiledonar, garantindo altas taxas de germinação e desenvolvimento das plântulas. Estudos mais aprofundados devem ser realizados com embriões mais jovens em pimenteiras ornamentais.

Este estudo é, portanto, o ponto de partida para implementação da técnica de cultivo de embriões zigóticos imaturos no melhoramento de pimenteiras ornamentais. O uso eficiente desta técnica depende ainda do processo de aclimação, do desenvolvimento das plântulas no vaso e da expansão do estudo para outros genótipos de interesse no programa de melhoramento.

4. CONCLUSÃO

Os genótipos e os dias de coleta, isoladamente e em conjunto são fatores determinantes na regeneração dos embriões imaturos;

O meio de cultura não influencia significativamente a germinação e o desenvolvimento dos embriões *in vitro*;

Não há diferença na germinação de embriões e no desenvolvimento das plântulas aos 25, 30 e 35 Dias Após a Autofecundação em todos os genótipos estudados

Frutos com 30 ou 35 Dias Após a Autofecundação devem ser utilizados para o cultivo de embriões imaturos em pimenteiras ornamentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acebedo MM; Lavee S; Linán J; Troncoso A (1997). In vitro germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Sci. Hortic.* 69, 207–215.
- Barroso PA, dos S. Pessoa, A.M., Medeiros, G.D.A., da Silva Neto, J.J., Rêgo, E.R. and Rêgo, M.M. (2015). Genetic control of seed germination and physiological quality in ornamental pepper. *Acta Horticulturae* 1087, 409-413
- Berry T; Bewley JD (1992). A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiol.* 100, 951–957
- Bhojwani, SS; Dantu PK (2013). *Plant tissue culture: an introductory text*. India: Springer.318p
- Borges LC, Ferreira DF (2003). Poder e taxas de erro tipo I dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newman-Keuls sob distribuições normal e não normais dos resíduos. *Revista de matemática e estatística*, 21(1), 67-83.
- Bosland PW; Votava EJ (2000). *Peppers: Vegetable and spice Capsicums*. CABI Publishing, New York
- Brasil (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: SDA/ACS, 2009. 399 p
- Bridgen MP (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29(11), 1243-1246.
- Chen LZ; Adachi T (1996). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo rescue and in vitro propagation. *Plant Breed.* 115, 251–256
- Chitarra MIF; Chitarra AB (2005) Pós-colheita de Frutos e Hortaliças. *Fisiologia e Manuseio*. 2 ed. Lavras: FAEPE.
- Cruz CD. (2006). *Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística*. UFV, Viçosa.
- Demir I; Ellis RH (1992). Development of pepper (*Capsicum annum*) seed quality. *Annals of Applied Biology*, 121(2), 385-399.

- Desjardins Y; Gosselin A; Yelle S. (1987). Acclimatization of ex vitro strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, 112:846-851.
- Dunwell JM. (1986) Pollen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding, p. 375–404. In: L.A. Withers and P.G. Alderson (eds.). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworths, London.
- Fao (2013). *Food and Agriculture Statistics*. (2013). (Acesso em janeiro 2016). Disponível: <http://www.faostat.fao.org>
- Finger FL, Rêgo ER, Segatto FB, Nascimento NFF & Rêgo MM (2012) Produção e potencial de mercado para pimenta ornamental. *Informe Agropecuário*, 33:14-20.
- Finger FL; Silva TPD; Segatto FB; Barbosa JG (2015). Inhibition of ethylene response by 1-methylcyclopropene in potted ornamental pepper. *Ciência Rural*, 45(6), 964-969.
- Grout MC; Millan S. (1985) Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany*, London, 55:129-131.
- Hossain MA; Minami M; Nemoto K (2003). Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. *Jpn. J. Trop. Agric.* 47, 9–16.
- Leng P; Yamamura H (2006). Fruit set and embryo rescue in crosses using parthenocarpic ‘Mopanshi’ persimmon. *Sci. Hortic.* 107, 332–336.
- Lotfi M; Alan AR; Henning MJ; Jahn MM; Earle ED (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 21, 1121–1128.
- Manzur JP; Penella C; Rodríguez-Burruezo A. (2013). Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161, 181-187.
- Mateos RM; Jiménez A; Román P; Romojaro F; Bacarizo S; Leterrier M; Gómez M; Sevilla F; Del Río LA; Corpas FJ; Palma JM (2013). Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.) In: involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9556-9580.
- Murashige T; Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Neitzke RS; Barbieri RL; Rodrigues WF; Corrêa IV; Carvalho FIF (2010). Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. *Hort. Bras.* 28:47-53.

- Pierik RLM (1997) In vitro culture of higher plants. Kluwer Aca. Pub. (London). pp.348.
- Raghavan V(1966). Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41, 1–58.
- Randolph LF(1945). Embryo culture of Iris seed. Bull. Am. Iris Soc. 97, 33–45.
- Rangan TS (1984). Culture of ovules, p. 227–231. In: I.K. Vasil (ed.). Cell culture and somatic cell genetics of plants. vol. 1. Laboratory procedures and their applications. Academic, New York.
- Rathore DS (1976) Effect of season in the growth and chemical composition of guava fruits. Journal Horticultural Science, 51:41-47
- Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2011). Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.). Recife: Imprima, 223p.
- Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2012a). Types, uses and fruit quality of Brazilian chili peppers. In: Spices: Types, Uses and Health Benefits (Kralis JF, ed.). Nova Science Publishers, 131-144.
- Rêgo ER; Nascimento MF; Nascimento NFF; Santos RMC; Fortunato FLG; Rêgo MM (2012b) Testing methods for producing self-pollinated fruits in ornamental peppers. Horticultura Brasileira 30: 669-672.
- Rêgo ER; Rêgo MM. Finger FL (2015). Methodological basis and advances for ornamental pepper breeding program in brazil. Acta Horticulturae. 1087, 309-314
- Rêgo ER; Rêgo MM; Silva DF; Santos RMC; Sapucay MJLC; Silva DR; Silva Júnior SJ (2009) Selection for leaf and plant size and longevity of ornamental peppers (*Capsicum* spp.) grown under greenhouse condition. Acta Horticulturae, 829:371-374.
- Sanchez VM; Sundstrom FJ; McClure GN; Lang NS (1993). Fruit maturity, storage and postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae*, 54(3), 191-201.
- Shetty AA; Magadum S; Managanvi K. (2013). Vegetables as sources of antioxidants. Journal of Food & Nutritional Disorders, 2(1), 1-5.
- Stommel JR; Bosland PW (2006). Ornamental pepper. In: Flower Breeding and Genetics (Anderson, ed.). Springer Netherlands, 561-599
- Tamaki M; Urasaki N; Nakamura I; Motomura K; Adaniya S (2011). Shortening the breeding cycle of papaya (*Carica papaya* L.) by culturing embryos treated with ethrel. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 106, 225–233.
- Tang F; Wang H; Chen S; Chen F; Liu Z; Fang W (2011). Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. Sci. Hortic. 132, 1–6.
- Tukey HB (1933). Artificial culture of sweet cherry embryos. J. Hered. 24, 7–12.

- Vidigal DDS; Dias DCFDS; Dias LADS; Finger FL (2011). Changes in seed quality during fruit maturation of sweet pepper. *Scientia Agricola*, 68(5), 535-539.
- Yamamoto S; Nawata E (2005). *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. *Economic Botany*, v. 59, n. 1, p. 18-28.
- Yoon JB; Yang DC; Do JW; Park HG (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breed. Sci.* 56, 31–38.
- Yoon JB; Yang DC; Do JW; Park HG (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breed. Sci.* 56, 31–38.

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de Plantas de Pimenteiras Ornamentais Derivadas de Embriões Zigóticos Imaturos Cultivados *in vitro*: Uma Alternativa para Reduzir o Ciclo de Melhoramento

Priscila Alves Barroso¹², Mailson Monteiro do Rêgo¹³, Elizanilda Ramalho do Rêgo¹³, Joelson Germano Crispim¹⁴; Maria do Perpétuo Socorro Damasceno Costa¹²

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil. ²Doutoranda em Agronomia: pa.barroso@hotmail.com; agro30costa@gmail.com ³Professor Adjunto: mailson@cca.ufpb.br, elizanilda@cca.ufpb.br; ⁴Graduando em Biologia: joelson@biologo.bio.br

RESUMO

O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos, representa uma alternativa viável para reduzir o tempo de obtenção de novas cultivares e pode ser utilizado no melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.). O objetivo do presente trabalho foi comparar os sistemas de cultivo de embriões zigóticos imaturos (EZI) e o cultivo convencional (SCC), como uma alternativa para redução do ciclo de melhoramento de pimenteiras ornamentais. No sistema de cultivo EZI foram coletados frutos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA), de três genótipos de pimenteiras ornamentais: UFPB-001, UFPB-004 e UFPB-099. Os embriões zigóticos imaturos foram inoculados em discos de Petri contendo dois meios de cultura: Murashige & Skoog com metade dos sais basais (MS ½ força) e MS força total. Neste sistema foram avaliados a porcentagem de embriões germinados e a porcentagem de plântulas perdidas. As plantas regeneradas foram caracterizadas utilizando os descritores do IPGRI. Foram comparados os ciclos de melhoramento das plantas obtidas *in vitro* e método convencional (SCC). Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Os genótipos diferiram entre si apenas aos 20 DAA, apenas o genótipo 001 apresentou embriões germinados. Aos 25, 30 e 35 DAA os embriões não diferiram estatisticamente para germinação. Todas as plantas regeneradas aos 20 DAA no genótipo UFPB 001 foram perdidas durante aclimatização e transplântio. As menores perdas foram observadas aos 30 DAA e 35 DAA. As características morfológicas foram influenciadas por todas as fontes de variação, com exceção da espessura da parede do fruto. Plantas menos desenvolvidas foram observadas aos 25 DAA. Dentro dos meios M1 e M2, os genótipos não diferiram apenas para as variáveis altura da primeira bifurcação, número de frutos por planta, peso do fruto e número de sementes. Foi observada uma redução de em média 30% no ciclo de melhoramento, nos três genótipos. As fases I e II correspondem aquelas em que ocorre a maior redução de tempo. Estudos mais aprofundados devem ser realizados buscando aumentar as taxas de germinação nos períodos de 20 e 25 DAA, e reduzir as perdas durante a aclimatização e transplântio, ainda assim, redução considerável no ciclo de melhoramento foram conseguidos. Sendo assim, será uma ferramenta valiosa para o programa de melhoramento de ornamentais.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*, cultura de tecidos, embriogênese zigótica, sistema convencional, melhoramento de ornamentais

1. INTRODUÇÃO

As pimenteiras do gênero *Capsicum* spp. são amplamente cultivadas em regiões temperadas e tropicais de todo o mundo, devido principalmente ao valor agregado ao fruto, caracterizando-se pelo alto teor de capsaicina, matéria seca, vitaminas A, C e do complexo B, minerais, óleos essenciais, carotenóides, entre outros. Podem ser utilizadas de várias formas: na culinária, na indústria farmacêutica, cosmética e o uso ornamental (Stommel e Bosland 2006; Rêgo et al., 2012; Mateos et al. 2013).

As espécies de *Capsicum* apresentam flores perfeitas e reproduzem-se preferencialmente por autofecundação espontânea (Bosland, 1996). Um programa de melhoramento de pimenteiras ornamentais envolve vários ciclos de reprodução, seja a partir de seleção massal em raças crioulas ou no melhoramento através da hibridação e condução de populações segregantes (Rêgo et al. 2011; Rêgo et al. 2015).

Considera-se que o ciclo de melhoramento de *Capsicum* pelo sistema convencional (SCC), ou seja, desde o cruzamento ou autofecundação até a colheita de sementes no fruto maduro, é relativamente longo, quando comparado a outras solanáceas como tomate e berinjela (Manzur et al. 2013). Vale ressaltar, que este período é dependente do genótipo e das condições climáticas locais (Bosland e Votava, 2000; Manzur et al. 2014).

A fase mais longa do ciclo reprodutivo de pimenteiras engloba o crescimento da planta até e o desenvolvimento do fruto. Para o melhoramento, é necessário que os frutos estejam completamente maduros ao final do ciclo, uma vez que neles encontram-se as sementes para a próxima geração, garantindo assim a viabilidade das sementes (Manzur et al. 2014). O uso de sementes imaturas em pimenteiras não é viável, já foi demonstrado que sementes de frutos verdes mostram taxas muito baixas ou nulas de germinação (Sánchez et al, 1993; Nuez et al, 2003). Desta forma, qualquer técnica que venha a reduzir o ciclo de melhoramento trará duas vantagens: acelerar o programa de melhoramento para o lançamento de cultivares e a redução dos custos (Manzur et al. 2014). O cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos (EZI), pode auxiliar na redução dos ciclos de melhoramento. A técnica de cultura de embriões envolve o isolamento e crescimento do embrião zigótico, em estágio imaturo ou mesmo maduro, em condições estéreis e em meio nutritivo adequado com o objetivo de se obter uma planta viável (Bridgen, 1994). Utilizando esta técnica, já foi descrita a redução do ciclo de melhoramento em girassol (Jambhulkar, 1995; Torresàn et al., 1996; Dagustu et al. 2012), trigo (Sharma e Gill,

1982), orquídea (Yeung et al. 1981), oliveira (Acebedo et al. 1997); azaleia (Michishita et al. 2001); tomate (Gebololu et al. 2011) pimenta e pimentão (Manzur et al. 2014). Além da redução do ciclo de melhoramento, a cultura de embriões tem sido utilizada para recuperar híbridos interespecíficos, superação de dormência de sementes, recuperação de materiais haploides e na micropropagação (Tukey, 1933; Randolph, 1945; Chen e Adachi, 1996; Acebedo et al. 1997; Lofti et al. 2003; Leng e Yamamura, 2006; Yoon et al. 2006; Tamaki et al. 2011; Tang et al., 2011; Manzur et al. 2013).

O único estudo em pimentas e pimentões (*C. annuum*) foi realizado por Manzur et al. (2013; 2014). Os autores, trabalhando com cinco genótipos de pimentas e pimentões nas condições climáticas da costa mediterrânea da Espanha, conseguiram a redução do ciclo reprodutivo de 148-184 dias no método convencional para 93-133 dias, dependendo do genótipo, com a cultura de embriões. A cultura de embriões também já foi utilizada em pimenteiras para recuperar híbridos interespecíficos entre *C. annuum* e *C. frutescens* (Hossain, 2003) e entre *C. annuum* e *C. baccatum* (Yoon et al. 2006).

O uso eficiente da técnica de cultivo de embriões zigóticos no melhoramento de pimenteiras dependerá do genótipo, do estágio de desenvolvimento dos embriões, do meio de cultura utilizado e também da aclimatização e crescimento normal destas plantas no vaso. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a germinação e o desenvolvimento de plantas oriundas do cultivo de embriões zigóticos imaturos (EZI) e comparar os sistemas EZI e (SCC), como uma alternativa para redução do ciclo de melhoramento de pimenteiras ornamentais (*C. annuum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

2.2. Material Vegetal

Foram utilizados três acessos de pimenteira ornamental: UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099, pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Capsicum*, localizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (CCA/UFPB). Estes acessos foram testados previamente para o potencial ornamental a partir de uma análise dialélica (Pessoa, 2015;

Nascimento, 2015) e estão sendo testados para capacidade androgênica *in vitro* (Barroso et al. 2016).

Semeou-se, em bandejas de isopor contendo 200 células preenchidas com substrato Basaplant®, 20 sementes de cada acesso. Posteriormente, uma média de 10 plântulas de cada acesso, com 6 folhas definitivas, foram transplantadas para vasos de 900 ml contendo o mesmo substrato e, mantidas em casa de vegetação, até o período de floração.

2.3.Obtenção e cultura dos embriões zigóticos imaturos *in vitro* (EZI)

No momento da floração, foram escolhidos botões florais em estágio de balão para realização da autofecundação utilizando metodologia proposta por Rêgo et al., (2012b). Os botões autofecundados foram marcados e identificados com o respectivo dia em que foi realizada a autofecundação. Foram coletados frutos com 20, 25, 30 e 35 dias após a autofecundação (DAA), que constituíram os tratamentos.

No laboratório, os frutos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar utilizando 100 mL de solução de hipoclorito de sódio (2%), e água destilada na proporção de 1:1 (v/v), acrescida de 5 gotas de Tween 20. Após 10 minutos, os frutos foram enxaguados em água destilada, deionizada e autoclavada, por três vezes. Os frutos foram seccionados, sob microscópio estereoscópico, 12 sementes de cada fruto foram retiradas da porção inicial, mediana e terminal do fruto.

Posteriormente, os embriões foram inoculados em discos de Petri (60 x 15mm) contendo o meio MS (Murashige and Skoog, 1962) em que, o meio M1: MS com 1/2 da concentração dos nutrientes e M2: MS força total. Ambos os meios foram acrescidos de 40g/L de sacarose + 8g/L de ágar + 0,01 mg/L de ácido indol-3-acético (AIA) e 0,01 mg/L de ácido giberélico (GA₃) e pH ajustado para 5.7 (Manzur et al. 2013). O meio foi previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos, e os reguladores de crescimento foram filtro-esterilizados em filtros Millex (Millipore) de 0,22 µm e acrescidos ao meio após a autoclavagem. As placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de 24°C ± 1°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 16h de luz.

O percentual de embriões germinados foi avaliado, sendo considerados germinados, quando apresentaram raiz e parte aérea desenvolvidas. Quando as plântulas atingiram a parte superior da placa, foram transferidas para potes de vidro contendo meio MS (1/2) por mais 7 dias até o momento da aclimação.

2.4. Aclimatização e caracterização das plantas

Todas as plântulas germinadas foram aclimatizadas. As plântulas foram retiradas dos potes de vidro, lavadas com água DDA para retirar o excesso de meio de cultura e transferidas para copos plásticos contendo água DDA. Os recipientes foram cobertos com sacos plásticos fixados com um elástico de borracha, e mantidos no laboratório a $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 24hrs, a água foi retirada e os recipientes preenchidos com substrato comercial Plantmax®, e novamente recobertos com saco plástico. Após 48 horas, os sacos plásticos foram retirados, e as plântulas mantidas em laboratório. Quando as plântulas apresentaram 4 folhas definitivas, foram transferidas para vasos plásticos contendo 900 ml de substrato comercial. Os vasos foram mantidos na sombra por 3 dias e, posteriormente, transferidos para casa de vegetação. Foi avaliado o percentual de plântulas mortas durante a aclimatização e no vaso.

No momento em que o primeiro fruto amadureceu, foi realizada a caracterização morfológica das plantas utilizando descritores quantitativos propostos pelo International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI (1995).

Na caracterização morfológica das plantas foram utilizados seis descritores quantitativos, sendo eles: AP = altura da planta (cm), APB = altura da primeira bifurcação (cm), LDC = largura da copa (cm), DCL = diâmetro do caule (cm), CDF = comprimento da folha com pecíolo (cm) e LDF = largura da folha (cm). Os descritores de flor foram: NP = número de pétalas; NE = Número de estames; CDC = Comprimento da Corola (cm) e LDP = Largura da pétala (cm). Para fruto: PF = peso do fruto (g); CF = comprimento do fruto (cm); DF = diâmetro do fruto (cm); CDP = comprimento do pedúnculo (cm); EPF = espessura da parede do fruto (cm); CP = comprimento da placenta (cm); NSF = número de sementes por fruto (NSF) e TMS = teor de matéria seca (%).

Além dos descritores sugeridos pelo IPGRI, foi avaliada a quantidade de clorofila A e clorofila B, utilizando o equipamento clorofiLOG 1030 da Falker®.

2.5. Determinação do ciclo de melhoramento

O ciclo de desenvolvimento foi dividido nas seguintes fases como sugerido por Manzur et al. (2014): Fase I: da autofecundação até a obtenção das sementes (método convencional) ou, alternativamente, para até o isolamento e cultura de embriões (método *in vitro*), a Fase II: a partir de semeadura das sementes ou dos embriões até o momento do transplântio, Fase III, a partir da fase de transplântio até a iniciação da antese

(registrado na antese das três primeiras flores), a qual foi considerada a fase em que os melhoristas poderiam realizar autofecundações para uma nova geração. Além destas três fases, foi acrescentada a Fase IV (iv): da antese das três primeiras flores a maturação dos três primeiros frutos, justificada pelo fato que os caracteres relacionados aos frutos são utilizados na seleção de pimenteiros ornamentais (Rêgo et al. 2009; Rêgo et al.,2011b).

A determinação do ciclo de melhoramento foi realizada também para os três genótipos utilizando-se o método convencional (SCC), ou seja, extraindo-se as sementes dos frutos maduros. Estas sementes foram postas para germinar em bandejas de isopor contendo 200 células preenchidas com substrato Basaplant®. Posteriormente, uma média de 10 plântulas de cada acesso, com 6 folhas definitivas, foram transplantadas para vasos de 900 ml contendo o mesmo substrato e mantidas em casa de vegetação até o período de floração e frutificação.

2.6. Análise estatística

A análise de germinação dos embriões, as perdas na aclimatização e no vaso e a caracterização das plantas foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida no tempo (2 x 3 x 4). Em que foram 2 meios (M1 e M2), 3 genótipos (UFPB 001, UFPB 004 e UFPB 099) e 4 períodos de coleta de frutos (20, 25, 30 e 35 DAA). Cada placa foi considerada uma repetição, totalizando 3 repetições, contendo 6 embriões cada. Todas as plantas obtidas foram aclimatadas. No campo, foram caracterizadas 4 plantas de cada tratamento, em que cada planta foi considerada uma repetição.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Genes (Cruz, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Germinação e perdas na aclimatização no sistema EZI

A análise de variância para o DAA foi significativa ($p \leq 0.01$) para as três variáveis analisadas, enquanto que o efeito isolado do meio e dos genótipos não foi significativo (Tabela 1). O efeito da interação D x M e M x G também não foi significativo. A interação D x G influenciou significativamente as variáveis germinação, porcentagem de perdas na aclimatização e no vaso ($p \leq 0.05$ e $p \leq 0.01$).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para germinação *in vitro* de embriões zigóticos imaturos e porcentagem de perdas durante a aclimatização transplantio em plântulas de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L).

F.V	GL	QM		
		GER	PAC	PVA
DAA (D)	3	23333.41 **	3668.37 **	15094.96 **
Meio (M)	1	138.88ns	466.65 ns	265.65 ns
Genótipos (G)	2	304.31 ns	619.29 ns	132.74 ns
D x M	3	107.51 ns	832.53 ns	690.06 ns
D x G	6	870.13 *	1645.73 **	1260.11 *
M x G	2	936.87 ns	880.09 ns	926.30 ns
D x M x G	6	103.54 ns	781.63 ns	503.45 ns
CV (%)		28.5	114.69	109.03

GER: germinação, **PAC:** porcentagem de perdas na aclimação. **PVA:** porcentagem de perdas no vaso. ns: não significativo; *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente.

Ao desdobrar a interação D x G, pode-se observar que a variável germinação (Tab. 2), os genótipos diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0.05$) apenas aos 20DAA. O genótipo UFPB 001 apresentou 30.53% dos embriões germinados, enquanto que não foi observada germinação nos genótipos UFPB 004 e UFPB 099, no mesmo período. Dentro de cada um dos genótipos, não existiu diferença nos percentuais de germinação observados aos 25, 30 e 35 DDA (Figs. 1A e 1B). As médias variaram de 77- 80% no genótipo UFPB 001, 72-94% do genótipo UFPB 004 e 61-92% no genótipo UFPB 099. Estas taxas podem ser consideradas altas quando comparadas a germinação de sementes imaturas em pimentas e pimentões, pelo método convencional, que não ultrapassa 40% até os 45 dias (Denir e Ellis, 1992; Sanchez et al. 1993; Vidigal et al. 2011; Pereira et al. 2014). De modo geral, o percentual de germinação aumenta à medida que os embriões são mais tardios, estes resultados são concordantes aos observados em outras solanáceas como o tomate (Gebololu et al. 2011) pimentas e pimentões (Manzur et al. 2013).

Tabela 2. Desdobramento da interação D x G para as variáveis (GER) germinação, (PAC) e porcentagem de perdas na aclimatização no cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L).

DAA	GER			PAC			PVA		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099
20	30.53 Ab	0 Ab	0Ab	45Aa	0Bb	0Ba	100Aa	0Bb	0Bb
25	77.75 Aa	72.18 Aa	61.08 Aa	22.5Aa	49.16Aa	39Aa	51.66Aa	100Aa	66.66Aa
30	74.96 Aa	88.86 Aa	83.3 Aa	13.6Aa	2.76Ab	15.83Aa	19.43Aab	9.43Ab	14.98Aab
35	80.53 Aa	94.43 Aa	91.65 Aa	8.88Aa	0Ab	3.33Aa	2.16Ab	2.76Ab	6.93Ab

GER: germinação, **PAC:** porcentagem de perdas na aclimação. **PVA:** porcentagem de perdas no vaso.

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula no horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Novamente, para a variável perdas na aclimatização, apenas aos 20DAA foi observada diferença entre os genótipos testados (Tab. 2). Os genótipos UFPB 004 e UFPB 099 não apresentaram germinação aos 20DAA e, conseqüentemente, não obtiveram perdas. Em média, 45% das plântulas obtidas dos embriões regenerados no genótipo UFPB 001 aos 20 DAA foram perdidos durante a aclimatização (Figs. 1C e 1D). Para os genótipos UFPB 001 e UFPB 099 não houve diferenças entre as perdas aos 25, 30 e 35 DAA, o percentual de perdas neste período não superou os 40%. Dentro do genótipo 004, as maiores perdas ocorreram aos 25 DAA (49%), enquanto que aos 30 DAA e 35 DAA foi praticamente zero. Yeung e Sussex (1979) relatam que embriões imaturos excisados de várias espécies de plantas, podem ignorar uma fase característica do desenvolvimento normal do embrião, em que ocorre um acúmulo de nutrientes, evoluindo rapidamente para mudas geralmente fracas. Este fato pode está relacionado as maiores perdas observadas nos embriões excisados precocemente aos 20DAA e 25DAA. Segundo Raghavan (1966), os embriões mais tardios já apresentam uma capacidade autotrófica mais elevada, apresentando plântulas mais desenvolvidas e resistentes a aclimatização, podendo ser uma explicação para as menores perdas observadas aos 30 e 35DAA.

As plântulas sobreviventes na aclimatização foram transferidas para o vaso, nesta ocasião, pode-se observar para o genótipo UFPB 001 aos 20DAA, que 100% das plântulas foram perdidas (Tab. 2). Desta forma, nenhuma planta oriunda de embriões aos 20DDA conseguiu chegar à casa de vegetação. Perdas acima de 50% foram observadas para todos os genótipos aos 25DAA, que não diferiram estatisticamente entre si. Para o genótipo UFPB 004, no entanto, estas perdas chegaram a 100%, não apresentando plantas na casa de vegetação, evidenciando as altas perdas nesta fase. Em girarasol, a partir de 100 embriões zigóticos imaturos apenas uma média de 40-45 plantas são regeneradas (Dagustu et al. 2012). As necessidades nutricionais de embriões zigóticos muito jovens ainda permanecem indefinidos, nesta fase os tecidos circundantes, especialmente o endosperma, controlam o padrão pré-determinado de desenvolvimento do embrião, assim, qualquer alteração pode provocar anomalias morfológicas e fisiológicas, levando a morte das plântulas (Bhojwani e Dantu, 2013). Esta resposta parece ainda está relacionada as diferenças genotípicas, observadas para as variáveis analisadas. As menores perdas, foram obtidas das plântulas originárias de embriões aos 30 e 35DAA, em todos os genótipos testados, inferiores a 20%.

A aclimatização das plantas e o transplântio, ainda é um dos principais entraves da cultura de tecidos, pois um número expressivo de espécies vegetais cultivadas *in vitro* não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (Chandra et al. 2010; Hazarika, 2003; Coner e Thomas 1982). Vários fatores estão envolvidos com a adaptação das plantas as condições *ex vitro*, como as concentrações de sacarose e CO₂ no interior do recipiente e a intensidade luminosa (Kozai et al. 1988; Kozai et al. 1991; Hazarika, 2003).

Altas concentrações de sacarose têm sido associadas a baixa capacidade fotoautotrófica e a alterações anatômicas nas folhas e raízes, causando a morte das plântulas durante a fase de aclimatização (George e Sherrington, 1984; Kozai, 1991) Langford e Wainwright, 1987; Wainwright, e Marsh, 1989). Este pode ter sido um dos motivos para os altos percentuais de perdas observados, uma vez que a concentração de sacarose utilizada neste experimento foi 40g/L, superior ao normalmente utilizado de 20-30g/L. Desta forma, apesar de bem desenvolvidas, as plântulas poderiam apresentar baixa capacidade fotoautotrófica e possíveis alterações anatômicas. Por outro lado, altas concentrações de sacarose são necessárias para manter o potencial osmótico no cultivo dos embriões imaturos (Bhojwani e Dantu, 2013).

Na condição *in vitro*, as plântulas estão sob baixa intensidade de luz (lux 1.200-3.000) e temperatura (25 ± 2 ° C), as transferências destas para a condição externa com amplo espectro de luz variando de 4.000-12.000 lux e temperatura (26-36°C), dependendo do ambiente, pode causar carbonização de folhas e murcha das plântulas (Chandra et al. 2010). Estas características se assemelham as observadas neste experimento, mesmo passando por um período de aclimatização (Figs. 2C e 2D). Além disso, a transferência das plântulas *in vitro* para a condição *ex vitro* pode levar a uma redução transitória nos parâmetros fotossintéticos (Chandra et al. 2010). Uma redução na taxa fotossintética líquida em *Solanum tuberosum* foi relatada na primeira semana após o transplântio (Pospilova et al. 1999). Esta alteração, pode ser letal a plântula.

Desta forma, como relatado por Mathur et al., (2008), afim de aumentar o crescimento e reduzir a mortalidade em plântulas na fase de aclimatização, é necessário uma investigação mais aprofundada das condições ambientais, tanto físicas quanto químicas. Como este é o primeiro relato do uso da técnica em pimenteirias ornamentais, os fatores descritos devem ser estudados e aprimorados buscando reduzir estas perdas e aumentar a taxa de germinação em embriões mais precoces.

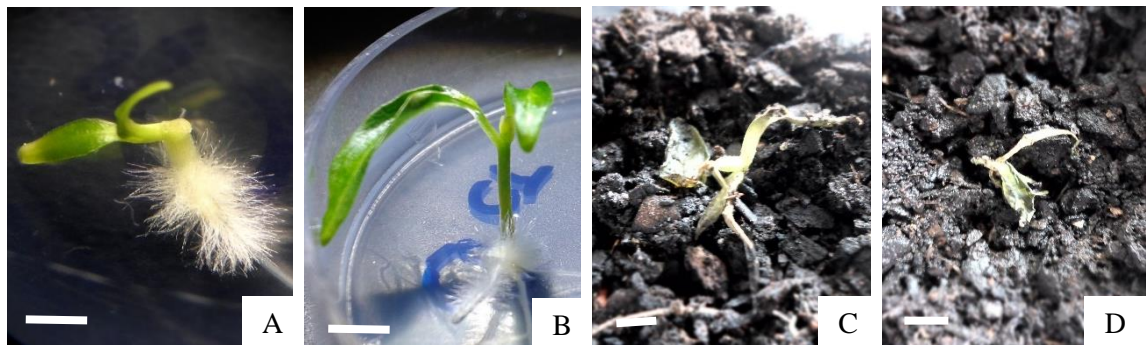


Figura 1. Germinação, desenvolvimentos (A e B) e perdas durante aclimatização e transplântio (C e D) em cultura *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.). Barra: 5 mm

3.2. Caracterização morfológica das plantas

As características morfológicas das plantas obtidas do cultivo *in vitro* foram altamente influenciadas por todos os fatores estudados: Dias após a autofecundação (DAA), Genótipos (G) e Meios (M). Efeito significativo foi observado por meio da análise de variância ($p \leq 0.01$) para todas as interações DAA x M, DAA x G e M x G (Anexo 1). Apenas a variável espessura da parede do fruto não foi influenciada significativamente por nenhum dos fatores e interações estudadas.

No desdobramento da interação DAA x M (Tab. 3), pode-se observar que aos 25 DAA os meios diferiram entre si para todas as variáveis com exceção do número de anteras e número de pétalas. Em todos os caracteres, as plantas germinadas no meio M1 apresentaram as maiores médias. Aos 30 DAA a influência dos meios foi menos expressiva, influenciando apenas a variável diâmetro do caule. Novamente, no meio M1 foram observadas plantas de caule mais desenvolvido (0,66 cm), enquanto no meio M2 as plantas apresentaram em média 0,58 cm. Aos 35 DAA, não houve diferenças entre os meios, para todas as variáveis.

1 **Tabela 3.** Desdobramento da interação DAA x M para caracteres morfológicos de plantas de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.) obtidas do
 2 cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos.

AP			APB		LDC		DCL		CDF		LDF			
DAA	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
20	0 Ac	0Ac	0Ac	0Ab	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac		
25	9Ab	4.16Bb	2.33Ab	0.79Bb	13.08Ab	6.45Bb	0.38Ab	0.18Bb	3.45Ab	1.44Bb	1.23Ab	0.57Bb		
30	15.62Aa	14.58Aa	3.37Aab	3.25Aa	21.95Aa	22.35Aa	0.66Aa	0.58Ba	7.25Aa	7.07Aa	2.3Aa	2.17Aa		
35	16.95Aa	15.50Aa	4.36Aa	4.55Aa	23.37Aa	20.14Ba	0.62Aa	0.60Aa	7.44Aa	7.35Aa	2.25Aa	2.23Aa		
CLA			CLB		NA		NP		CDC		LPT			
DAA	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2		
20	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0 Ac	0Ac	0 Ac	0Ac		
25	32.58Ab	15.13Bb	12.78Aa	5.8Bb	4Ab	4.88Ab	4Ab	4Ab	1.13Ab	0.6Bb	0.31Ab	0.17Bb		
30	42.11Aa	43.18Aa	16.96Aa	17.01Aa	5.83Aa	5.69Aa	5.83Aa	5.7Aa	1.93Aa	1.86Aa	0.54Aa	0.49Aa		
35	44.23Aa	46.7Aa	16.04Aa	19.25Aa	5.8Aa	5.52Aa	5.81Aa	5.53Aa	1.92Aa	1.86Aa	0.51Aa	0.52Aa		
NFP			PF		MDF		MEDF		CDP		NS		TMS	
DAA	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
20	0 Ab	0Ab	0 Ac	0Ab	0 Ac	0Ac	0 Ac	0Ac	0 Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab
25	15.5Aa	5.91Bb	2.62Ab	1.1Bb	1.18Ab	0.61Bb	0.78Ab	0.37Bb	1.61Aa	0.79Bb	43.76Aa	13.57Bb	7.59Ab	3.41Bb
30	23.33Aa	24Aa	4.24Aa	4.11Aa	2Aa	1.91Aa	1.05Aa	1.02Aa	1.44Aa	1.5Aa	40.86Aa	41.55Aa	13.93Aa	14.73Aa
35	18.16Aa	18.83Aa	4.24Aa	4.28Aa	1.95Aa	1.99Aa	1.08Aa	1.03Aa	1.59Aa	1.39Aa	42.86Aa	43.91 Aa	12.14Aa	13.88Aa

3 AP = altura da planta (cm), APB = altura da primeira bifurcação (cm), LDC = largura da copa (cm), DCL = diâmetro do caule (cm), CDF = comprimento da folha com pecíolo
 4 (cm) e LDF = largura da folha (cm). Os descritores de flor foram: NP = número de pétalas; NE = Número de estames; CDC = Comprimento da Corola e LDP = Largura da
 5 pétala. Para fruto: PF = peso do fruto (g); CF = comprimento do fruto (cm); DF = diâmetro do fruto (cm); CDP = comprimento do pedúnculo (cm); EPF = espessura da parede
 6 do fruto (cm); CP = comprimento da placenta (cm); NSF = número de sementes por fruto (un) e TMS = teor de matéria seca (%).

7

8 Dentro do M1, não houve diferenças entre a maior parte das variáveis entre os 30
9 e 35DAA. Apenas as variáveis CLB, NFP, CDP e NS não diferiram estatisticamente entre
10 as plantas aos 25, 30 e 35 DAA. Dentro do meio M2, não houve diferença entre os 30 e
11 35 DAA. Estatisticamente, foi observado uma diferença entre o porte das plantas obtidas
12 aos 30 DAA e 35 DDA em comparação com as plantas obtidas aos 25 DAA, em ambos
13 os meios, esta diferença é bem evidente como mostra a Fig. 2A. A altura das plantas aos
14 30 e 35 DAA no M1, por exemplo, foram 15,62cm e 16,95cm, respectivamente, plantas
15 de em média 9 cm foram observados aos 20 DAA.

16 A interação DAA x G (Tab. 4) evidenciou diferenças genótípicas aos 25 DAA
17 para todas as variáveis, devido ao fato do genótipo UFPB 004 não ter apresentado plantas
18 regeneradas neste período, uma vez que, as plantas foram perdidas na aclimatização (Tab.
19 2). Entre os genótipos UFPB 001 e UFPB 099 foram observadas diferenças significativas
20 para a maioria das variáveis, com exceção da APB, NFP, CF e NS. O genótipo UFPB 001
21 apresentou maior porte, flores e frutos maiores e mais vistosos em relação ao genótipo
22 UFPB 099.

23 Aos 30 DAA, os genótipos diferiram entre si apenas para AP, DCL, CF, LF, LPT,
24 e PF. O genótipo UFPB 001 apresentou as menores médias para AP e LF, 13,56 cm e
25 2,17 cm, respectivamente. O genótipo UFPB 099 apresentou a maior média para DCL,
26 enquanto que os genótipos UFPB 001 e UFPB 004 não diferiram estatisticamente entre
27 si. O genótipo UFPB 004 por sua vez, foi superior para o CF, LF, LPT e PF. No período
28 de 35 DDA, as diferenças entre os genótipos também foi menos evidente, influenciando
29 significativamente apenas as variáveis DCL, PF e MDF. Nos três casos, o genótipo UFPB
30 004, apresentou as maiores médias, o que representa uma característica inerente do
31 próprio genótipo.

32 A interação M x G também evidenciou o comportamento diferencial dos
33 genótipos nos meios testados (Tab. 5). Dentro dos meios M1 e M2, os genótipos não
34 diferiram apenas para as variáveis APB, NFP, PF e NS. Para as demais características
35 pelo menos um dos genótipos diferiu entre si. Os genótipos UFPB 001 e UFPB 099 se
36 comportaram igualmente tanto dentro do meio M1 quanto do meio M2, nas variáveis DC,
37 CLA, CLB e CDC, apresentando sempre as maiores médias em relação ao genótipo 004.
38 Dentro dos genótipos, apenas o genótipo UFPB 099 sofreu influência do meio de cultura,
39 para grande parte das variáveis com exceção PF e TMS, em todos os casos o maior
40 desenvolvimento foi observado no M1.

41 **Tabela 4.** Desdobramento da interação DAA x G para caracteres morfológicos de plantas de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.) obtidas do
 42 cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos.

DAA	AP			APB			LDC			DCL			CDF			LDF			CLA		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
20	0Ac	0Ab	0Ac	0Ac	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ac	0Ab	0Ac	0Ac	0Ac	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac
25	12.25Ab	0Cb	7.5Bb	2.68Ab	0Bb	2Ab	19.06Aa	0Cb	10.25Bb	0.56Aa	0Cb	0.28Bb	4.25Ab	0Cb	3.08Bb	1.7Ab	0Cc	1.01Bb	48.65Aa	0Cb	22.93Bb
30	13.56Bb	15.68Aa	16.06Aa	2.97Aab	3.62Aa	3.35Aab	20.4Aa	22.5Aa	23.56Aa	0.58Ba	0.59Ba	0.68Aa	7.1ABa	7.54Aa	6.84Ba	2.17Ba	2.53Aa	1.99Ca	44.58Aa	42.45Aa	40.91Aa
35	15.93Aa	16.31Aa	16.43Aa	4.4Aa	4.35Aa	4.62Aa	21.81Aa	20.5Aa	22.96Aa	0.58Ba	0.58Ba	0.67Aa	7.45Aa	7.18Aa	7.55Aa	2.3Aa	2.26Ab	2.17Aa	44.35Aa	46.91Aa	45.15Aa
DAA	CLB			NA			NP			CDC			LPT			NFP			PF		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
20	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac
25	18.05Aa	0Cb	9.83Bb	5.83Aa	0Cb	3Bb	5.83Aa	0Cb	3Bb	1.71Aa	0Cb	0.89Bb	0.49Aa	0Cb	0.23Bb	16.62Aa	0Bb	15.5Ab	3.54Aa	0Cb	2.06Bb
30	17.53Aa	17.67Aa	15.75Aa	5.87Aa	5.62Aa	5.79Aa	5.87Aa	5.62Aa	5.79Aa	1.86Aa	1.98Aa	1.84Aa	0.49Ba	0.55Aa	0.50ABa	23.12Aa	22.75Aa	25.12Aa	3.34Ba	5.43Aa	3.77Ba
35	18.22Aa	17.45Aa	17.27Aa	5.87Aa	5.54Aa	5.58Aa	5.87Aa	5.54Aa	5.58Aa	1.88Aa	1.88Aa	1.93Aa	0.49Aa	0.53Aa	0.53Aa	18Aa	18.62Aa	18.87Aab	4.11ABa	4.91Aa	3.74Ba
DAA	CF			MDF			MEDF			CDP			NS			TMS					
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099			
20	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ac	0Ab	0Ab	0Ac	0Ac	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ab	0Ac			
25	2.82Aa	0Bb	1.98Aa	1.90Aa	0Cb	0.80Bb	1.07Aa	0Cb	0.67Bb	2.3Aa	0Cb	1.31Ba	48.36Aa	0Bb	37.65Aa	11.01Aa	0Cb	5.48Bb			
30	3.85Aa	3.80Aa	3.31Aa	1.87Aa	2.11Aa	1.88Aa	0.96Aa	1.15Aa	0.99Aa	1.26Ab	1.55Aa	1.60Aa	42.12Aa	43.33Aa	38.16Aa	13.97Aa	13.62Aa	15.39Aa			
35	3.05Aa	3.41Aa	3.42Aa	1.97ABa	2.13Aa	1.80Ba	1.12Aa	1.11Aa	0.94Aa	1.32Ab	1.49Aa	1.66Aa	41Aa	46.83Aa	42.33Aa	12.61Aa	13.38Aa	13.05Aa			

43 AP = altura da planta (cm), APB = altura da primeira bifurcação (cm), LDC = largura da copa (cm), DCL = diâmetro do caule (cm), CDF = comprimento da folha com pecíolo
 44 (cm) e LDF = largura da folha (cm). Os descritores de flor foram: NP = número de pétalas; NE = Número de estames; CDC = Comprimento da Corola e LDP = Largura da
 45 pétala. Para fruto: PF = peso do fruto (g); CF = comprimento do fruto (cm); DF = diâmetro do fruto (cm); CDP = comprimento do pedúnculo (cm); EPF = espessura da parede
 46 do fruto (cm); CP = comprimento da placenta (cm); NSF = número de sementes por fruto (un) e TMS = teor de matéria seca (%).

47

48

49 **Tabela 5.** Desdobramento da interação M x G para caracteres morfológicos de plantas de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.) obtidas
 50 do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos

Meio	AP			APB			LDC			DCL			CDF		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
M1	10.45ABa	8.53Ba	12.09Aa	2.53Aa	1.95Aa	3.07Aa	15.84Aa	11.07Ba	16.89Aa	0.45Aa	0.30Ba	0.49Aa	4.63Aa	3.74Ba	5.23Aa
M2	10.31Aa	7.46Ba	7.90Bb	2.5Aa	2.03Aa	1.91Ab	14.79Aa	10.42Ba	11.5ABb	0.41Aa	0.28Ba	0.33Bb	4.77Aa	3.62Ba	3.5Bb
Meio	LDF			CLA			CLB			NA			NP		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
M1	1.52Aa	1.24Ba	1.57Aa	35.35Aa	21.39Ba	32.45Aa	13.19Aa	8.39Ba	12.75ABa	4.5Aa	2.89Ba	4.33Aa	4.5 Aa	2.89Ba	4.34 Aa
M2	1.56Aa	1.15Ba	1.01Bb	33.44Aa	23.28Ba	22.04Ba	13.71Aa	9.16Ba	8.67Bb	4.29Aa	2.68Ba	2.84Bb	4.37Aa	2.68 Ba	2.85Bb
Meio	CDC			LPT			NFP			PF			MDF		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
M1	1.36Aa	0.99Ba	1.39Aa	0.36Aa	0.27Ba	0.38Aa	12.43Aa	11.25Aa	19.06Aa	2.77Aa	2.73Aa	2.83Aa	1.43Aa	1.08Ba	1.33ABa
M2	1.36Aa	0.93Ba	0.94Ab	0.37Aa	0.27Ba	0.24Bb	16.43Aa	9.43Aa	10.68Ab	2.72Aa	2.44Aa	1.95Aa	1.44Aa	1.03Ba	0.90Bb
Meio	MEDF			CDP			NS			TMS					
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099			
M1	0.77ABa	0.56Ba	0.85Aa	1.17ABa	0.83Ba	1.48Aa	30.75Aa	24.77Aa	40.09Aa	8;87Aa	6.71Aa	9.66Aa			
M2	0.80Aa	0.56Ba	0.45Bb	1.27Aa	0.69Ba	0.80Bb	34.99Aa	20.31Aa	18.97Ab	9.92Aa	6.79Aa	7.29Aa			

51 AP = altura da planta (cm), APB = altura da primeira bifurcação (cm), LDC = largura da copa (cm), DCL = diâmetro do caule (cm), CDF = comprimento da folha com
 52 pecíolo (cm) e LDF = largura da folha (cm). Os descritores de flor foram: NP = número de pétalas; NE = Número de estames; CDC = Comprimento da Corola e LDP = Largura
 53 da pétala. Para fruto: PF = peso do fruto (g); CF = comprimento do fruto (cm); DF = diâmetro do fruto (cm); CDP = comprimento do pedúnculo (cm); EPF = espessura da
 54 parede do fruto (cm); CP = comprimento da placenta (cm); NSF = número de sementes por fruto (un) e TMS = teor de matéria seca (%).

55

56

57 De um modo geral, a partir da análise das interações, pode-se perceber que as
58 diferenças entre os meios de cultura foram mais evidentes aos 25 DAA, fase em que se
59 encontram embriões mais jovens e, portanto, mais exigentes quanto aos constituintes do
60 meio (Brindgen 1994; Raghavan et al. 2003; Bhojwani e Dantu, 2013). O M1 propiciou
61 o maior desenvolvimento das plantas neste período. Ainda em relação aos meios, a
62 interação destes com os genótipos revelou que apenas o genótipo 099 sofreu influência
63 das diferentes concentrações de sais. Novamente, as plantas mais desenvolvidas foram
64 observadas no M1 (Fig. 2B). O meio M1, foi constituído por metade dos sais do meio
65 MS, este não influenciou significativamente a germinação e as perdas durante a
66 aclimatização como pode ser visto na Tabela 1. Porém, com a redução dos sais, a planta
67 pode ter desenvolvido mecanismos, ainda não totalmente elucidados, que envolvem o
68 balanço dos sais e os demais constituintes do meio como sacarose e reguladores de
69 crescimento, que propiciaram o maior ou menor desenvolvimento das plantas (George
70 et al. 2008). A utilização de diluições dos macro-nutrientes do meio MS tem propiciado
71 o desenvolvimento satisfatório na germinação e micropropagação em diferentes
72 genótipos de pimenteiros (Ezura et al. 1993; Christopher e Rajam, 1994; Mahmood et al.
73 1995)

74 Entre os genótipos, dentro dos meios testados, o genótipo UFPB 004 (Fig. 2C)
75 apresentou sempre as menores médias. Plantas mais desenvolvidas foram também
76 observadas aos 30 e 35 DAA em todos os genótipos.

77 Quando se trata de pimenteiros ornamentais cultivadas em vaso, os caracteres
78 relacionados ao desenvolvimento da planta, mais precisamente relacionadas ao porte
79 como a altura da planta, altura da primeira bifurcação e diâmetro da copa são de grande
80 importância, pois são determinantes na harmonia da planta com o vaso (Rêgo et al. 2011a)
81 A partir de uma análise geral, de todas as interações, foi possível observar uma redução
82 para estes caracteres quando comparado aos dados obtidos por Nascimento (2015),
83 utilizando os mesmos genótipos. Neste experimento, por exemplo, foram observadas
84 plantas com média de no mínimo 4 cm até aproximadamente 17 cm, considerando as
85 interações específicas. As menores plantas, como relatado anteriormente, foram
86 encontradas principalmente aos 25 DAA quando os genótipos foram cultivados no M2.
87 Em girassol, todos os caracteres agrônômicos estudados (altura da planta, diâmetro da
88 flor, número de folhas, diâmetro do caule e número de sementes por flor) em plantas
89 regeneradas de embriões imaturos *in vitro* diminuíram em comparação com plantas que
90 cresceram no campo (Dagustu et al. 2012). Gopalakrishnan et al., (1993) descrevem que

91 a fase vegetativa de plantas derivadas de embriões é relativamente curta resultando em
92 plantas pequenas com florescimento precoce, fato também observado neste experimento
93 (Fig. 2D). Assim, uma inibição fisiológica do desenvolvimento do embrião é
94 propavelmente responsável por esta redução, principalmente em embriões jovens que
95 são dependentes do endosperma da sementes ou de outros tecidos circundantes (Acebedo
96 et al. 1997). Experimentos futuros devem ser realizados buscando comparar as
97 características morfológicas das plantas obtidas pelos sistemas EZI e SCC, buscando
98 esclarecer se estas diferenças são significativas.

99 Ainda em relação ao porte das pimenteirias cultivadas em vaso, sugere-se que o
100 diâmetro da copa e a altura da planta sejam de 1,5 a 2 vezes maior que o tamanho do vaso
101 (Barbosa, 2003), buscando manter uma relação harmônica. Neste caso, para o vaso
102 tradicionalmente utilizado de 13 cm, em nenhuma das interações foram observadas, o
103 porte adequado, segundo estes critérios. Este fato, mostra a possibilidade de estudos
104 utilizando outros tamanhos de vaso, buscando manter esta harmonia e abrindo a
105 possibilidade de atender desta forma, outros nichos de mercado. Segundo o padrão de
106 qualidade utilizado pela cooperativa Veiling Holambra (2015) para pimenteirias
107 ornamentais, no vaso nº 13 são permitidas altura de plantas entre no mínimo 12 cm e no
108 máximo 38.5, podendo ainda ser utilizado o tamanho padrão de vaso.

109 Considerando a interação entre os genótipos e os períodos estudados a
110 característica que sofreu maior variação foi o DCL e PF. Estas diferenças foram mais
111 marcantes entre os genótipos, no período de 25 DAA, período também que sofreu mais
112 influência dos meios utilizados. Nascimento (2015) observou em experimento com os
113 genótipos UFPB 099 e UFPB 001, DCL's de 0,90 e 0,84 e PF's de 5,09 e 3,77, estes
114 valores são inferiores aos observados neste trabalho para todas as interações estudadas.
115 Para o melhoramento de pimenteirias com finalidade ornamental, não é de interesse a
116 seleção de plantas com menor diâmetro do caule, pois estas podem acamar no vaso,
117 podendo perder o valor comercial (Silva Neto et al., 2014). Porém, como também foi
118 observada uma redução do porte, a redução do diâmetro do caule foi proporcional, não
119 sendo observados danos as plantas.

120 Em menor magnitude as variáveis AP, CDF, LDF, E MDF também foram
121 influenciadas pela interação D x G. As folhas possuem um importante papel estético
122 importante no preenchimento dos espaços entre os ramos na cobertura dos vasos, dando
123 uma aparência de copa mais compacta, sendo um dos critérios de controle de qualidade
124 observados na Cooperativa Veiling Holambra (2015). O comprimento e largura das folhas

125 observadas neste experimento foram maiores do que os observados em outros genótipos
126 de pimenteiras ornamentais (Pessoa et al. 2015; Nascimento, 2015 Silva Neto et al. 2014;
127 Barroso et al. 2012). Este tamanho de folha fornece um equilíbrio com o tamanho dos
128 frutos encontrados nos genótipos estudados.

129 Recentemente as pimenteiras ornamentais passaram também a ser conhecidas
130 como “pimenteiras ornamentais comestíveis”, por possuir dupla finalidade, ou seja, além
131 de seu uso na decoração de ambientes internos e jardins, seus frutos podem ser
132 consumidos *in natura* ou utilizados na confecção de chás ou temperos caseiros (Finger et
133 al. 2012; Rêgo et al. 2012a). Por este motivo, é importante em um programa de
134 melhoramento a avaliação dos frutos. Os caracteres relacionados a qualidade dos frutos
135 foram principalmente influenciados pelos meios aos 25 DAA, apresentando frutos
136 menores quando comparado aos 30 DAA e 35 DAA, novamente no M2, foram
137 observados os menores valores. O tamanho do fruto engloba os caracteres CF, MDF e
138 MEDF. O comprimento do fruto foi influenciado apenas pela interação DAA x G,
139 considerando os valores observados neste experimento os frutos são considerados grande,
140 com comprimento variando entre 1,98 – 3,85 cm. A maioria das ornamentais apresentam
141 frutos menores, como observado por Santos et al. (2014) e Melo et al. (2014) em acessos
142 de *C. annuum*. Não descaracterizando, porém, o uso como ornamental, uma vez que este
143 está relacionado com o gosto do consumidor. A relação entre MDF e MEDF faz referência
144 a um formato triangular do fruto, muito apreciado em pimenteiras ornamentais. Quando
145 comparado aas médias obtidas por Nascimento (2015), utilizando os mesmos genótipos,
146 os caracteres relacionados ao tamanho do fruto são semelhantes aos observados neste
147 experimento, não sendo, portanto, influenciado pela técnica de cultivo de embriões
148 imaturos.

149 Ainda em relação aos frutos, o NFP, é um dos caracteres que conferem valor
150 estético as pimenteiras, sendo utilizado como padrão de comercialização plantas com
151 mais de 10 frutos/planta (Veiling Holambra, 2015). As plantas obtidas no M2 aos 25
152 DAA, não atendem este padrão de qualidade, foram observados uma média de 6
153 frutos/planta. O genótipo UFPB 004 quando cultivado no meio M2 também não atingiu
154 esta média (M x G).

155 A caracterização morfológica revela que as plantas obtidas a partir de embriões
156 imaturos apresentaram desenvolvimento normal e mantêm as características necessárias
157 para o uso como pimenteiras ornamentais. Algumas alterações foram observadas

158 principalmente em relação ao porte, que aparentemente, foi reduzido, quando utilizados
159 embriões muito jovens e meio com a maior concentração de sais.

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

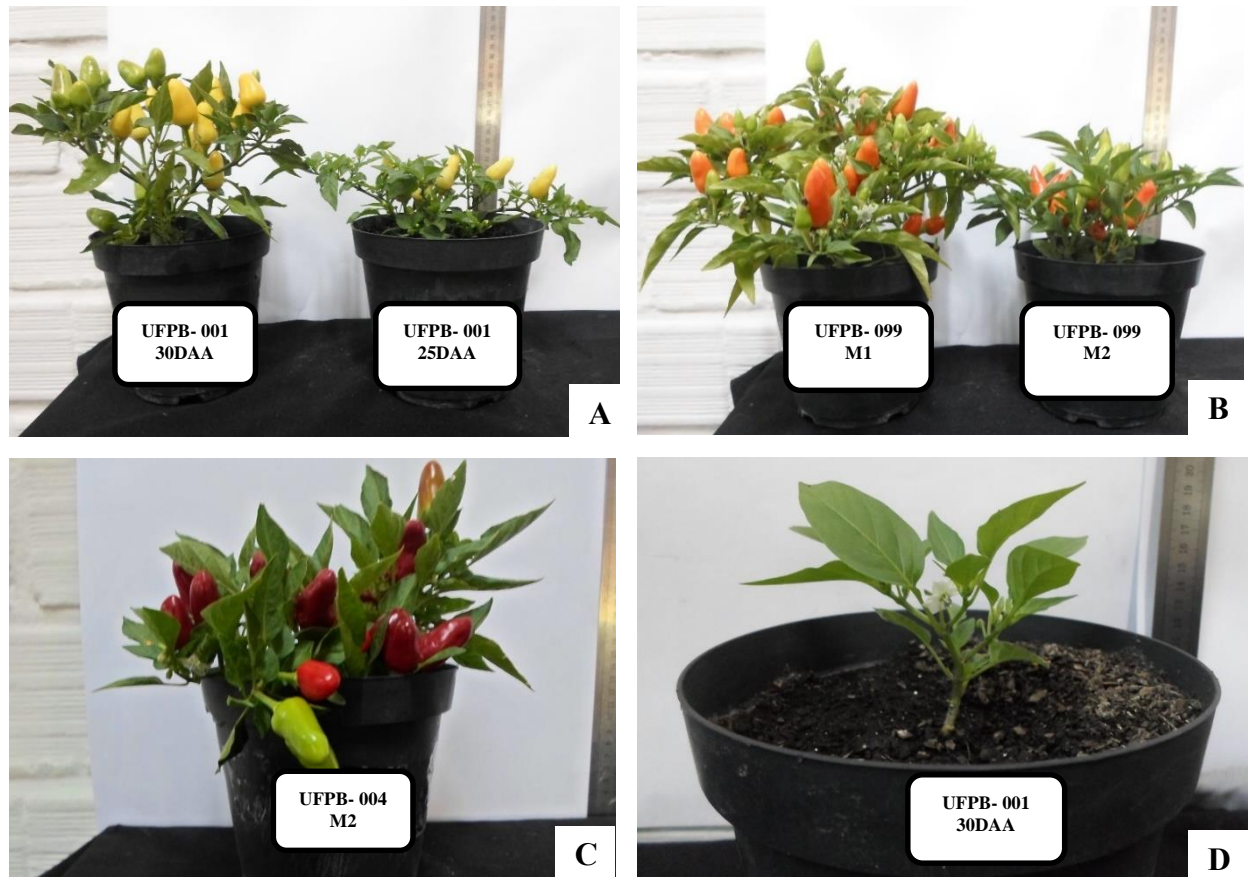


Figura 2. Pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.) obtidas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos. A) Diferenças no porte e desenvolvimento dos frutos aos 30 e 25 DAA; B) Influência dos meios nutritivos M1 e M2 sobre o desenvolvimento do genótipo UFPB 099; C) Genótipo UFPB 004; D) Plantas de porte reduzido em floração.

3.3.Determinação do ciclo de melhoramento nos sistemas EZI e SCC

192
193

194 O grande objetivo deste trabalho é demonstrar a magnitude da redução no ciclo
195 de melhoramento de pimenteiras. Diferenças estatísticas foram observadas entre os
196 genótipos, pelo método convencional (SCC), apenas na fase I (Anexo 2), correspondente
197 ao período entre a autofecundação até a obtenção das sementes (Tab. 6). O genótipo 004
198 diferiu estatisticamente do genótipo 099, necessitando de um maior período para obtenção
199 das sementes, aproximadamente 69 dias, contra 63 dias observados no genótipo 099. O
200 genótipo 001 apresentou comportamento intermediário, as sementes foram obtidas em
201 média 66 dias após a autofecundação. A fase II, correspondeu a um período de 47,6 a
202 51,8 dias. Após o transplântio até o início da antese (Fase III), foram necessários, em
203 média, 50 dias. A fase IV, durou de 47 a 51 dias. Por fim, o ciclo total desde a
204 autofecundação até a obtenção de frutos maduros variou de 211.8 (UFPB 099) a 216.6
205 (UFPB 001) dias, não havendo diferenças entre os genótipos.

206 O ciclo de melhoramento considerado por Manzur et al. (2014) é estabelecido até
207 o período da antese (Fase III), considerando este critério, o ciclo em pimenteiras
208 ornamentais durou em média 163, 168,2 e 164,8 dias, para os genótipos UFPB 001, UFPB
209 004 e UFPB 099, respectivamente. Estes valores estão dentro dos observados por Manzur
210 et al. (2014), para pimentas e pimentões. Ao testar 5 genótipos, os autores observaram
211 ciclos variando de 148 a 184 dias, ainda assim, uma diferença de aproximadamente 15
212 dias foi observada entre os genótipos mais tardios nos dois experimentos, evidenciando
213 as diferenças genotípicas e climáticas.

214 Utilizando a técnica de cultura de embriões zigóticos imaturos (EZI) foi detectada
215 a influência significativa ($p \leq 0.01$), através da análise de variância (dados não
216 apresentados), dos DAA e da interação D x G para todas as fases. O genótipo influenciou
217 significativamente as fases III, IV e total. A fase I, correspondente ao período da
218 autofecundação até a obtenção dos embriões, não foi submetida a análise estatística por
219 corresponder a um período fixo pré-determinado, porém, foi utilizado para o cálculo do
220 total de dias necessários para o fechamento do ciclo de melhoramento. Da mesma
221 maneira, o período de 20DAA, não apresentou plantas regeneradas e não submetido a
222 análise.

223 Ao desdobrar o efeito da interação entre os DAA x G (Tab. 7), pode-se observar
224 que os genótipos diferiram entre si aos 25DAA, nas Fases III, IV e total e aos 30 DAA
225 para a fase III. O genótipo UFPB 004 não completou o ciclo de melhoramento,

226 totalizando apenas 61,22 dias. Como foi visto na Tabela 2, 100% das plântulas obtidas
227 aos 25 DAA foram perdidas durante a aclimatização e transplântio, não sendo avaliados
228 nas fases seguintes (III e IV). Aos 30DAA, o genótipo UFPB 001, foi mais precoce que
229 os demais, o tempo decorrido desde o transplântio até a antese (fase III) foi de
230 aproximadamente 45 dias, nos genótipos UFPB 004 e UFPB 099, foram necessários 51 e
231 53 dias, respectivamente, evidenciando diferenças entre os genótipos. Tais diferenças
232 genotípicas para o período necessário até a antese foram também registradas em culturas
233 como algodão, tomate, pimentas e pimentões (Gebologlu et al. 2011; Wang et al. 2011;
234 Manzur et al. 2014).

235 Considerando o efeito dos DDA em cada genótipo, pode-se observar que para os
236 genótipos UFPB 001 e UFPB 099 o menor período para completar a fase II foi observado
237 aos 30 e 35DDA, diferindo estatisticamente dos 25 DAA. Dentro do genótipo UFPB 004,
238 apenas 22.66 dias foram necessários da inoculação ao transplântio (Fase II) aos 35 DAA,
239 diferindo estatisticamente de 30 DDA em que foram necessários em média 28 dias. Estas
240 diferenças devem estar relacionadas as fases de desenvolvimento dos embriões
241 encontrados em cada período, provavelmente por serem mais tardios e apresentarem todas
242 as estruturas morfológicas diferenciadas (radícula, hipocótilo e cotilédones) os embriões
243 desenvolvem-se rapidamente em plântulas.

244 A fase III, que corresponde ao período do transplântio até a antese, diferiu
245 estatisticamente apenas dentro do genótipo UFPB 001, em que as plantas oriundas de
246 embriões aos 30 DAA foram mais precoces (44.83 dias) quando comparado aos períodos
247 de 25 DAA (54 dias) e 35 DAA (53.16 dias), estes últimos não diferiram estaticamente
248 entre si. No genótipo UFPB 004, foram necessários em média 50 a 51.33 dias, e para o
249 genótipo UFPB 099, 51.83 a 52.83 dias para completar a Fase III. As plantas oriundas de
250 embriões aos 30 e 35 DAA também foram mais precoces em todos os genótipos para Fase
251 IV, variando de 45.33 a 47 dias no genótipo UFPB 001, 44.66 a 48.5 dias para o genótipo
252 UFPB 004 e 44.5 a 45 no genótipo UFPB 099.

253 O ciclo total de melhoramento, desde a autofecundação até o amadurecimento do
254 fruto, diferiu dentro dos genótipos UFPB 001 e UFPB 099. A maior redução foi observada
255 para o genótipo UFPB 001 aos 30 DAA, em que foram necessários em média 148.5 dias.
256 O maior período foi observado nas plantas oriundas de embriões aos 25 DDA, totalizando
257 171 dias. Dentro do genótipo UFPB 099, não houve diferença estatística entre a duração
258 total do ciclo aos 30 e 35 DAA, variando de 153.66 a 156.16 dias. Aos 25 DAA, foram
259 necessários aproximadamente 169 dias até o amadurecimento dos frutos. No genótipo

260 UFPB 004 o ciclo observado variou de 154 a 156.16 dias. Uma vez que, para a maioria
261 das fases não ocorreu diferenças significativas entre os 30 e 35 DAA, apresentando
262 sempre períodos mais curtos em relação as plantas obtidas de embriões aos 25 DAA, além
263 de apresentar as menores perdas durante a aclimatização e transplântio, recomenda-se
264 utilizar o período de 30 DAA (Fig. 3).

265

266

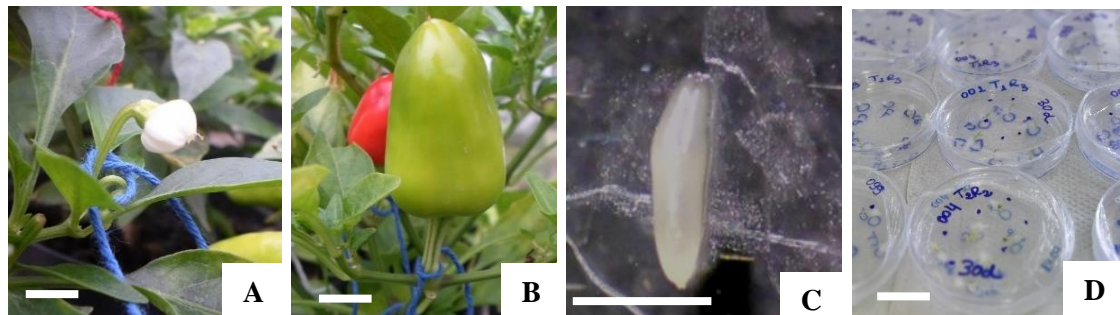
267

268

269

270

271



272

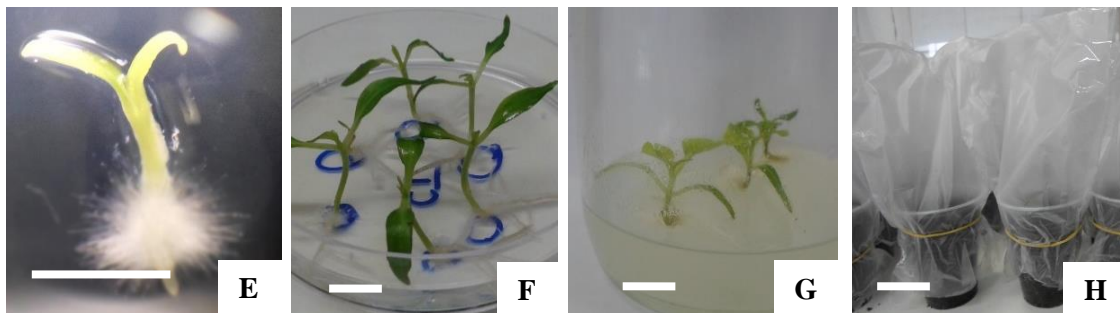
273

274

275

276

277



278

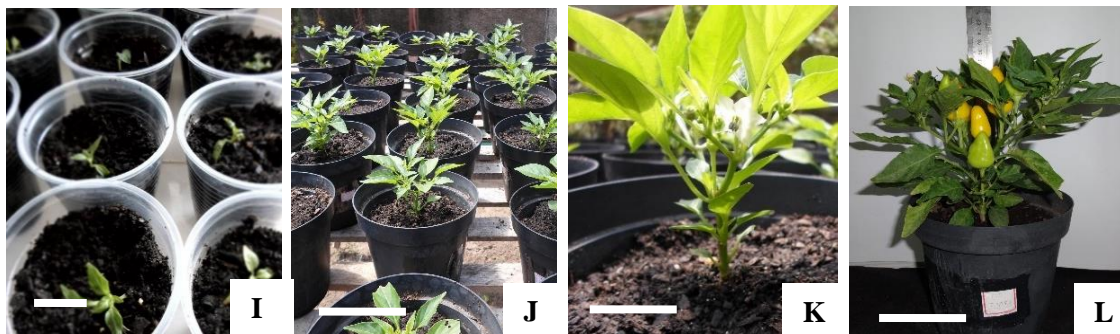
279

280

281

282

283



284

285 **Figura 3.** Ciclo de melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.) a
286 partir do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos. A) Flor
287 autofecundada- barra: 1cm B) Fruto imaturo – barra:1cm C) Embrião isolado
288 aos 30DAA – barra:1mm D) Embriões inoculados em discos de Petri – barra:
289 2 cm; E) Embriões germinados – barra: 5mm F e G) Plântulas regeneradas –
290 barra:2cm; H e I) Aclimatização – barra:3cm; J) Plântulas transplântas na casa
291 de vegetação – barra:10cm K) Antese – barra:4cm; L) Maturação dos frutos –
292 barra:10cm

293

294

Tabela 6. Ciclo de melhoramento convencional (SCC) de três genótipos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.).

Genótipo	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Total
001	65.8ab	47.6a	49.6a	51a	214a
004	69.2a	49.a	49.6a	48.4a	216.6a
099	62.8b	51.8a	50.2a	47a	211.8a

Fase I: da autofecundação até a obtenção das sementes (método convencional); **Fase II:** a partir de semeadura das sementes até o momento do transplântio, **Fase III:** a partir do transplântio até o início da antese, **Fase IV:** da antese a maturação dos três primeiros frutos. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Ciclo de melhoramento de três genótipos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum* L.) oriundos de embriões zigóticos imaturos (EZI).

DAA	Fase I			Fase II			Fase III			Fase IV			TOTAL		
	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099	001	004	099
25	25	25	25	35.66Aa	36.33Aa	35.66Aa	54Aa	0Bb	52.83Aa	56.33Aa	0Bb	55.16Aa	171Aa	61.22Bb	168.66Aa
30	30	30	30	26.66Ab	28Ab	26.33Ab	44.83Bb	51.33Aa	52.83Aa	47Ab	44.66Aa	44.5Ab	148.5Ac	154Aa	153.66Ab
35	35	35	35	24.66Ab	22.66Ac	24.33Ab	53.16Aa	50Aa	51.83Aa	45.33Ab	48.50Aa	45Ab	158.16Ab	156.16Aa	156.16Ab

Fase I: da autofecundação até a obtenção dos embriões imaturos; **Fase II:** a partir da inoculação *in vitro* até o momento do transplântio, **Fase III:** a partir do transplântio até o início da antese; **Fase IV:** da antese a maturação dos três primeiros frutos.

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula no horizontal não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

1
2 Quando comparado ao sistema SCC, considerando os valores obtidos aos 30DAA,
3 pode-se observar uma redução de aproximadamente 65 dias no genótipo UFPB 001, 63
4 dias para o genótipo UFPB 004 e 58.14 dias para o genótipo 099 utilizando o sistema
5 EZI. Uma redução de, em média, 30% no ciclo de melhoramento. Se for comparado o
6 ciclo de melhoramento segundo o critério utilizado por Manzur et al. (2014) a redução foi
7 de, em média, 35%.

8 Manzur et al. (2014), determinaram o ciclo de melhoramento convencional em 5
9 genótipos de pimentas e pimentões, e obtiveram uma variação de 148 a 184 dias (até a
10 antese). A partir do cultivo de embriões imaturos, este período foi reduzido para 93-133
11 dias. A maior redução foi obtida na cultivar de pimentão Califórnia Wonder, de 60 a 70
12 dias a menos que o método convencional, correspondendo a 35-40% de redução. Em
13 girassol a partir do cultivo *in vitro* de embriões com 10 dias de idade, Serieys (1992),
14 reduziu o ciclo de melhoramento pela metade, ainda com girassol, Dagustu et al. (2012)
15 observaram uma variação de 106- 160 dias no ciclo de melhoramento convencional em
16 11 genótipos, observando uma redução para 85-95 dias com os mesmos genótipos
17 cultivados *in vitro*, utilizando embriões com 12 dias.

18 É importante ressaltar que as fases I e II correspondem aquelas em que ocorre a
19 maior redução de tempo em relação ao método convencional e, conseqüentemente,
20 levando a redução do ciclo de melhoramento. As fases III e IV apresentam duração, em
21 dias, semelhantes entre os dois métodos, em média, 50 dias cada fase. Manzur et al.
22 (2014) sugerem que a germinação de embriões imaturos não afeta o posterior desenvolvimento
23 de plântulas e mudas.

24 Desta forma, uma redução significativa no ciclo de melhoramento pode ser obtida
25 ao cultivar embriões imaturos com 30 DDA para os genótipos estudados. Uma redução
26 de, em média, 60 dias a cada geração, alterando a obtenção de linhagem homozigotas,
27 obtidas convencionalmente após 7 a 8 gerações em autógamas (Seguí-Simarro, 2010), de
28 aproximadamente 5 anos, para pouco menos de 3 anos e meio, por exemplo. Sendo assim,
29 uma ferramenta valiosa para o programa de melhoramento de ornamentais.

31 4. CONCLUSÃO

32
33 O meio de cultura não influenciou significativamente a germinação e o
34 desenvolvimento dos embriões *in vitro*;

36 Não houve diferença na germinação de embriões aos 25, 30 e 35 DAA em todos
37 os genótipos estudados

38
39 Maiores perdas durante a aclimatização e o transplântio foram observadas aos 20
40 e 25 DAA.

41 As plantas originárias do sistema EZI apresentaram aspectos morfológicos
42 satisfatórios para o uso como ornamental

43

44 Uma redução de 30% no ciclo de melhoramento foi observado no sistema EZI
45 quando comparado ao sistema SCC

46 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

47

48 Acebedo MM; Lavee S; Linán J; Troncoso A (1997). In vitro germination of embryos for
49 speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Sci. Hortic.* 69,
50 207–215.

51

52 Barbosa JG (2003). *Crisântemos: produção de mudas, cultivo para cortar de flor, cultivo*
53 *em vaso, cultivo hidropônico.* Aprenda Fácil Editora.

54

55 Bhojwani SS; Dantu PK (2013). *Plant tissue culture: an introductory text.* India:
56 Springer.

57

58 Bosland PW (1996) *Capsicums: innovative uses of an ancient crop.* In: JANICK, J. (Ed.).
59 *Progress in new crops.* Arlington: ASHS Press. p. 479-487.

60

61 Bosland PW; Votava EJ. 2000. *Peppers: Vegetable and spice Capsicums.* CABI
62 Publishing, New York

63

64 Bridgen MP (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29(11), 1243-1246.

65

66 Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of
67 tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32(9), 1199-
68 1205.

69

70 Chen LZ; Adachi T (1996). Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum*
71 and *L. peruvianum* via embryo rescue and in vitro propagation. *Plant Breed.* 115,
72 251–256

73

74 Christophe T; Rajam MV (1994). In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant cell,*
75 *tissue and organ culture*, 38(1), 25-29.

76

77 Cruz CD (2006). *Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística.*
78 UFV, Viçosa.

79

80 Dağüstü N; Bayram G; Sincik M; Bayraktaroğlu M (2012). The short breeding cycle
81 protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Turkish
82 Journal of Field Crops, 17(2), 124-128.
83
84 Demir I; Ellis RH (1992). Development of pepper (*Capsicum annum*) seed quality.
85 *Annals of Applied Biology*, 121(2), 385-399.
86
87 Ezura H; Nishimiya S; Kasumi M. (1993). Efficient regeneration of plants independent
88 of exogeneous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant cell*
89 *reports*, 12(12), 676-680.
90
91 Finger FL; Silva TPD; Segatto FB; Barbosa JG (2015). Inhibition of ethylene response
92 by 1-methylcyclopropene in potted ornamental pepper. *Ciência Rural*, 45(6), 964-
93 969.
94
95 Finger, FL; Rêgo, ER; Segatto, FB; Nascimento, NFF; Rêgo, M. (2012). Produção e
96 potencial de mercado para pimenta ornamental. *Informe Agropecuário*, 33(267): 14-
97 20.
98
99 Gebologlu N; Bozmaz S; Aydin MC; Çakmak P. (2011). The role of growth regulators,
100 embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation
101 advancement in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Afr. J. Biotechnol.* 10,
102 4895–4900.
103
104 George EF, Hall MA De Klerk, GJ. (2008). Plant tissue culture procedure-background.
105 In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 1-28). Springer Netherlands.
106
107 George EF; Sherrington PD. Plant propagation by tissue culture. Eversley: Exegetics,
108 1984
109
110 Gopalkrishnan KM; Naidu R; Sreedhar, D. (1993). Shortening
111 breeding cycle through immature embryo culture in sunflower (*Helianthus annuus*
112 L.). *Helia*, 16: 61-68.
113
114 Hazarika BN (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Curr Sci* 85:1704–1712
115
116 Hossain MA; Minami M; Nemoto K (2003). Immature embryo culture and interspecific
117 hybridization between *Capsicum annum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue.
118 *Jpn. J. Trop. Agric.* 47, 9–16.
119
120 Jambhulkar SJ (1995). Rapid cycling through immature embryo culture in sunflower
121 (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 18(22): 45-50.
122
123 Kozai T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. In
124 *Micropropagation* (pp. 447-469). Springer Netherlands.
125
126 Kozai T, Kitaya Y, Fujiwara K, Adelberg J. (1995). Environmental control for large scale
127 production of in vitro plantlets. In *Current Issues in Plant Molecular and Cellular*
128 *Biology* (pp. 659-667). Springer Netherlands.
129

- 130 Leng P; Yamamura H (2006). Fruit set and embryo rescue in crosses using parthenocarpic
131 ‘Mopanshi’ persimmon. *Science Horticulturae*. 107, 332–336.
132
- 133 Lotfi M; Alan AR; Henning MJ; Jahn MM; Earle ED (2003). Production of haploid and
134 doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple
135 virus resistance. *Plant Cell Rep.* 21, 1121–1128.
136
- 137 Manzur JP; Oliva-Alarcón M; Rodríguez-Burruezo A. (2014). In vitro germination of
138 immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum*
139 *annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 170, 203-210.
140
- 141 Manzur JP; Penella C; Rodríguez-Burruezo A. (2013). Effect of the genotype,
142 developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of
143 immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161, 181-
144 187.
145
- 146 Mateos RM; Jiménez A; Román P; Romojaro F; Bacarizo S; Leterrier M; Gómez M;
147 Sevilla F; Del Río LA; Corpas FJ; Palma JM (2013). Antioxidant systems from
148 pepper (*Capsicum annum* L.) In: involvement in the response to temperature
149 changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9556- 9580
150
- 151 Mathur A, Mathur AK, Verma P et al (2008) Biological hardening and genetic fidelity
152 testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. *Afr J Biotechnol*
153 7:1046–1053
154
- 155 Melo LFD; Gomes RLF; Silva VBD; Monteiro ER.; Lopes ÂCA; Peron AP (2014).
156 Potential for ornamental use of pepper accessions. *Ciência Rural*, 44(11), 2010-2015.
157
- 158 Mhamood M; Atan Z; Kow CW (1995) Studies on tissue culture of diferente chilli
159 cultivars (*Cpsicum annum* L.). *Asia-Pacific J Mol Biol Biotech* (3):96-105
160
- 161 Michishita AK; Ureshino I; Miyajima (2001). Shortening the period from crossing to the
162 seedling stage through ovule culture of interspecific crosses of azelea (*Rhododendron*
163 spp.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 70(1): 54-59.
164
- 165 Murashige T; Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with
166 tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
167
- 168 Nascimento NFF (2015) Variabilidade, correlação, análise de trilha e fatores de
169 sensibilidade ao etileno em pimenteiras ornamentais (*Capsicum annum* L.). 76f.
170 Tese – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2015.
171
- 172 Pereira FECB, Torres SB, Lima Silva, MI, Grangeiro LC, Benedito CP (2014). Qualidade
173 fisiológica de sementes de pimenta em função da idade e do tempo de repouso pós-
174 colheita dos frutos. *Revista Ciência Agronômica*, 45(4), 737-744.
175
- 176 Pospíšilova J, Ticha I, Kadlecěk P et al (1999) Acclimatization of micropropagated plants
177 to ex vitro conditions. *Biol Plant* 42:481–497
178

179 Raghavan V (1966). Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. *Biol. Rev.*
180 41, 1–58.
181

182 Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2011a). Produção, Genética e Melhoramento de
183 Pimentas (*Capsicum* spp.). Recife: Imprima, 223p.
184

185 Rêgo ER; Finger FL; Rêgo MM (2012a). Types, uses and fruit quality of Brazilian chili
186 peppers. In: *Spices: Types, Uses and Health Benefits* (Kralis JF, ed.). Nova Science
187 Publishers, 131-144.
188

189 Rêgo ER; Nascimento MF; Nascimento NFF; Santos RMC; Fortunato FLG; RÊGO MM.
190 (2012b) Testing methods for producing self-pollinated fruits in ornamental peppers.
191 *Horticultura Brasileira* 30: 669-672.
192

193 Rêgo ER; Rêgo MM; Cruz CD; Finger FL; Casali VWD (2011b). Phenotypic diversity,
194 correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian
195 peppers (*Capsicum baccatum*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(6), 909-
196 918.
197

198 Rêgo ER; Rêgo MM; Finger FL (2015). Methodological basis and advances for
199 ornamental pepper breeding program in Brazil. *Acta Hortic.* 1087, 309-314
200

201 Rêgo ER; Rêgo MM; Finger FL.; Cruz CD; Casali VWD. (2009). A diallel study of yield
202 components and fruit quality in chilli pepper (*Capsicum baccatum*). *Euphytica*,
203 168(2), 275-287.
204

205 Rêgo ER; Rêgo MM; Finger FL; Cruz CD; Casali VWD (2009). A diallel study of yield
206 components and fruit quality in chilli pepper (*Capsicum baccatum*). *Euphytica*,
207 168(2), 275-287.
208

209 Sanchez VM; Sundstrom FJ; McClure GN; Lang NS (1993). Fruit maturity, storage and
210 postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed
211 quality. *Scientia Horticulturae*, 54(3), 191-201.
212

213 Santos RMC; Rêgo ER; Borém A; Nascimento MF; Nascimento NFF; Finger FL; Rêgo
214 MM (2014). Epistasis and inheritance of plant habit and fruit quality traits in
215 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genetics and Molecular Research*, 13(4),
216 8876-8887.
217

218 Serieys H (1992). Cytoplasmic effects on some agronomical
219 characters in sunflower. Proceedings of the 13th International Sunflower Conference,
220 2: 1245-1250.
221

222 Sharma HC; Gill BS (1982). Effect of embryo age and culture media on plant growth and
223 vernalization response in winter wheat. *Euphytica*, 31: 629-634.
224

225 Seguí-Simarro JM (2010). Androgenesis revisited. *Bot. Rev.* 76: 377-404.
226

227 Silva Neto JJ; Rêgo ERD; Nascimento MF; Silva Filho VAL; Almeida Neto JXD; Rêgo
228 MMD. (2014). Variability in a base population of pepper (*Capsicum annuum* L.).
229 *Revista Ceres*, 61(1), 84-89.
230

231 Stommel JR; Bosland PW (2006). Ornamental pepper. In: *Flower Breeding and Genetics*
232 (Anderson, ed.). Springer Netherlands, 561-599
233

234 Tamaki M; Urasaki N; Nakamura I; Motomura K; Adaniya S (2011). Shortening the
235 breeding cycle of papaya (*Carica papaya* L.) by culturing embryos treated with ethrel.
236 *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106, 225–233.
237

238 Tang F; Wang H; Chen S; Chen F; Liu Z; Fang W (2011). Intergeneric hybridization
239 between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. *Sci. Hortic.* 132,
240 1–6.
241

242 Torresán A; Kesteloot J; Castano F; Rodríguez R; Colabelli M (1996). Use of immature
243 seed germination technique as an alternative to *in vitro* culture of sunflower
244 (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Euphytica*, 91: 1-3.
245

246 Tukey HB (1933). Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hered.* 24, 7–12.
247

248 Veiling Holambra Cooperativa. Departamento de Qualidade e PósColheita. Disponível
249 em
250 <[http://www.veiling.com.br/uploads/padrao_qualidade/criterios/pimentaornamental](http://www.veiling.com.br/uploads/padrao_qualidade/criterios/pimentaornamental-po.pdf)
251 [-po.pdf](http://www.veiling.com.br/uploads/padrao_qualidade/criterios/pimentaornamental-po.pdf)>. Acesso em 04. Fev. 2016.
252

253 Vidigal, DDS, Dias DCFDS, Dias, LADS, Finger FL (2011). Changes in seed quality
254 during fruit maturation of sweet pepper. *Scientia Agricola*, 68(5), 535-539.
255

256 Wang, X.F., Wang, Y.X., Zhang, G.Y., Ma, Z.Y., 2011. An integrated breeding
257 technology for accelerating generation advancement and trait introgression in cotton.
258 *Plant Breeding* 130, 569–573.
259

260 Yeung EC; Sussex IM (1979). Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the suspensor and
261 the growth of the embryo-proper *in vitro*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 91(5),
262 423-433.
263

264 Yeung EC; Thorpe TA; Jensen CI (1981). *In vitro* fertilization and embryo rescue. In
265 *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*, ed. Thorpe, T.A. pp.
266 253-271. New York, Academic Press.
267

268 Yoon JB; Yang DC; Do JW; Park HG (2006). Overcoming two post-fertilization genetic
269 barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*
270 for introgression of anthracnose resistance. *Breed. Sci.* 56, 31–38.
271

272 Wainwright H, Marsh J (1986) The micropropagation of watercress (*Rorippa nasturtium-*
273 *aquaticum* L.). *J Hortic Sci* 61:251–256

274
275
276
277

ANEXOS

Anexo 1. Resumo da análise de variância para as características morfológica de plantas de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.) oriundas do cultivo *in vitro* de embriões zigóticos imaturos.

F.V	GL	QM										
		AP	APB	LDC	DCL	CF	LF	CLA	CLB	NA	NP	CDC
DAA(D)	3	1403.54 **	92.16 **	2714.37 **	2.15 **	318.06 **	28.83 **	10567.44 **	1631.60 **	178.74 **	178.18 **	20.14 **
Meio(M)	1	80.66 **	3.26 *	134.19 **	0.12 **	7.77 **	1.00 **	290.16 **	20.84 ns	9.58 **	8.76**	0.66 **
Genótipos(G)	2	54.04 **	2.78 *	181.45 **	0.17 **	8.64 **	1.02 **	1176.20**	176.35 **	20.58 **	21.77**	1.27 **
D x M	3	26.25 **	3.76 **	64.21 **	0.04 **	5.56 **	0.57 **	526.98 **	111.21 **	5.91 **	5.27 **	0.36 **
D x G	6	88.73 **	4.60 **	193.17 **	0.17 **	10.42 **	1.83 **	1201.45 **	162.95 **	15.96 **	16.90 **	1.55 **
M x G	2	34.57 **	3.89**	55.24 **	0.04 **	8.23 **	0.75 **	317.18**	59.63 *	4.30 **	4.60 **	0.48 **
D x M x G	6	47.72 **	2.53 **	81.63 **	0,05 **	6.43 **	0.78 **	323.35 **	64.62 **	6.22 **	6.54 **	0.64 **
CV (%)		13.04	33.92	15.15	12.87	9.44	7.85	12.45	23.44	7.18	6.87	9.11

F.V	GL	QM									
		LPT	NFP	PF	CF	MDF	MEDF	CDP	EPF	NS	TMS
DAA (D)	3	1.50 **	2544.70 **	100.46 **	68.05 **	21.58 **	5.95 **	12.03 **	0.86 ns	9562.60 **	1082.65 **
Meio (M)	1	0.04 **	102.09 ns	3.88 **	6.51 **	0.57 **	0.35 **	1.36 **	0.32 ns	1213.39 *	4.05 ns
Genótipos (G)	2	0.07 **	199.90 **	1.01 ns	3.20 **	1.31 **	0.40 **	1.93 **	0.36 ns	889.45 *	57.84 **
D x M	3	0.02 **	151.42 **	3.35 **	2.74 ns	0.47 **	0.22 **	0.97 **	0.50 ns	1421.80 **	40.88 **
D x G	6	0.14 **	168.43 **	12.29 **	4.89 **	2.11 **	0.70**	3.08 **	0.42 ns	1468.44 **	64.30 **
M x G	2	0.05 **	306.65 **	1.45 **	1.53 ns	0.46 **	0.44 **	1.26 **	0.32 ns	13.28.50 **	24.89 **
D x M x G	6	0.03 **	183.40 **	3.94 **	4.47 **	0.41 **	0.29 **	1.38 **	0.43 ns	913.60 **	20.77 **
CV (%)		10.59	37.15	26.72	49.42	12.51	18.02	21.11	357.96	38.24	23.04

278 AP = altura da planta (cm), APB = altura da primeira bifurcação (cm), LDC = largura da copa (cm), DCL = diâmetro do caule (cm), CDF = comprimento da folha com pecíolo
279 (cm) e LDF = largura da folha (cm). Os descritores de flor foram: NP = número de pétalas; NE = Número de estames; CDC = Comprimento da Corola e LDP = Largura da
280 pétala. Para fruto: PF = peso do fruto (g); CF = comprimento do fruto (cm); DF = diâmetro do fruto (cm); CDP = comprimento do pedúnculo (cm); EPF = espessura da parede

281 do fruto (cm); CP = comprimento da placenta (cm); NSF = número de sementes por fruto (un) e TMS = teor de matéria seca (%). . ns: não significativo; *, **: significativo a 5
 282 e 1% respectivamente

283 **Anexo 2.** Resumo da análise de variância para o ciclo de melhoramento de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L) a partir do cultivo *in*
 284 *vitro* de embriões zigóticos.

F.V	GL	QM			
		Fase II	Fase III	Fase IV	Total
DAA (D)	2	698.07**	1378.01 **	454.22 **	2693.01 **
Meio (M)	1	0 ns	0.01 ns	8.16ns	7.40 ns
Genótipos (G)	2	0.29 ns	1917.35**	1916.16 **	7573.68 **
D x M	2	0 ns	2.24 ns	20.22 ns	34.68 ns
D x G	4	6.07 **	1957.51 **	2168.05 **	8022.01 **
M x G	2	0 ns	0.57 ns	13.72 ns	10.24 ns
D x M x G	4	0 ns	8.12 ns	8.61 ns	4.18 ns
CV (%)		3.42	5.21	6.58	2.83

285 **Fase I:** da autofecundação até a obtenção das sementes (método convencional); **Fase II:** a partir de semeadura das sementes até o momento do transplântio, **Fase III:** a partir
 286 do transplântio até o início da antese, **Fase IV:** da antese a maturação dos três primeiros frutos. ns: não significativo; *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente
 287
 288
 289

290 **Anexo 3.** Resumo da análise de variância para o ciclo de melhoramento convencional em pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L)
 291

F.V	GL	QM				
		Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Total
Genótipos	2	51.26 **	22.06 ns	0.86 ns	18.57 ns	28.86 ns
CV(%)		3.87	5.36	10.72	6.67	3.69

292 **Fase I:** da autofecundação até a obtenção das sementes (método convencional); **Fase II:** a partir de semeadura das sementes até o momento do transplântio, **Fase III:** a partir
 293 do transplântio até o início da antese, **Fase IV:** da antese a maturação dos três primeiros frutos. ns: não significativo; *, **: significativo a 5 e 1% respectivamente
 294
 295