



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

WITALO DA SILVA SALES

INDUÇÃO DE POLIPLÓIDES EM PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)

AREIA

2024

WITALO DA SILVA SALES

INDUÇÃO DE POLIPLÓIDES EM PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração em Agricultura Tropical e linha de pesquisa em Biotecnologia, Melhoramento e Proteção de Plantas Cultivadas.

Orientador: Prof. (a) Dr. Mailson Monteiro do Rego

AREIA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S163i Sales, Witalo da Silva.

Indução de poliplóides em pimenteiras (*Capsicum*
spp.) / Witalo da Silva Sales. - Areia, 2024.
60 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Orizalina. 3. Trifluralina. 4.
Variabilidade genética. I. Rêgo, Mailson Monteiro do.
II. Título.

UFPB/CCA/BS

CDU 631/635(043.3)

WITALO DA SILVA SALES

INDUÇÃO DE POLIPLÓIDES EM PIMENTEIRAS (*Capsicum spp.*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração em Agricultura Tropical e linha de pesquisa em Biotecnologia, Melhoramento e Proteção de Plantas Cultivadas.

Aprovado em: 31/03/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / CCA
(Orientador)



Prof. Dr. Thiago Jardelino Dias
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / CCHSA
(Examinador)



Profa. Dra. Angeline Maria da Silva Santos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / CCA
(Examinadora)



Profa. Dra. Angela Maria dos Santos Pessoa
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)
(Examinadora)



Profa. Dra. Jéssica Soares Pereira
Universidade Federal Viçosa (UFV) / UCP
(Examinadora)

Aos meus pais, José Walter Sales de Lima e Wisla Barbosa da Silva Sales que sempre me impulsionaram a estudar e alcançar uma vida melhor através do esforço. A minha amada esposa, Valéria Alves, por estar ao meu lado me dando todo o suporte e amor necessários para que eu pudesse perseverar e atingir este objetivo. Aos meus irmãos, familiares, amigos, colegas, técnicos e professores que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu amado Deus pelo dom da vida, e por me dar força e esperança para lutar e alcançar com sua graça o título de doutor em agronomia.

Aos meus pais, Wisla Barbosa da Silva Sales e José Walter Sales de Lima por todo apoio, suporte e aconselhamento em todos os momentos dessa jornada. Aos meus irmãos, Wendell e Wyssylânya pelo incentivo ao longo de todo o período do doutorado.

Ao meu amor, Valéria Alves, por me apoiar nos momentos bons e ruins, por me incentivar quando eu estava desanimado. Além de compreender os momentos de ausência e valorizar os momentos que estávamos juntos ao longo desses quase quatro anos.

Aos amigos Jayane Karine, Fernanda Borges, Matheus, José Ayrton, Joabe Crispim e Sabrina que me auxiliaram nos experimentos e contribuíram para que o período que estive na UFPB fosse leve e feliz, meu muito obrigado a todos! Aos colegas de turma e laboratório que fizeram meus dias mais felizes.

Aos meus amigos e compadres de longa data, Jackson Teixeira e Nágela Mascarenhas, por compartilharem experiências e fornecerem auxílio nos momentos mais difíceis.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo e a Prof^a. Dr^a. Elizanilda Ramalho do Rêgo, pelo direcionamento e auxílio na condução do experimento, e por servirem de exemplo profissional como ótimos professores e pesquisadores.

A Universidade Federal da Paraíba-UFPB pela oportunidade de realização de um curso de doutorado qualificado no Nordeste brasileiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por fomentar uma bolsa de estudos e possibilitar que eu concluísse o doutorado em agronomia.

A todos que participaram deste trabalho de forma direta ou indireta contribuindo para o seu desenvolvimento.

A minha família de modo geral, por todo o apoio e dedicação que tiveram comigo, sempre torcendo pela minha vitória e felicidade.

Muito Obrigado!

*Há, na mente de Deus, um plano que abraça cada criatura de todos os seus imensos domínios; e esse plano é um propósito eterno de oportunidades sem fronteiras, de progresso ilimitado e vida eterna. A meta da eternidade está adiante e uma vitória certairá coroar os esforços de qualquer ser humano, nessa corrida de fé e confiança”
(32:5.7-8).*

RESUMO GERAL

As pimenteiras do gênero *Capsicum* tem grande importância alimentar, econômica, cultural e ornamental em todo o mundo. O presente trabalho investigou os potenciais efeitos fitotóxicos de agentes indutores de poliploidia em plantas (trifluralina e orizalina) sobre a emergência de quatro genótipos de pimenteiras (*Capsicum* spp.) e analisou a indução de poliplóides de *C. annuum* e das diferenças morfoanatômicas produzidas em relação aos controles diploides quando submetidas a concentrações e tempos de exposição distintos. Os dois capítulos resultaram da realização de dois experimentos com adoção do esquema fatorial triplo em delineamento inteiramente casualizado. Em ordem, os três fatores, compreenderam genótipos, concentrações de antimitóticos e tempos de exposição. A única diferença entre os dois experimentos, foi o agente indutor de poliploidia utilizado, orizalina no primeiro e trifluralina no segundo. **No capítulo I**, foram obtidas plântulas a partir dos tratamentos com os dois agentes antimitóticos. A trifluralina e orizalina foram fitotóxicas e causaram uma redução acentuada sobre a emergência de plantas para todos os genótipos em relação ao controle, sendo a trifluralina, mais fitotóxica. A velocidade de emergência é inversamente proporcional a concentração dos agentes antimitóticos. Doses superiores a 0,4% produziram poucas plântulas com menor tempo de emergência, possivelmente, seja um mecanismo de sobrevivência a toxidez dos agentes antimitóticos ou um indicativo de que ocorreu a indução de poliplóides. **No capítulo II**, houveram interações significativas entre os fatores em estudo para sobrevivência de plântulas ao nível de 1% de probabilidade nos dois experimentos. Foram induzidas duas plantas tetraplóides e uma triplóide de *C. annuum* com o uso da orizalina como agente indutor, enquanto a trifluralina mostrou-se ineficiente na indução de poliplóides em pimenteiras nas condições experimentais testadas. Os poliplóides apresentaram área estomática (μm^2), comprimento e largura dos estômatos (μm) maiores que os diploides correspondentes, e por conseguinte, menor densidade estomática. O aumento na espessura da foliar (μm) e no número de cloroplastos por célula-guarda são marcadores da indução de poliploidização em *C. annuum*. A orizalina mostrou-se eficiente na indução de poliplóides em *C. annuum* quando suas sementes são imersas em soluções de 0,1% por 48 e 72 horas (h) para UFPB-001 e UFPB-004, respectivamente, ea 0,2% por 48h na cultivar Floribela.

Palavras-chave: orizalina; trifluralina; fitotoxicidade; indução de poliplóides.

GENERAL ABSTRACT

Peppers (*Capsicum* spp.) have great food, economic, cultural and ornamental importance worldwide. The present work investigated the potential phytotoxic effects of plant polyploidy-inducing agents (trifluralin and oryzalin) on the emergence of four pepper genotypes (*Capsicum* spp.) and analyzed the induction of *Capsicum annuum* polyploids and the morphoanatomical differences produced in relation to the diploid controls subjected to different concentrations and exposure times. In the two chapters, two experiments were carried out with the adoption of a triple factorial scheme in a completely randomized design. The first factor studied were the genotypes, the second the concentrations of antimitotics (%) and the third the exposure times (hours). The only difference between the two experiments was the polyploidy-inducing agent used, oryzalin in the first and trifluralin in the second. In Chapter I, seedlings were obtained from treatments with the two antimitotic agents. Trifluralin and oryzalin showed a phytotoxic effect and caused a marked reduction in plant emergence for all genotypes compared to the control, however, trifluralin is more phytotoxic. Cultivar Floribela is more tolerant to the toxic effect of oryzalin when compared to the other genotypes, however, it was more sensitive to trifluralin in this comparison. The emergence speed was reduced as the agent concentration increased. Higher doses (0.4%) produce few seedlings, but these emerge in fewer days as a dispersion mechanism of oryzalin and trifluralin toxicity. In chapter II, there were significant interactions between the factors under study for seedling survival at the 1% probability level in both experiments. Two tetraploids and one triploid of *C. annuum* were formed with the use of oryzalin as inducing agent, however, there was no polyploidization from trifluralin in the experimental conditions tested. The polyploids presented a stomatal area (μm^2), length and width of the stomata (μm) greater than the corresponding diploids, consequently, they presented a lower stomatal density. The increase in leaf thickness (μm) and the number of chromosomes per guard cell is a good indicator of polyploidization in *C. annuum*. Oryzalin is an effective polyploidy inducer from *C. annuum* seeds immersed in 0.1% solutions for 48 and 72 hours (h) for UFPB-001 and UFPB-004, respectively, and 0.2% for 48h in the Floribela cultivar.

Keywords: oryzalin; trifluralin; phytotoxicity; polyploid induction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 ORIGEM E DIVERSIDADE DE PIMENTEIRAS.....	9
1.2 POLIPLOIDIA ARTIFICIAL.....	10
2 REFERÊNCIAS	13
3 ARTIGO 1 - INFLUÊNCIA DE ORIZALINA E TRIFLURALINA SOBRE A EMERGÊNCIA DE PIMENTEIRAS (<i>CAPSICUM SPP.</i>)	16
4 INTRODUÇÃO.....	17
5 MATERIAL E MÉTODOS	18
6 RESULTADOS	19
6.1 EXPERIMENTO I.....	20
6.2 EXPERIMENTO - II.....	25
7 DISCUSSÃO.....	29
7.1 EXPERIMENTO I.....	29
7.2 EXPERIMENTO II.....	30
8 CONCLUSÃO.....	32
9 AGRADECIMENTOS.....	32
10 REFERÊNCIAS	32
ARTIGO 2.....	37
11 ARTIGO 2 - INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLÓIDES EM PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (<i>CAPSICUM ANNUUM L.</i>).....	37
12 INTRODUÇÃO.....	38
13 MATERIAL E MÉTODOS	39
14 RESULTADOS	42
15 DISCUSSÃO.....	52
16 CONCLUSÃO	54
17 REFERÊNCIAS	55
18 ANEXOS.....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ORIGEM E DIVERSIDADE DE PIMENTEIRAS

As pimenteiras (*Capsicum* spp.) são originárias da América Central e do Sul, e pertencem a família botânica das Solanáceas (Heiser 1979; Grubben & El Tahir, 2004). Existem 38 espécies que compõem o gênero *Capsicum* segundo a Rede de Informação de Recursos de Germoplasma (GRIN, 2023), contudo, apenas cinco espécies são domesticadas: *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. pubescens* Ruiz & Pav. e *C. baccatum* L. (Dagnoko et al., 2013). Existe uma grande diversidade genética do gênero *Capsicum* e isto se reflete em uma abundante variação fenotípica entre os acessos de pimenteiras existentes (Zonneveld et al., 2015; Fortunato et al., 2019).

Há no Brasil uma grande diversidade genética de pimenteiras, entre genótipos introduzidos, desenvolvidos e plantas silvestres. Em virtude da grande variabilidade existente são necessários mais estudos focados na compreensão das exigências culturais desses genótipos e seus ciclos de crescimento. Assim, o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a diversos tipos de estresses bióticos e abióticos facilita o manejo e impulsiona a aquisição de novos cultivares pelo mercado consumidor (Grossi et al., 2003).

As pimenteiras, ao serem introduzidas na Europa no século XV, tinham como principal aptidão seu uso como plantas ornamentais e sua utilização como fonte de alimento era uma aptidão secundária (Stommel e Griesbach, 2005). As pimenteiras foram conhecidas por muito tempo como pimentas de Natal, pois eram um presente comum no período natalino até a década de 60, aproveitando a atratividade do formato e cores dos seus frutos (Hammer, 1980). Atualmente se destacam pelo uso paisagístico e produtivo das cultivares existentes com uma acentuada ascensão no mercado de plantas ornamentais no Brasil e no Mundo (Ari et al., 2016).

A compreensão do controle genético das características morfológicas é imprescindível para o sucesso dos programas de melhoramento genético de pimenteiras, em função da variabilidade fenotípica existente e da ampla versatilidade de usos das espécies e cultivares disponíveis, visando atender as preferências dos consumidores (Pessoa et al., 2019). As pimenteiras com potencial ornamental possuem alto valor agregado, em função de apresentar dupla finalidade de uso: a primeira está relacionada a sua utilização como planta ornamental e, a segunda, ao seu rendimento e consumo (Finger et al., 2012; Rêgo e Rêgo, 2016).

1.2 POLIPLOIDIA ARTIFICIAL

A poliploidia é um dos principais mecanismos que influenciam no processo evolutivo de plantas, atuando na formação de novas espécies e na ampliação da variabilidade existente, através do imediato isolamento reprodutivo entre genitores via poliploidização (SILVEIRA, 2014). Etimologicamente, a palavra poliplóide, significa indivíduo que possui vários conjuntos cromossômicos, isto é, a presença de três ou mais conjuntos haplóides no mesmo núcleo (Buggs et al., 2011).

Os poliplóides são divididos em euplóides e aneuplóides. Os euplóides são classificados em autopoliploides, alopoliplóides e segmentares. O primeiro tipo são os poliplóides produzidos pela duplicação do próprio genoma do indivíduo (autopoliplóides). A segunda forma (alopoliplóides) é possibilitada pela duplicação de genomas distintos contidos em híbridos interespecíficos (Schifino-Wittman, 2004). Os poliplóides segmentares são aqueles originados pela duplicação genômica dos conjuntos cromossômicos próximos o suficiente para permitir algum pareamento, seja ele de maior ou menor nível (Stebbins, 1971). Os aneuplóides são caracterizados por apresentar alterações cromossômicas numéricas, havendo um maior ou menor número de cromossomos em comparação com o cariótipo base da espécie (Pringle & Murray, 1992).

A formação de poliplóides ocorre naturalmente em virtude da formação de gametas não reduzidos ($2n$) na gametogênese, entretanto, faz-se necessário o uso de produtos químicos que impedem o processo mitótico em diversos explantes (células, tecidos, sementes, entre outros) para aumentar a eficácia desta técnica em programas de melhoramento genético. Os agentes antimitóticos impedem a formação das fibras de fuso ao interferir na polimerização da tubulina necessária para a separação dos cromossomos homólogos duplicados durante a interfase, e assim, impede o processo mitótico e, por conseguinte, a formação de células com o número de cromossomos duplicados (Eeckhaut et al., 2018).

A produção de poliplóides é uma estratégia de grande importância para o melhoramento genético de plantas, pois geralmente a poliploidização aumenta a tolerância de plantas a ambientes adversos e produz diversas variações morfológicas, que podem ser benéficas ou não (Wang et al., 2020). O uso de sementes como material vegetal para a indução artificial de poliplóides é utilizada em espécies do gênero *Capsicum* desde o início do século 20 (Pal & Ramanujam, 1939) e ainda hoje apresenta uma elevada taxa de sucesso, principalmente por possibilitar a formação

de muitos genótipos autopoliplóides com grande heterozigosidade de locos gênicos que leva a novas variações fenotípicas (Bingham et al. 1994; Eliášová et al., 2014; Pozo e Ramirez-Parra 2014; Bharadwaj, 2015; Wang et al., 2020).

Um dos problemas ao usar sementes como explantes é o efeito fitotóxico dos agentes antimitóticos sobre os parâmetros de vigor das sementes, dentre eles o teste de emergência (Mo et al., 2020), o qual é realizado a partir da contagem das sementes emergidas diariamente, e esses dados coletados permitem a estimativa da porcentagem de plantas emergidas, do índice de velocidade de emergência (Maguire, 1962) e do tempomédio de emergência. Ainda assim, vários outros índices podem ser estimados a partir dessas informações, e isso possibilita a realização de novas inferências sobre a emergência de plantas (Silva, Medeiros & Oliveira, 2019).

Há alguns relatos na literatura sobre a indução de poliplóides no gênero *Capsicum*, particularmente em *C. annuum* usando colchicina (Kulkarni & Borse, 2010; Selvakumaret al., 2022), porém usando orizalina e trifluralina, são inexistentes. A colchicina é um agente antimitótico muito utilizado na indução de poliploidia em diversas espécies da família solanácea como a *Solanum lycopersicum* (Cola et al., 2014), *C. frutescens* (Pliankong et al., 2017) *C. annuum* (Selvakumar et al., 2022), contudo, a elevada toxidez aos explantes, ao meio ambiente, aos seres humanos e outros animais tem levado a uma procura por substâncias alternativas de menor potencial tóxico e de maior eficácia, dentre as alternativas, já foram reportadas a orizalina e a trifluralina (Mir et al., 2021).

A utilização de produtos antimitóticos como indutores de poliploidização também já foram reportados em mais de 70 espécies de interesse comercial (Touchell et al., 2020), dentre elas, *Passiflora edulis* Sims. (Rêgo et al., 2011), *Cannabis sativa* (Parsons et al., 2019), *Bletilla striata* (Pan-pan et al., 2018), *Populus hopeiensis* (2020). A eficiência na duplicação cromossômica usando agentes despolimerizantes de -tubulina dependem de alguns fatores, tais como o tipo de agente indutor, sua concentração, tempo de exposição, tipo explante e espécie utilizada (Dhooghe et al., 2011; Eeckhaut et al., 2018, Touchell et al., 2020).

Estudos demonstram que orizalina e trifluralina possuem uma menor toxicidade, maior afinidade com as tubulinas vegetais e eficácia superior na indução de poliplóides com o uso de menores doses em comparação com a colchicina (Touchell et al., 2020), tornando-as mais viáveis economicamente do que a colchicina (Ahmadi & Ebrahimzadeh, 2020).

Esta tese é composta de dois capítulos. No primeiro capítulo, foram avaliados os efeitos fitotóxicos da orizalina e trifluralina sobre a emergência de plântulas de quatro genótipos de pimenteiras e, no segundo capítulo, foram avaliadas as características morfo-anatômicas e citogenéticas de *Capsicum annuum* obtidas a partir dos tratamentos, objetivando recomendar o melhor protocolo para indução de poliplóides em *C. annuum* e de comparar as características de indivíduos diplóides com as dos poliplóides.

2 REFERÊNCIAS

- AHMADI, B.; EBRAHIMZADEH, H. In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant cell reports**, v. 39, n. 3, p. 299-316, 2020.
- AMIRI, S.; KAZEMITABAAR, S. K.; RANJBAR, G.; AZADBAKHT, M. The effect of trifluralin and colchicine treatments on morphological characteristics of jimsonweed (*Datura Stramonium* L.). **Trakia journal of sciences**, v. 8, n. 4, p. 47-61, 2010.
- ARI, E.; YILDIRIM, T.; MUTLU, N.; BÜYÜKALACA, S.; GÖKMEN, Ü.; AKMAN, E. Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 40, n. 4, p.944-954, 2016.
- BUGGS, R. J.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Biosystematic relationships and the formation of polyploids. **Taxon**, v. 60, n. 2, p. 324-332, 2011.
- SELVAKUMAR, R.; MANJUNATHAGOWDA, D. C.; SINGH, P. K. Capsicum: Breeding Prospects and Perspectives for Higher Productivity. **Capsicum-New Perspectives**, 2022.
- COLA, G. P. A.; MARQUES, A. M.; DAMASCENO, S.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. In Vitro Polyploidization in *Solanum lycopersicum* Mill. 'Santa Cruz Kada Gigante'. **Cytologia**, v. 79, n. 3, p. 351-358, 2014.
- DAGNOKO, S.; YARO-DIARISSO, N.; SANOGO, P. N.; ADETULA, O.; DOLO-NANTOUMÉ, A.; GAMBY-TOURÉ, K.; TRAORÉ-THÉRA, A.; KATILÉ, S.; DIALLO-BA, D. Overview of pepper (*Capsicum* spp.) breeding in West Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 13, p. 1108-1114, 2013.
- DHOOGHE, E.; VAN LAERE, K.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; VAN HUYLENBROECK, J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 104, p. 359-373, 2011.
- EECKHAUT, T.; VEKEN, J. V. D.; DHOOGHE, E.; LEUS, L.; LAERE, K. V.; HUYLENBROECK, J. V. Ploidy breeding in ornamentals. **Ornamental Crops**, p. 145-173, 2018.
- FORTUNATO, F. L. G.; RÊGO, E. R.; CARVALHO, M. G.; SANTOS, C. A. P.; RÊGO, M. M. Genetic diversity in ornamental pepper plants. **Comunicata Scientiae**, v.10, n. 3, p. 364-375, 2019.
- GROSSI, J. A. S.; MORAES, P. J.; TINOCO, S. A.; BARBOSA, J. G.; FINGER, F. L.; CECON, P. R. Effects of paclobutrazol on growth and fruiting characteristics of Pitanga ornamental pepper. In: **V International Symposium on New Floricultural Crops 683**. 2003. p. 333-336.
- GRUBBEN, G. J. H.; EL TAHIR, I. M. *Capsicum annuum* L. In: Grubben, GJH & OA Denton (eds.). **Vegetables**. Prota, 2004.

HAMMER, P. A. Other flowering pot plants. In: **Introduction to floriculture**. Academic Press, 1980. p. 435-475.

HEISER JR, C. B. Peppers— *Capsicum* (Solanaceae). In: Evolution of crop plants. **Experimental Agriculture**, v. 15, n. 4, p. 265–273, 1979.

MIR, R.; CALABUIG-SERNA, A.; SEGUÍ-SIMARRO, J. M. Doubled haploids in eggplant. **Biology**, v. 10, n. 7, p. 685, 2021.

PESSOA, A. M. S.; RÊGO, E. R.; SANTOS, C. A. P.; CARVALHO, M. G.; RÊGO, M. M. Inheritance of seedling and plant traits in ornamental pepper (*Capsicum annuum*). **Genetics and Molecular Research**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2019.

PLIANKONG, P.; SUKSA-ARD, P.; WANNAKRAIROJ, S. Effects of Colchicine and Oryzalin on Polyploidy Induction and Production of Capsaicin in *Capsicum frutescens* L. **Thai Journal of Agricultural Science**, n. 50, v. 2, p. 108-120, 2017.

PRINGLE, G. J.; MURRAY, B. G. Polyploidy and aneuploidy in the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Solanaceae). I. Spontaneous polyploidy and features of the euploids. **Plant breeding**, v. 108, n. 2, p. 132-138, 1992.

RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M. Genetics and Breeding of Chili Pepper *Capsicum* spp. **Production and breeding of chilli peppers**, p. 57-80, 2016.

Roughani A, Miri SM, Kashi AK and Naserian Khiabani B, 2017. Increasing the ploidy level in spinach (*Spinacia oleracea* L.) using mitotic inhibitors. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 18(3&4): 124-130.

SILVA, L. J. D.; MEDEIROS, A. D. D.; OLIVEIRA, A. M. S. SeedCalc, a new automated R software tool for germination and seedling length data processing. **Journal of Seed Science**, v. 41, p. 250-257, 2019.

SILVEIRA, R. M. **Citogeografia de Eugenia L. (Myrtaceae Juss.) na região Leste do Brasil**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

STEBBINS, G. L. Chromosomal evolution in higher plants. **Chromosomal evolution in higher plants**, 1971. 216p.

STOMMEL, J. R.; GRIESBACH, R. J. *Capsicum annuum* L. Black Pearl'. **HortScience**, v. 40, n. 5, p. 1571, 2005.

TALEBI, S. F.; SAHARKHIZ, M. J.; KERMANI, M. J.; SHARAFI, Y.; RAOUF FARD, F. Effect of different antimetabolic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). **Caryologia**, v. 70, n. 2, p. 184-193, 2017.

TOUCHELL, D. H.; PALMER, I. E.; RANNEY, T. G. In vitro ploidy manipulation for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 517580, 2020.

USDA, ARS, Programa Nacional de Recursos Genéticos. **Rede de Informação de Recursos de Germoplasma (GRIN)**. Laboratório Nacional de Recursos de Germoplasma, Beltsville, Maryland. Disponível: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search>. Acesso em 19 de março de 2023.

WANG, L. J.; ZHANG, Q.; CAO, Q. Z.; GAO, X.; JIA, G. X. An efficient method for inducing multiple genotypes of tetraploids *Lilium rosthornii* Diels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 141, p. 499-510, 2020.

MO, L.; CHEN, J.; CHEN, F.; XU, Q.; TONG, Z.; HUANG, H.; DONG, R.; LOU, X.; LIN, E. Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. **Journal of integrative agriculture**, v. 19, n. 8, p. 2016-2026, 2020.

BINGHAM, E. T.; GROOSE, R. W.; WOODFIELD, D. R.; KIDWELL, K. K. Complementary gene interactions in alfalfa are greater in autotetraploids than diploids. **Crop science**, v. 34, n. 4, p. 823-829, 1994.

Eliášová, A.; Trávníček, P.; Mandák, B.; Münzbergová, Z. (2014). Autotetraploids of *Vicia cracca* show a higher allelic richness in natural populations and a higher seed set after artificial selfing than diploids. **Annals of botany**, v. 113, n. 1, p. 159-170, 2014.

DEL POZO, J. C.; RAMIREZ-PARRA, E. Deciphering the molecular bases for drought tolerance in *A. rabidopsis* autotetraploids. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 12, p. 2722-2737, 2014.

ZONNEVELD, M. V.; RAMIREZ, M.; WILLIAMS, D. E.; PETZ, M.; MECKELMANN, S.; AVILA, T.; BEJARANO, C.; RÍOS, L.; PEÑA, K.; JÄGER, M.; LIBREROS, D.; AMAYA, K.; SCHELDEMAN, X. Screening genetic resources of *Capsicum* peppers in their primary center of diversity in Bolivia and Peru. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0134663, 2015.

PAL, B. P.; RAMANUJAM, S. Induction of polyploidy in chilli (*Capsicum annum* L.) by colchicine. **Nature**, v. 143, n. 3615, p. 245-246, 1939.

3 ARTIGO 1

INFLUÊNCIA DE ORIZALINA E TRIFLURALINA SOBRE A EMERGÊNCIA DE PIMENTEIRAS (*Capsicum* spp.)

Resumo

Pimenteiras (*Capsicum* spp.) tem grande importância alimentar, econômica e cultural em vários países. Este trabalho investigou os efeitos fitotóxicos de agentes indutores de poliploidia (trifluralina e orizalina) sobre a emergência de plântulas em pimenteiras de quatro genótipos: UFPB-001, UFPB-004, Floribela e Biquinho. As sementes foram submetidas a cinco concentrações (0.00, 0.05, 0.10, 0.20 e 0.40%) de cada agente antimitótico em quatro tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas). Foram obtidas plântulas a partir dos tratamentos com os dois agentes antimitóticos. A trifluralina e orizalina apresentaram efeitos fitotóxicos e causaram redução acentuada da emergência de plantas nos quatro genótipos avaliados, quando comparados ao controle, com toxicidade superior da trifluralina. A cultivar 'Floribela' é mais tolerante ao efeito tóxico da orizalina e mais sensível a trifluralina, quando comparada aos demais genótipos. A velocidade de emergência é inversamente proporcional a concentração dos agentes antimitóticos. O número de plântulas produzidas foi inferior na dosagem de 0,4% para os dois agentes antimitóticos utilizados, acompanhado da redução no tempo de emergência, como possível estratégia de sobrevivência da planta quando submetida a toxicidade destes agentes.

Palavras-Chave: pimenteira; agente antimitótico; fitotóxicidade.

Abstract

Pepper plants (*Capsicum* spp.) are of great food, economic and cultural importance in several countries. This study investigated the phytotoxic effects of polyploidy-inducing agents (trifluralin and orizalin) on the emergence of seedlings in pepper plants of four genotypes: UFPB-001, UFPB-004, Floribela and Biquinho. The seeds were subjected to five concentrations (0.00, 0.05, 0.10, 0.20 and 0.40%) of each antimitotic agent and four exposure times (24, 48, 72 and 96 hours). Seedlings were obtained from the treatments with the two antimitotic agents. Trifluralin and orizalin showed phytotoxic effects and caused a marked reduction in plant emergence in the four genotypes evaluated, when compared to the control, with trifluralin being more toxic. The cultivar 'Floribela' is more tolerant to the toxic effect of orizalin and more sensitive to trifluralin when compared to the other genotypes. The speed of emergence is inversely proportional to the concentration of the antimitotic agents. The number of seedlings produced was lower at the 0.4% dosage for the two antimitotic agents used, accompanied by a reduction in emergence time, as a possible survival strategy for the plant when subjected to the toxicity of these agents.

Keywords: pepper plants; antimitotic agent; phytotoxicity.

4 INTRODUÇÃO

As diversas espécies de pimenteiras existentes têm como centro de origem a América Central e do Sul, e todas pertencem ao gênero *Capsicum* e a família botânica Solanaceae. Atualmente existem 38 espécies catalogadas deste gênero, as domesticadas, são: *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. pubescens* Ruiz & Pav. e *C. baccatum* L. (Heiser, 1979; Grubben & El Tahir, 2004; Dagnoko et al., 2013; Cansian Júnior et al., 2021). As pimenteiras possuem uma ampla variabilidade fenotípica para os seus caracteres morfoagronômicos, principalmente em relação aos frutos (cor, forma e tamanho) (Bianchi et al., 2016), a arquitetura da planta (porte, hábito de crescimento e formato da copa) e a folhagem (tonalidade, forma e textura) (Stummel & Bosland, 2007; Melo et al., 2014), e isso demonstra aptidão para o desenvolvimento de novas cultivares de produção e/ou ornamentais.

A ampliação da variabilidade disponível, é um dos objetivos recorrentes nos diversos programas de melhoramento de espécies de plantas (Xia et al., 2020, Tracy et al., 2020, Rodrigues et al., 2023), assim, algumas substâncias, dentre elas, os herbicidas são eventualmente usados para este fim. Os herbicidas são produtos químicos que possuem uma toxidez capaz de eliminar plantas daninhas das lavouras, no entanto, alguns destes produtos, como a orizalina e a trifluralina, pertencem ao grupo das dinitroanilinas, e atuam como inibidores da formação de microtúbulos durante a mitose (Chen et al., 2021), e por este motivo, são utilizados como agentes indutores de poliploidia em diversas espécies de plantas (Trojak-Goluch, Kawka-Lipińska, Wielgusz & Praczyk, 2021).

Os agentes indutores de poliploidia possuem uma toxidez variável sobre as células, tecidos e processos metabólicos de plantas, e esse efeito tóxico depende de alguns fatores, por exemplo, o tipo de antimitótico utilizado, sua concentração, tempo de exposição, tipo de explante e o genótipo (Dhooghe, Laere, Eeckhaut, Leus & Huylenbroeck, 2011; Eeckhaut et al., 2018), essa combinação não pode ser letal para permitir a obtenção de indivíduos poliplóides. Diferentes tipos de explantes já foram utilizados na indução de poliplóides *in vitro*, dentre eles citam-se: segmentos de hipocótilo em *Passiflora edulis* Sims (Rego, Rego, Bruckner, Finger & Otoni, 2011), pequenos brotos nodais em *Pfaffia glomerata* (Gomes et al., 2014), meristema apical em *Agastache foeniculum* L. (Talebi, Saharkhiz, Kermani, Sharafi, & Fard, 2017), e sementes de *Taraxacum kok-saghyz* (Luo, Iaffaldano & Cornish, 2018).

Existem vários outros estudos empregando a colchicina como agente indutor de poliploidia a partir de sementes em *C. annuum* na cultivar (cv.) Chilli (Pal & Ramanujam, 1939), na cv. Cerasiformes (Rao & Kumar, 1981; Panda, Kumar & Rao, 1984) e cv. Katokkon (Tammu, Nuringtyas & Daryono, 2021), em *C. frutescens* cv. Cayenne (Amanah, Arumingtyas & Indriyani, 2016) e cv. Lion trademark (Pliankong, Suksa-Ard & Wannakraijoj, 2017), contudo, são escassos os estudos sobre o uso de agentes indutores de poliploidia em plantas do gênero *Capsicum* com outros agentes indutores de poliploidia sobre os efeitos tóxicos desses produtos em sementes.

Um dos problemas ao usar sementes como explantes é o efeito fitotóxico dos agentes antimitóticos sobre os parâmetros de vigor das sementes, dentre eles o teste de emergência (Mo et al., 2020). Ainda assim, vários outros índices podem ser

estimados a partir dessas informações, e isso possibilita a realização de novas inferências sobre a emergência de plântulas (Silva, Medeiros & Oliveira, 2019). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de agentes antimitóticos, doses e tempos de exposição sobre parâmetros de emergência de sementes em espécies de *Capsicum*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), localizada na Cidade de Areia – PB (6°57'42" S, 35°41'43" W, 573 metros de altitude), Brasil. Foram utilizados quatro genótipos de duas espécies do gênero *Capsicum*. Os acessos UFPB-001, UFPB-004 do Banco de Germoplasma da UFPB e a cultivar comercial Floribela da Feltrin® pertencentes a espécie *C. annuum*, e a cultivar Biquinho da Feltrin® é da espécie *C. chinense*.

Foram realizados dois experimentos, no primeiro experimento utilizou-se a orizalina e, no segundo, a trifluralina como agente antimitótico. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo 4x5x4, totalizando 80 tratamentos com 5 repetições e 400 parcelas experimentais. O primeiro fator foram os genótipos (UFPB-001, UFPB-004, cultivar (cv) Floribela e cv Biquinho), o segundo as concentrações (0.0%, 0.05%, 0.1%, 0.2% e 0.4% de orizalina) e o terceiro os tempos de exposição ao agente anti-mitótico (24, 48, 72 e 96 horas).

As sementes foram imersas em microtubos Eppendorff de 2mL contendo 1000µL de cada tratamento (Figura 1). Ao atingir o tempo de exposição respectivo, as sementes foram retiradas das soluções, secas em papel toalha e em seguida semeadas em bandejas de poliestireno de 200 células com substrato Plantmax®. As bandejas foram regadas diariamente, no período matinal, com a saturação do solo para manutenção da umidade adequada a emergência das plântulas. As contagens de emergência diária foram iniciadas no sétimo dia após a semeadura (DAS) e finalizada no vigésimo primeiro dia.

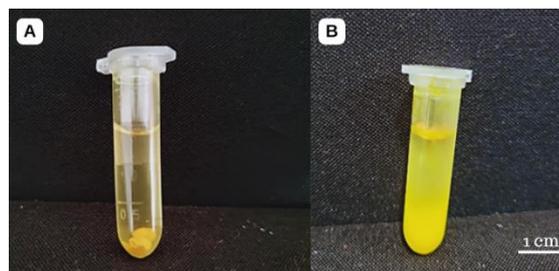


Figura 1: Exposição das sementes de *Capsicum* ssp. aos agentes antimitóticos. (A) Orizalina e (B) Trifluralina.

A emergência de plântulas (EP, em %) foi estimada pela seguinte equação (ISTA, 2015):

$$EP = \left(\frac{n}{N} \right) \times 100$$

onde: n é o número de sementes emergidas, e N é o número total de sementes.

O índice de velocidade de emergência (IVE, adimensional) foi estimado conforme Maguire (1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^k (ni/ti)$$

onde: n_i é o número de sementes emergidas em cada dia de contagem diária até a última contagem, e t_i é o número de dias após o início do teste em cada contagem.

O tempo médio de emergência (TME, em dias) foi estimado pela equação proposta por Labouriau (1983):

$$TME = \frac{\sum_{i=1}^k ni \times ti}{\sum_{i=1}^k ni}$$

onde: n_i é o número de sementes emergidas por dia (não o número acumulado, mas o número correspondente à i -ésima observação), e t_i é o tempo desde o início do teste de emergência até a i -ésima observação.

Os dados foram submetidos a transformação de $(x + 0,5)^{1/2}$ e analisados estatisticamente com software R Studio® e o pacote “ExpDes.pt” para a análise de variância, teste de média de Scott-Knott e análise de regressão ao nível de 5% de probabilidade. Os gráficos foram elaborados no Excel 2021® e no SigmaPlot 10.0®.

6 RESULTADOS

A trifluralina reduziu a emergência de plântulas quando comparada ao controle para todos os genótipos avaliados (Figura 2). As médias de plantas emergidas foram de 78,75%, 36,56% e 15,68% para o controle, a orizalina e a trifluralina, respectivamente, revelando queda acentuada da emergência quando se compara o controle aos agentes indutores de poliploidia. Na comparação com o controle, a trifluralina foi altamente prejudicial à emergência de plântulas para todos os genótipos, enquanto a orizalina reduziu drasticamente a emergência de plântulas dos genótipos UFPB-001 e UFPB-004. Dessa forma, as cultivares comerciais Floribela (*C. annuum*) e Biquinho (*C. chinense*) foram mais tolerantes aos efeitos fitotóxicos da orizalina.

Na figura 2, observa-se que a emergência variou de 70% a 95% no controle para os quatro genótipos avaliados, contudo, apenas a cultivar Floribela diferiu estatisticamente dos demais genótipos, apresentando a maior emergência de plântulas (%). O genótipo mais sensível a fitotóxicidade por orizalina foi o UFPB-004 seguido do UFPB-001, enquanto, a trifluralina ocasionou uma inibição de mesma ordem sobre a emergência de plântulas em todos os genótipos (Figura 2). Com base no desvio padrão, apenas o acesso UFPB-004 não diferiu estatisticamente no seu comparativo entre orizalina e trifluralina, ou seja, este genótipo foi afetado em mesmo nível para os dois antimetabólitos, contudo, o genótipo UFPB-001, e as cultivares Floribela e Biquinho foram mais sensíveis a toxicidade por trifluralina (Figura 2).

Na figura 2 fica evidente que a orizalina e trifluralina foram prejudiciais a emergência de de plântulas de pimenteiras (*Capsicum* spp.), entretanto, a trifluralina apresentou efeito fitotóxico superior a orizalina neste comparativo.

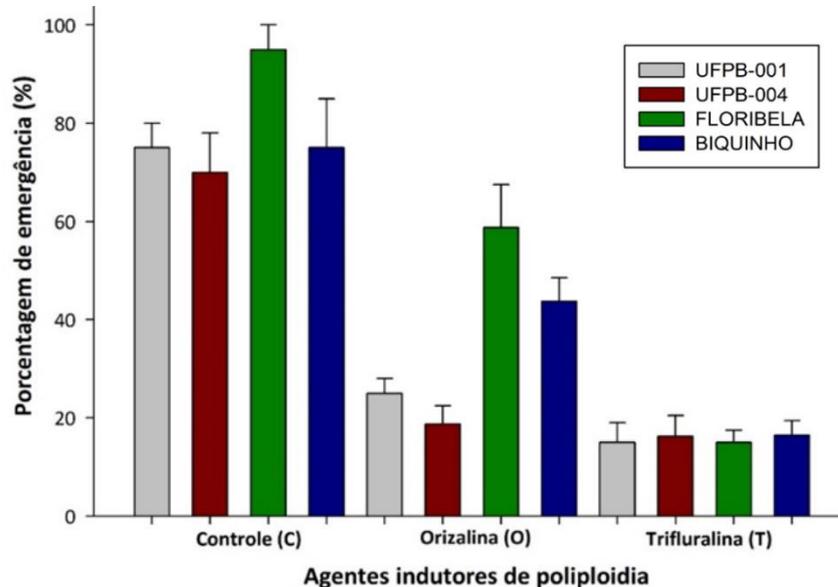


Figura 2: Efeito fitotóxico de trifluralina e orizalina quando comparados ao controle sobre a porcentagem de plantas emergidas de quatro genótipos de duas espécies de pimenteiras.

6.1 EXPERIMENTO I

Não houve interação tripla significativa entre genótipos, concentrações e tempos de exposição, quando se usou orizalina (Tabela 1). Por outro lado, houve interação dupla entre genótipos e concentrações de orizalina para a emergência de plântulas (EP) e índice de velocidade de emergência (IVE) (Tab. 1).

Tabela 1. Análise de variância para emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME) de quatro genótipos de pimenteiras submetidos a orizalina.

FV	GL	EP	IVE	TME
Genótipo (G)	3	0,73**	0,10**	8,52**
Concentração (C)	4	1,57**	0,22**	17,34**
Tempo de Exposição (T)	3	0,31**	0,03*	5,73**
G x C	12	0,09*	0,02**	1,55 ^{ns}
G x T	9	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,20 ^{ns}
C x T	12	0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,15 ^{ns}
G x C x T	36	0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,19 ^{ns}
Resíduo	320	0,04	0,01	0,99
Total	399	-	-	-
CV (%)		21,94	12,30	62,32

Legenda: *Significância estatística ao nível de 5% de probabilidade, **Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade e ^{ns}Não significativo ($p>0,05$).

Ao analisar os dados isoladamente, genótipo (G), concentração (C) e tempo de exposição (T) ao agente antimetabólico, observa-se que houve diferenças significativas para todas as características avaliadas (Tab. 1).

O genótipo UFPB-004 apresentou maior sensibilidade a toxicidade por orizalina, pois ocorreu uma queda marcante já na dose de 0,05%, no entanto, as doses de 0,1% e 0,2% foram mais fitotóxicas e causaram perdas significativas para todos os genótipos, com exceção da Floribela (Tabela 2). A concentração de 0,4% de orizalina influenciou negativamente a emergência de plântulas de pimenteiras, pois nenhum dos genótipos atingiu taxas de emergência superiores a 20% (*Capsicum* spp.) nestas condições.

Tabela 2. Desdobramento da interação dos genótipos dentro de cada nível do fator concentração de orizalina sobre a emergência de plântulas (EP)

Genótipo	Concentração (%)				
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,40
UFPB-001	75,00				
	a	60,00 a	25,00 b	10,00 c	5,00 a
UFPB-004	70,00				
	a	25,00 b	40,00 b	5,00 c	5,00 a
FLORIBELA	95,00				10,00
	a	90,00 a	70,00 a	65,00 a	a
BIQUINHO	75,00				20,00
	a	75,00 a	45,00 b	35,00 b	a

Legenda: Letras diferentes na coluna representam diferença estatística significativa ($p<0,05$). Letras iguais na coluna representam diferença não significativa ($p>0,05$).

O aumento do tempo de exposição também reduziu a emergência de plântulas (%) tratadas com orizalina independente da concentração adotada (Tabela 1). Houve interação significativa entre genótipos e concentrações de orizalina ao nível de 1% de probabilidade para o índice de velocidade de emergência (IVE) (Tabela 3).

Todos os genótipos foram iguais estatisticamente na concentração controle (0,00%), exceto a cv. Floribela, que apresentou uma maior velocidade para emergência de plântulas (Tabela 3). Os genótipos UFPB-001 e Floribela apresentaram maior IVE em relação aos demais genótipos na dosagem de 0,05% de orizalina, apesar disso, a exposição a concentração de 0,1% reduziu a velocidade de emergência de todos os genótipos, exceto da cv. Floribela. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os genótipos nas concentrações de 0,2% e 0,4%, demonstrando que a elevação da concentração de orizalina causa uma redução acentuada neste índice para todos os genótipos avaliados.

Tabela 3. Desdobramento da interação dos genótipos dentro de cada nível do fator concentração de orizalina sobre o índice de velocidade de emergência (IVE)

Genótipo	Concentração				
	0,00	0,05	0,10	0,20	0,40
UFPB-001	0,15 b	0,24 a	0,02 b	0,01 a	0,01 a
UFPB-004	0,25 b	0,04 c	0,07 b	0,01 a	0,01 a
FLORIBELA	0,40 a	0,24 a	0,19 a	0,09 a	0,02 a
BIQUINHO	0,15 b	0,14 b	0,05 b	0,04 a	0,02 a

Legenda: Letras diferentes na coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Letras iguais na coluna representam diferença não significativa ($p > 0,05$).

Os tratamentos contendo orizalina produziram plântulas mutantes (Fig. 3), com redução de internódios e folhas retorcidas (Fig. 3A), folhas espessas, coriáceas e de formato variável (Fig. 3B), folhas com uma bifurcação no ápice e padrão de nervação anormal (Fig. 3C) e folhas soldadas na base com aspecto suculento (Fig. 3D).

Os modelos de regressão explicam a variação na emergência de plântulas (%) de forma quadrática (UFPB-001 e UFPB-004) e linear (Floribela e Biquinho) em função das concentrações estudadas neste trabalho (Fig. 4), com coeficientes de determinação variando de 0,82 no UFPB-004 (Fig. 4B) a 0,98 no UFPB-001 (Fig. 4A), ou seja, estes valores de alta magnitude demonstram haver uma relação inversamente proporcional, pois a medida que a concentração de orizalina aumenta há um decréscimo na emergência de plântulas (%).

Portanto, há influência negativa do aumento das concentrações de orizalina sobre a emergência de plântulas de *C. annuum* e *C. chinense*, e isto é explicado pelo aumento da toxidez as células e aos tecidos nas maiores concentrações. As cultivares comerciais Floribela (Fig. 4C) e Biquinho (Fig. 4D) foram mais tolerantes ao aumento das concentrações de orizalina, e esta conclusão possibilita testes futuros usando soluções mais concentradas de orizalina para estas cultivares. O aumento do tempo de exposição a orizalina também influenciou de forma isolada a porcentagem de emergência de plântulas ($p < 0,01$), o índice de velocidade de emergência ($p < 0,05$) e o tempo médio de emergência ($p < 0,01$) (Tab. 1).



Figura 3: Modificações morfológicas causadas pela ação da orizalina em plântulas dos genótipos de *Capsicum* spp. (A) Genótipo UFPB-001 submetido a dose de 0,1% por 48h e (B) Dose de 0,2% + 24h de exposição. (C) Genótipo UFPB-004 submetido a Dose de 0,1% por 72h e (D) Cultivar Biquinho submetido a dose 0,1% por 96h. Bar = 1 cm.

Os modelos de regressão explicam a variação na emergência de plântulas (%) para todos genótipos em função das concentrações de orizalina usadas neste trabalho (Fig. 4), e demonstra uma relação inversamente proporcional, pois a medida que a concentração de orizalina aumenta há um decréscimo na emergência de plântulas (%).

O desdobramento das concentrações de orizalina dentro de cada nível de genótipo permitiu observar que o aumento na concentração reduziu a velocidade de emergência para os acessos e cultivares testados neste estudo (Fig. 5).

Os coeficientes de determinação (R^2) encontrados nas análises de regressão para o índice de velocidade de emergência (IVE), explicam a variação encontrada, que vai de moderada nos acessos UFPB-001 e UFPB-004 (Figura 5A e 5B) e na cv. Biquinho (Figura 5D) a alta na cv. Floribela (Figura 5C) em função das doses adotadas. Assim, é possível visualizar claramente uma redução do IVE a medida em que a concentração de orizalina aumenta (%) e que as doses de 0,2% e 0,4% são mais tóxicas e, por este motivo, reduzem a velocidade de emergência em todos os genótipos. Evidenciando a existência a relação inversamente proporcional, em virtude do coeficiente de correlação entre as concentrações de orizalina e o IVE serem de magnitude elevada (>78%) para todos os genótipos.

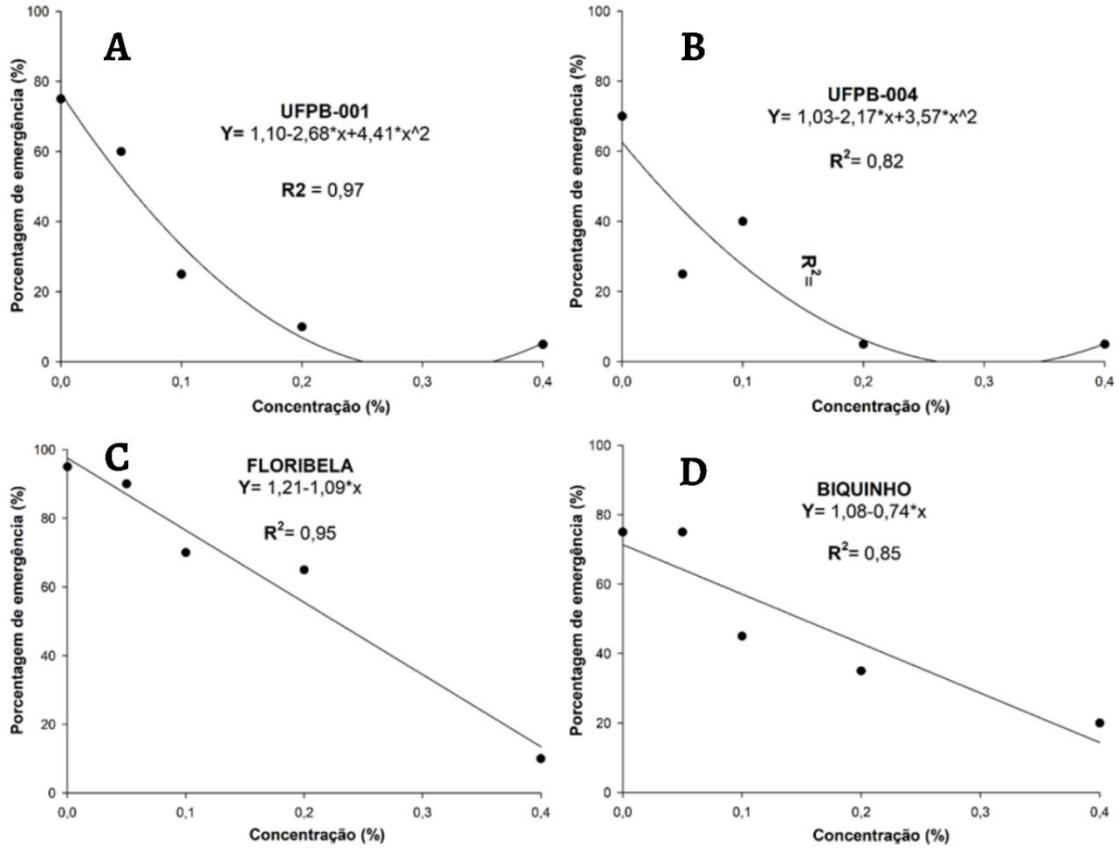


Figura 4: Análise de regressão da emergência de plântulas (%) em função da interação entre os genótipos e as concentrações de orizalina.

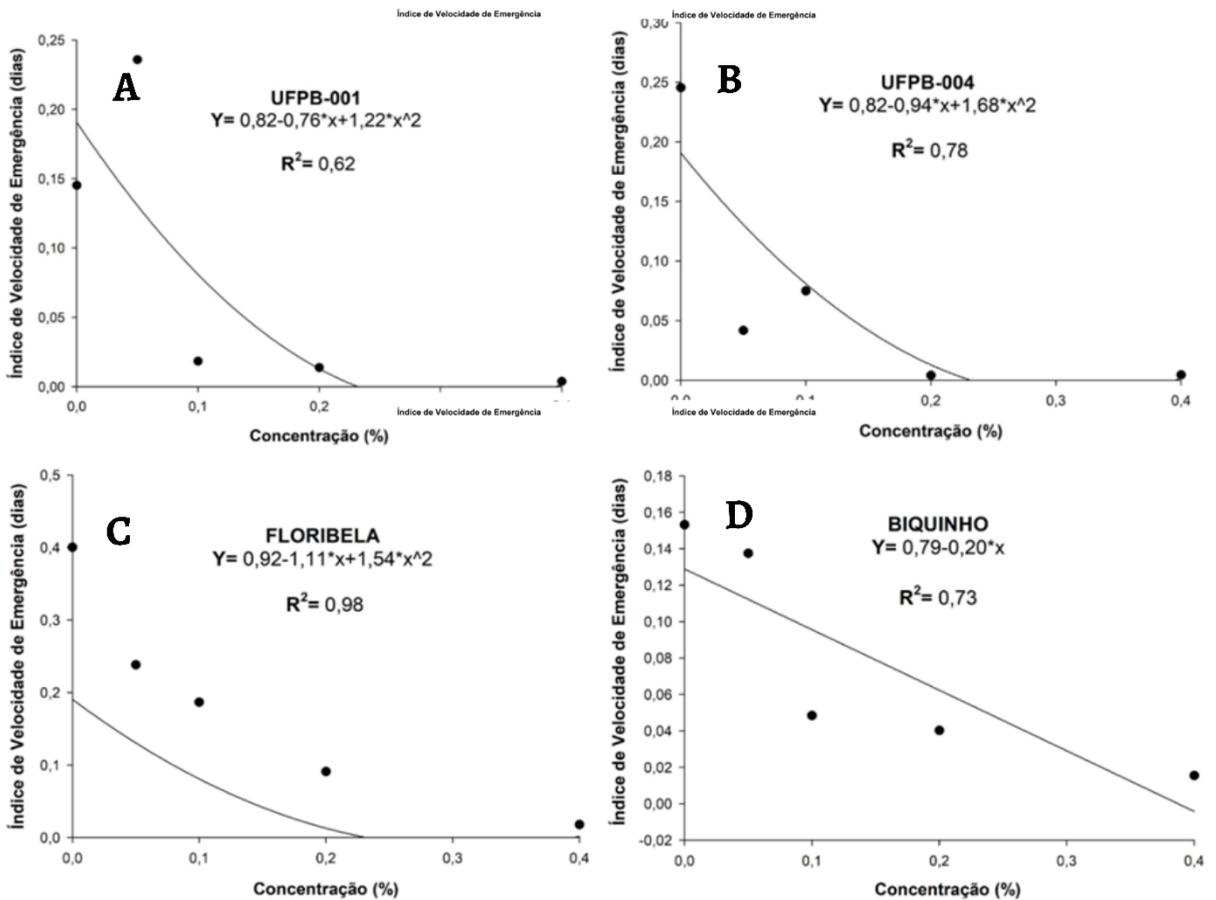


Figura 5: Análise de regressão do índice de velocidade de emergência em função da interação entre os genótipos e as concentrações de orizalina.

Na Figura 6, foram analisados os fatores em estudo de forma isolada para o tempo médio de emergência (dias), assim, foi possível observar que os acessos UFPB-001 e UFPB-004 emergiram mais rapidamente do que as cultivares comerciais Floribela e Biquinho (Fig. 6A). Entretanto, as plântulas emergiram em um período mais curto (dias), a medida em que as concentrações foram maiores (Figura 6B) e este comportamento se repetiu em relação ao tempo de exposição (Fig. 6C).

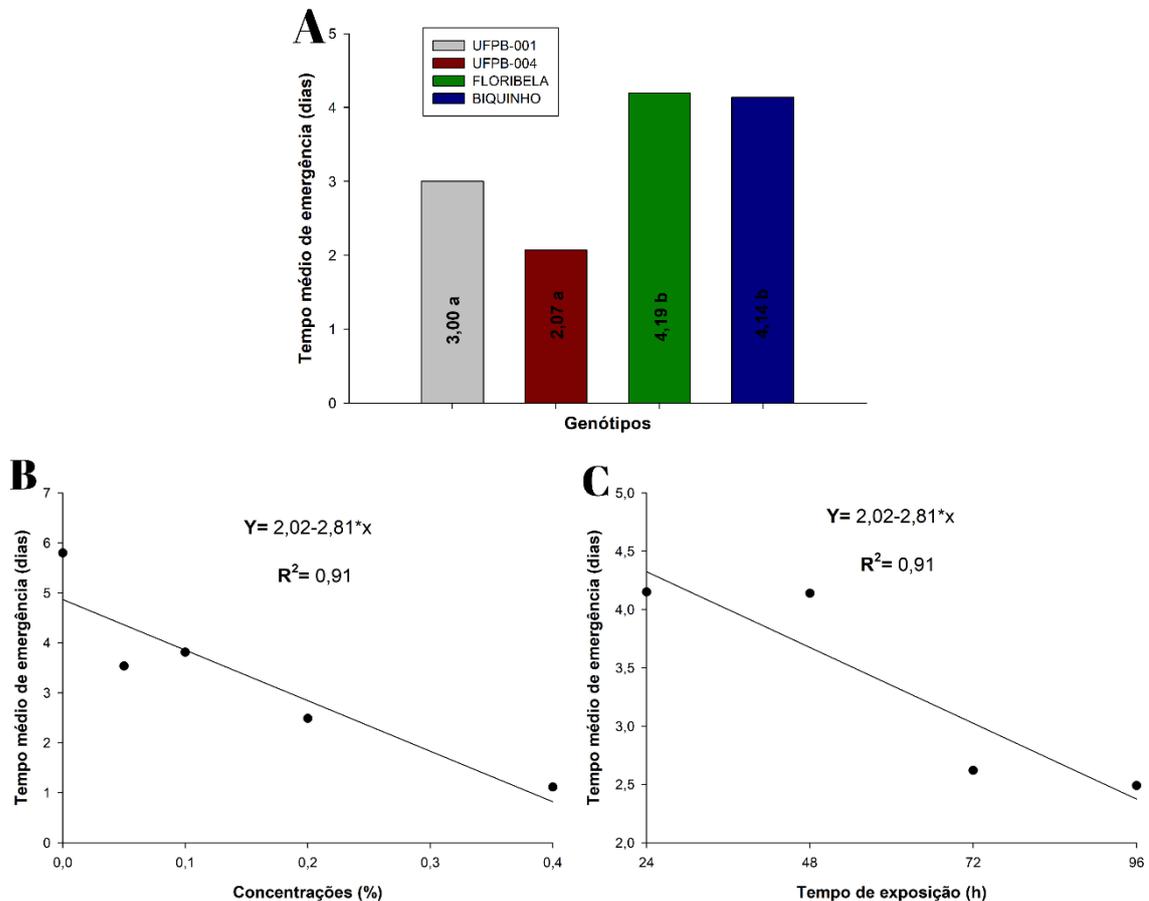


Figura 6: Análise dos fatores estudados de forma isolada para o tempo médio de emergência (orizalina). Influência dos genótipos (A), concentrações de orizalina (B) e tempos de exposição (C).

6.2 EXPERIMENTO - II

A trifluralina proporcionou interação tripla entre os genótipos, concentrações e tempo de exposição para a variável tempo médio de emergência (TME), contudo, o primeiro fator em estudo (genótipos), quando avaliado de forma isolada, não ocasionou diferenças estatísticas para PE, IVE e TME (Tabela 4). A emergência de plântulas (%) mostrou interações significativas ($p < 0,05$) entre os três fatores dois a dois. A velocidade de emergência de plântulas foi influenciada pela interação entre os genótipos e concentrações de trifluralina ($p < 0,01$), entretanto, o tempo de exposição (h) não produziu diferenças para essa variável.

Tabela 4. Análise de variância para emergência de plântulas (EP), índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de emergência (TME) de quatro genótipos de pimenteiros submetidos ao experimento com trifluralina

FV	GL	PE	IVE	TME
Genótipo (G)	3	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,09 ^{ns}
Concentração (C)	4	2,19 ^{**}	0,26 ^{**}	34,05 ^{**}
Tempo de Exposição (T)	3	0,53 ^{**}	0,01 ^{ns}	14,66 ^{**}
G x C	12	0,05 ^{**}	0,02 ^{**}	1,37 [*]
G x T	9	0,05 [*]	0,01 ^{ns}	0,97 ^{ns}
C x T	12	0,21 ^{**}	0,01 ^{ns}	6,57 ^{**}
G x C x T	36	0,03 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,07 [*]
Resíduo	320	0,02	0,01	0,66
Total	399	-	-	-
CV (%)		16,91	9,76	59,2

Legenda: *Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade, **Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade e ^{ns}Não significativo ($p > 0,05$).

Diferentemente do que ocorreu no experimento I (orizalina), a cv. Floribela foi a mais sensível aos efeitos fitotóxicos da trifluralina, a partir da concentração de 0,05%. Nas doses iguais ou superiores a 0,1% foi verificado uma alta taxa de letalidade (>90%), observada pela ausência de plântulas emergidas em relação ao controle, exceto para a concentração 0,4%, que ainda assim, não apresentou diferenças significativas entre os genótipos avaliados ($p > 0,05$).

Foi possível observar diversas alterações morfológicas ocasionadas pela influência da trifluralina (Figura 7) nas pimenteiros (*Capsicum* spp.), e as mais perceptíveis foram a formação de sistemas radiculares reduzidos ou inexistentes (Fig.7A), plântulas com crescimento e desenvolvimento lento (Fig. 7B), folhas retorcidas e entrenós curtos (Fig. 7C) e formação da primeira bifurcação no ponto de inserção das folhas cotiledonares (Fig.7D), podendo ser usado como estratégia para reduzir porte das plantas.



Figura 7: Modificações morfológicas causadas pela ação da trifluralina em plântulas dos genótipos de *Capsicum* spp. (A) Genótipo UFPB-001 submetido a dose de 0,4% por 48h e (B) Genótipo Biquinho exposto a dose de 0,05% por 72h. (C) Genótipo UFPB-004 submetido a Dose de 0,05% por 24h e (D) por 48h. Bar = 1 cm.

Ao analisar os genótipos dentro dos níveis de concentração, não foram encontradas diferenças significativas nas três maiores concentrações ($p > 0,05$). Foi obtido a maior emergência de plântulas na cultivar Floribela na dose controle, em relação aos demais genótipos, entretanto, este comportamento foi inverso no segundo nível de concentração, mostrando uma maior tolerância dos acessos da UFPB (001 e 004) e da cv. Biquinho, a trifluralina quando comparados a cv. Floribela. Na interação entre genótipos e tempos de exposição para a porcentagem de emergência de plântulas (Fig. 8), houve um melhor ajuste ao modelo linear para todos os genótipos, com exceção do UFPB-001 (Fig. 8A).

Conforme o tempo de exposição foi crescendo verificou-se uma inclinação de redução no número de plântulas emergidas para todos os genótipos. Ao se desdobrar os níveis de genótipos dentro dos tempos de exposição avaliados, houveram diferenças significativas ($p < 0,05$), apenas para os níveis de exposição de 24 e 48 horas (Figs. 8A e 8B). Para os quatro tempos de exposição avaliados, observou-se que o UFPB-001 obteve uma taxa de emergência maior no comparativo com os demais genótipos.

A análise do tempo de exposição dentro de cada nível de concentração de trifluralina manteve uma estabilidade, porém, a emergência de plântulas foi muito pequena desde a dose de 0,1%, excetuando-se a resposta obtida na combinação entre a concentração de 0,4% e o período de exposição de 24h. A variação observada na variável resposta foi explicada fortemente para todos os tempos de exposição, e o melhor ajuste foi relacionado aos modelos de primeira e segunda ordens.

Neste estudo, observou-se efeitos letais aos explantes nas doses de 0,1% e 0,2% de trifluralina, contudo, sementes submetidas a concentrações mais elevadas

produziram em média uma plântula (0,4% + 24h) em todos os genótipos, contudo, esta resposta é inesperada e já foi verificada em outros trabalhos na literatura.

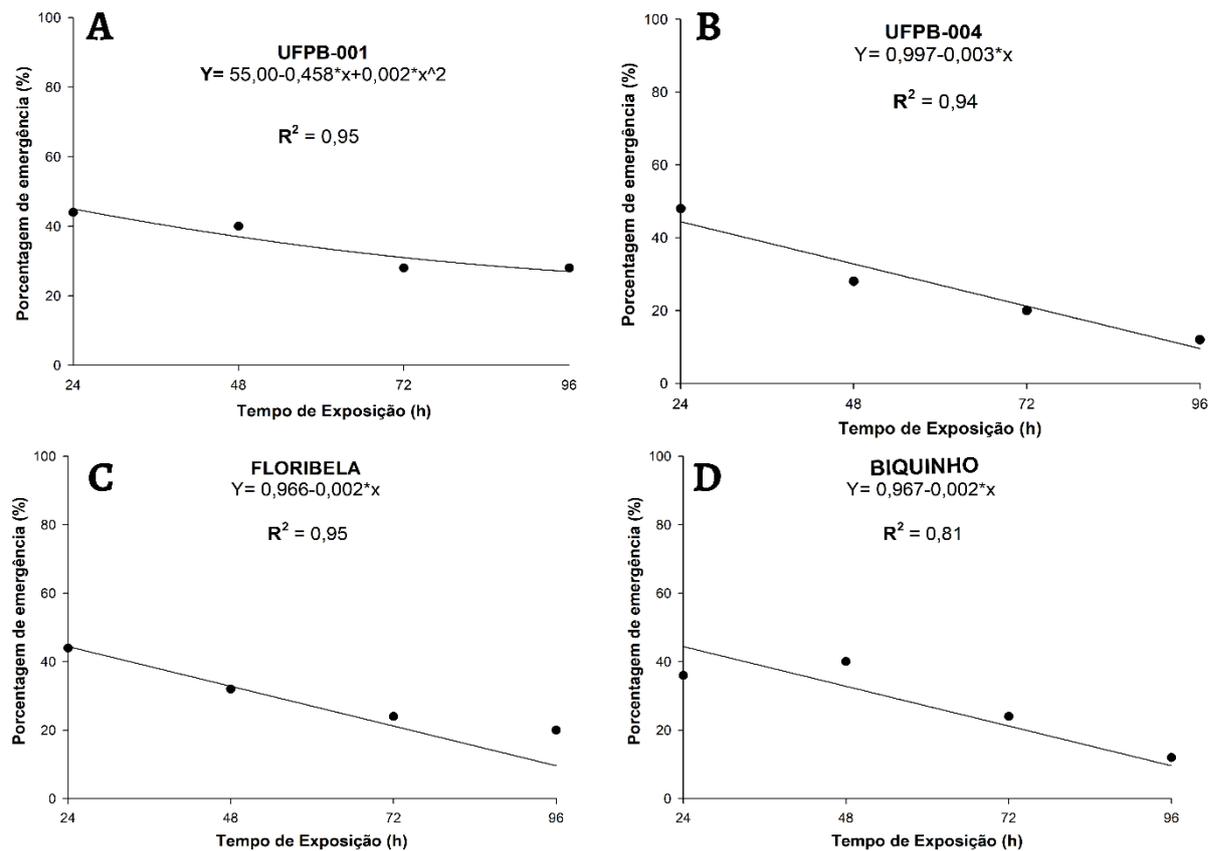


Figura 8: Análise de regressão da emergência de plântulas (%) em função da interação entre os genótipos e os tempos de exposição a trifluralina.

Os efeitos tóxicos da trifluralina são muito acentuados a partir das concentrações de 0,1% para o índice de velocidade de emergência e ocasionam uma queda abrupta na velocidade de emergência em relação ao controle para todos os genótipos. O genótipo UFPB-001 apresentou o menor ESI na concentração controle (0,0%), seguido em uma ordem crescente por Biquinho, UFPB-004 e Floribela. Valores discrepantes também foram encontrados para o ESI e tempo médio de emergência (dias) na dose de 0,4%.

Foi demonstrada a interação tripla positiva entre os fatores em estudo (genótipo x concentrações de trifluralina x tempo de exposição) para a variável do tempo médio de emergência (dias) (Fig. 9). Os modelos significativos de primeira (Fig. 9C e 9E) e segunda ordem (Figs. 9A, 9B, 9D e 9F) alcançaram um forte ajuste para a interação entre o genótipo as concentrações de trifluralina (C) e tempos de exposição (TE), para todos os genótipos, exceto a cv. Floribela. Foi observada uma tendência de que sementes submetidas a concentrações mais elevadas propiciam a emergência de plântulas em menos dias a medida em que o tempo de exposição aumentou (24h).

O maior número de dias para as plantas emergirem foi identificado na interação entre a solução mais concentrada de trifluralina (0,4%) e o tempo de exposição de 24h para todos os genótipos, entretanto, à medida que o tempo de exposição foi

umentando, houve um decréscimo marcante na emergência de plântulas e, por conseguinte, uma letalidade crescente na interação com doses superiores a 0,05%. No entanto, observou-se que as poucas plântulas formadas nestas condições necessitavam de uma menor quantidade de dias para emergir.

7 DISCUSSÃO

Os agentes antimitóticos impedem a formação das fibras de fuso durante a metáfase e assim impedem a separação dos cromossomos homólogos na anáfase (*apud* Pereira, Davide, Techio & Timbó, 2012), influenciando diretamente a mitose, e por isso, é compreensível que exista um retardo na retomada do crescimento da semente que leva a germinação e ao desenvolvimento da plântula (Taiz, Zeiger, Møller & Murphy, 2017).

É compreensível que a imersão de sementes em soluções contendo agentes antimitóticos reduza a germinação e emergência de plantas, visto que esses agentes influenciam na inibição da mitose e, conseqüentemente, na retomada do crescimento pelo embrião, além disso, a toxidez determinada pela concentração e tempo de exposição, podem ocasionar a morte das células embrionárias e/ou tecidos ao longo do processo de germinação, comprometendo a emergência das plantas (Rego, Rego, Bruckner, Finger & Otoni, 2011; Pereira, Davide, Techio & Timbó, 2012; Lan et al., 2020, Niazian & Nalouisi, 2020).

A redução da emergência observada neste estudo era esperada, porque os agentes indutores de poliploidia usados são herbicidas do grupo das dinitroanilinas (orizalina e trifluralina), que produzem efeitos tóxicos sobre regiões meristemáticas, bloqueando o crescimento por meio da inibição da polimerização da β -tubulina, bloqueando a mitose e causando efeitos letais quando submetidas a concentrações elevadas (Hansen & Andersen, 1996; Marchi et al., 2008).

7.1 EXPERIMENTO I

A baixa emergência de plântulas (< 20%) observada em altas concentrações de orizalina para os genótipos testados corroboram com os resultados encontrados por Kara, Erboga & Dogan (2021) em *Vitis vinifera*, que observaram redução significativa no número de plântulas formadas a partir do tratamento de sementes com orizalina em dois genótipos de videira.

A redução na emergência de plântulas tratadas com orizalina a medida em que o tempo de exposição aumentou também foi verificada por Mori et al. (2021) em *Limonium sinuatum* para todas as concentrações utilizadas. Isto demonstra que a exposição prolongada, mesmo que em concentrações baixas tem potencial efeito fitotóxico sobre as plantas.

Os efeitos fitotóxicos da orizalina produzem diversas modificações fenotípicas, como estas reportadas neste trabalho. Outras mutações relatadas na literatura compreendem a redução ou aumento na altura das plantas, folhas mais espessas e coriáceas, de forma irregular e tonalidade verde escura, maior diâmetro do pecíolo e menor número de folhas por plantas, como também a redução do sistema radicular associado a raízes de maior diâmetro (Zeng, Liu, Du & Kang, 2019; Zhang, Chen, Cao & Duan, 2020).

Mo et al. (2020) observou que a orizalina foi fitotóxica e afetou significativamente a germinação e emergência de plântulas de *Rhododendron fortunei* a partir da concentração de 0,075%, e relatou que altas concentrações de orizalina inibem a germinação e emergência de sementes tratadas, este fato é corroborado pelas evidências encontradas no presente estudo, particularmente, quando plantas do gênero *Capsicum* são submetidas a doses de orizalina superiores a 0,1% por mais de 24h.

O tempo de emergência menor nas maiores concentrações de orizalina e os tempos de exposição prolongados devem estar relacionados a mecanismos de sobrevivência das sementes, e este comportamento também foi observado por Battistin et al. (1993) em *Centrosema virginianum*, contudo estudos mais aprofundados devem ser realizados para analisar essa resposta a nível celular e bioquímico.

7.2 EXPERIMENTO II

De modo geral, a trifluralina proporcionou efeitos fitotóxicos mais acentuados que a orizalina.

Karami, Modarresi, Kohanmoo & Zahabi (2019) reportaram interações significativas ($p < 0,01$) entre concentrações de trifluralina e o tempo de exposição na produção de alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas em *Matricaria chamomilla*, corroborando os resultados encontrados neste trabalho. Dessa forma, a definição das combinações de concentrações e tempo de exposição para cada espécie é indispensável para o sucesso na obtenção de plantas viáveis e poliploidizadas.

Kulkarni e Borse (2010) constataram que o uso da colchicina em sementes da cultivar GVC 111 (*C. annuum* L.) causa um severo decréscimo na germinação e emergência de plantas a partir da concentração de 0,2%, e efeito letal, na concentração de 0,4% com 72h de exposição, assim, neste estudo, a trifluralina também mostrou-se tóxica por influenciar negativamente a porcentagem de plântulas emergidas e o índice de velocidade de emergência a partir da concentração de 0,1% nos genótipos de *C. annuum* (UFPB-001, UFPB-004 e Floribela).

A altura reduzida (Fig. 7C), maior ramificação (Fig. 7D) e menor sistema radicular (Fig. 7A) aos 40 dias após a semeadura, são modificações fenotípicas que refletem os efeitos tóxicos mais comuns da trifluralina, os quais também foram reportados por Alavi, Maroufi & Mirzaghaderi (2022), Karami, Modarresi, Kohanmoo & Zahabi (2019) e Ross & Childs (1995). A trifluralina causa elevada toxidez ao meristema apical da raiz (Fig. 7A), inibindo seu crescimento e, por conseguinte, a altura das plântulas obtidas.

Esta fitotóxidez promove a formação de células radiculares com muitos conjuntos cromossômicos e paredes celulares defeituosas, além de raízes curtas e grossas, tornando-as incapazes de realizar seu papel de absorção de água e sais minerais, e em casos extremos, o sistema radicular é muito reduzido e deficitário que a plântula não se estabelece e morre (Peterson et al., 2001).

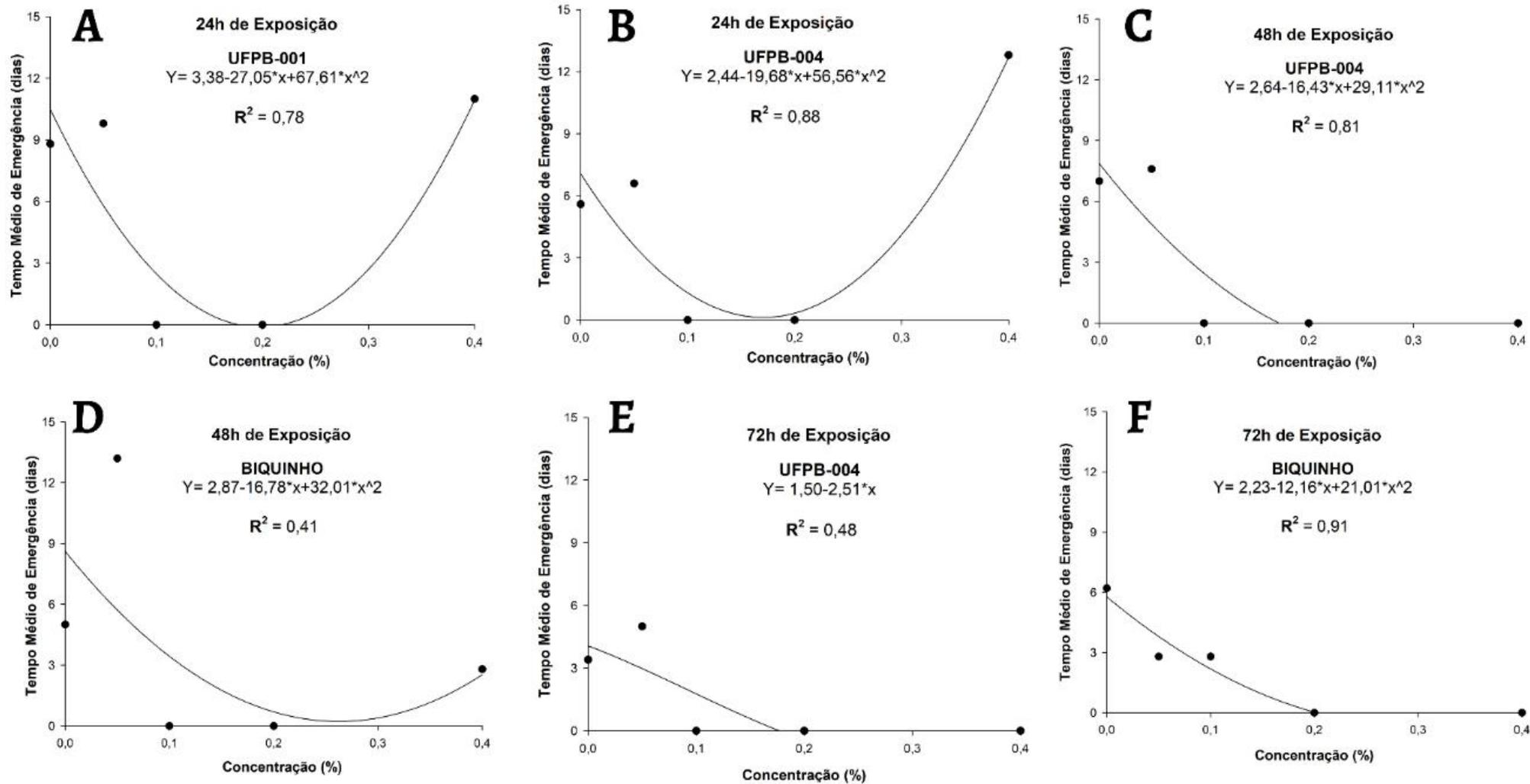


Figura 9: Análise de regressão do tempo médio de emergência em função da interação entre os genótipos e as concentrações de trifluralina.

Comumente são encontradas respostas inesperadas, como a formação de plântulas em doses que deveriam ser letais, e isto se dá pela interação de concentrações de agentes antimitóticos e tempos de exposição na germinação e crescimento dos mais diversos explantes *in vitro*.

Este tipo de comportamento foi verificado em secções nodais de *Populus* spp. (Zeng, 2019) tratadas com orizalina, obtendo efeitos letais aos explantes na dose de 2,5 mg.L⁻¹ associada a tempos de exposição, enquanto, ocorreu a regeneração de plantas a partir da exposição de maior dose (5,0 mg.L⁻¹).

Handayani, Prawestri, Rahayu & Leksonowati (2023) e Wu et al (2020) também reportaram que induziram poliplóides de *Colocasia esculenta* (orizalina) e *Populus hopeiensis* (colchicina) em doses maiores, após evidenciar efeitos tóxicos e tendência de queda nas doses mais brandas.

A formação de plântulas que emergiram mais rapidamente em concentrações elevadas de trifluralina pode estar relacionada a dois fatores, o primeiro seria uma estratégia de sobrevivência dos genótipos que buscaram emergir mais rapidamente em condições ambientais adversas (toxidez por trifluralina) e o segundo, que ocorreu a poliploidização, tendo em vista que os poliplóides germinam e emergem mais rapidamente (Eliášová & Münzbergová, 2017; Chan, Ooi & Guja, 2022).

8 CONCLUSÃO

A trifluralina e a orizalina são fitotóxicas e causam redução acentuada da emergência de plântulas nos genótipos de pimenteiras ornamentais. O índice de velocidade de emergência (IVE) dos genótipos avaliados, é inversamente proporcional a concentração dos antimitóticos avaliados. A velocidade de emergência de plântulas foi menor à medida que a concentração de trifluralina aumentou.

9 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

10 REFERÊNCIAS

- Alavi, J., Maroufi, A., & Mirzaghaderi, G. (2022). Trifluralin-mediated polyploidization of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) using in vitro embryo culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, 44(10), 97.
- Amanah, H. A., Arumingtyas, E. L., & Indriyani, S. (2016). Chromosome analysis of cayenne pepper (*Capsicum frutescens* L.) in colchicine induced mutation. **Journal of Applied Horticulture**, 18(3), 217-220.
- Bianchi, P. A., Dutra, I. P., Moulin, M. M., Santos, J. O., & Santos Júnior, A. C. (2016). Morphological characterization and analysis of genetic variability among pepper accessions. **Ciência Rural**, 46, 1151-1157.

Chan, J. C., Ooi, M. K., & Guja, L. K. (2022). Polyploidy but Not Range Size Is Associated With Seed and Seedling Traits That Affect Performance of *Pomaderris* Species. **Frontiers in Plant Science**, *12*, 779651.

Chen, J., Yu, Q., Patterson, E., Sayer, C., & Powles, S. (2021). Dinitroaniline herbicide resistance and mechanisms in weeds. **Frontiers in Plant Science**, *12*, 634018.

Dagnoko, S., Yaro-Diarisso, N., Sanogo, P. N., Adetula, O., Dolo-Nantoume, A., Gamby-Touré, K., Traoré-Théra, A., Katilé, S. & Daoule, D. B. (2013). Overview of pepper (*Capsicum* spp.) breeding in West Africa. **African Journal of Agricultural Research**, *8*(13), 1108-1114.

Dhooghe, E., Laere, K. V., Eeckhaut, T., Leus, L., & Huylenbroeck, J. V. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, *104*(3), 359-373.

Eeckhaut, T., Veken, J. V. D., Dhooghe, E., Leus, L., Laere, K. V. & Huylenbroeck, J. V. (2018). Ploidy breeding in ornamentals. In: Huylenbroeck, J. V., **Ornamental crops** (pp. 145-173). Springer, Boston, MA.

Eliášová, A., & Münzbergová, Z. (2017). Factors influencing distribution and local coexistence of diploids and tetraploids of *Vicia cracca*: inferences from a common garden experiment. **Journal of plant research**, *130*, 677-687.

Gomes, S. S. L., Saldanha, C. W., Neves, C. S., Trevizani, M., Raposo, N. R. B., Notini, M. M., Santos, M. O.; Campos, J. M. S.; Otoni, W. C. & Viccini, L. F. (2014). Karyotype, genome size, and in vitro chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, *118*(1), 45-56.

Grubben, G. J. H., & El Tahir, I. M. (2004). **Capsicum annum L.** In: *PROTA 2: Vegetables/Légumes*, (pp. 154-163). PROTA, Wageningen, The Netherlands.

Handayani, T., Prawestri, A. D., Rahayu, R. S., & Leksonowati, A. (2023). Oryzalin-induced taro (*Colocasia esculenta* L.) tetraploid and diploid assessment for growth and agronomic traits. **SABRAO J. Breed. Genet**, *55*(1), 163-174.

Hansen, N. J. P., & Andersen, S. B. (1996). In vitro chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture. **Euphytica**, *88*, 159-164.

Heiser, C. B. J. R. Peppers - *Capsicum* (Solanaceae). (1979). In: Simmonds, N. W., **Evolution of crop plants** (pp. 265-273). Longman, New York.

Iannicelli, J., Guariniello, J., Tossi, V. E., Regalado, J. J., Di Ciaccio, L., Van Baren, C. M.; Álvarez, S. I. P.; Escandón, A. S. (2020). The “polyploid effect” in the breeding of aromatic and medicinal species. **Scientia Horticulturae**, *260*, 108854.

International Seed Testing Association – ISTA (2015). **The germination test**. In: *International rules for seed testing*. Zurich, Switzerland:, 2015.

Casian Junior, J. C., Rodrigues, V. A. P., Soares, I. F. G., de Almeida, R., Mauricio, L. S., Paula, F. C., ... & Moulin, M. M. (2021). Avaliação da diversidade genética de *Capsicum* spp. Com base em descritores morfoagronômicos e bromatológicos. **Revista Ifes Ciência**, 7(1), 01-11.

Kara, Z., Erboğa, M., & Doğan, O. (2021). The Effects of Nitrogen Protoxide and Orizalin on Promotion of Polyploidy in Grapes. **Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences**, 35(3), 244-248.

Karami, L., Modarresi, M., Kohanmoo, M. A., & Zahabi, F. (2019). Polyploidy induction in German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) by herbicide trifluralin. **Nova Biologica Reperta**, 6(3), 311-319.

Kulkarni, M.; Borse, T. (2010). Induced polyploidy with gigas expression for root traits in *Capsicum annuum* (L.). **Plant Breeding**, 129(4), 461-464.

Labouriau, L. G. (1983). **Uma nova linha de pesquisa na fisiologia da germinação das sementes**. Anais do XXXIV Congresso Nacional de Botânica. SBB, Porto Alegre, 11-50.

Lan, M. O., Chen, J. H., Fei, C. H. E. N., Xu, Q. W., Tong, Z. K., Huang, H. H., Dong, R. H., Lou, X. Z., Lin, E. P. (2020). Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. **Journal of integrative agriculture**, 19(8), 2016-2026.

Luo, Z., Iaffaldano, B. J. & Cornish, K. (2018). Colchicine-induced polyploidy has the potential to improve rubber yield in *Taraxacum kok-saghyz*. **Industrial Crops and Products**, 112, 75-81.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2, 176-177.

Marchi, G., Marchi, E. C. S., Guimarães, T. G. (2008). **Herbicidas: mecanismos de ação e usos**. Documentos. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. 36p.

Melo, L. F., Gomes, R. L. F., Silva, V. B., Monteiro, E. R., Lopes, A. C. A., Peron, A. P. (2014). Potencial ornamental de acessos de pimenta. **Ciência Rural**, 44, 11, 2010- 2015.

Mo, L., Chen, J., Chen, F., XU, Q., Tong, Z., Huang, H., Dong, R., Lou, X. & Lin, E. (2020). Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. **Journal of Integrative Agriculture**, 19(8), 2016-2026.

Mori, S., Yahata, M., Kuwahara, A., Shirono, Y., Ueno, Y., Hatanaka, M., ... & Wagatsuma, T. (2021). Caracterização Morfológica de Tetraploides de *Limonium sinuatum* (L.) Mill. Produzido por Oryzalin Tratamento de Sementes. **Horticulturae**, 7 (8), 248.

- Morrison, I. N., Nawolsky, K. M., Marshall, G. M., & Smith, A. E. (1989). Recovery of spring wheat (*Triticum aestivum*) injured by trifluralin. *Weed Science*, 37(6), 784-789.
- Niazian, M., Nalouisi, A. M. (2020). Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 142, 447-469.
- Pal, B. P., & Ramanujam, S. (1939). Induction of polyploidy in chilli (*Capsicum annum* L.) by colchicine. **Nature**, 143(3615), 245-246.
- Panda, R. C., Kumar, O. A., & Rao, K. R. (1984). Cytomorphology of induced octoploid Chili pepper (*Capsicum annum* L.). **Theoretical and applied genetics**, 68, 567-570.
- Pereira, R. C., Davide, L. C., Techio, V. H., & Timbó, A. L. O. (2012). Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, 42, 1278-1285.
- Peterson, C. R., Regehr, D. E.; Thompson, D. L, Al-khatib, K. **Herbicide mode of action**. Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, 24p, 2001.
- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., & Wannakrairoj, S. (2017). Effects of Colchicine and Oryzalin on Polyploidy Induction and Production of Capsaicin in *Capsicum frutescens* L. Pawnpirun. **Thai Journal of Agricultural Science**, 50(2), 108-120.
- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., & Wannakrairoj, S. (2017). Efeitos da colchicina e orizalina na indução de poliploidia e produção de capsaicina em *Capsicum frutescens* L. Pawnpirun. *Thai Journal of Agricultural Science*, 50 (2), 108-120.
- Podlipná, R., Fialová, Z., & Vaněk, T. (2008). Toxic effect of nitroesters on plant tissue cultures. **Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)**, 94(3), 305-311.
- Rao, K. R., & Kumar, O. A. (1983). Colchicine induced interchanges in chillies (*Capsicum annum* L.). **Experientia**, 39, 76-77.
- Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Bruckner, C. H., Finger, F. L., Otoni, W. C. (2011). In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 107, 451-459.
- Rodrigues, C. A. P. S., do Rêgo, M. M., dos Santos Pessoa, A. M., da Silva Sousa, E., & do Rêgo, E. R. (2023). RAPD markers in the discrimination of genetic variability in ornamental peppers. **Comunicata Scientiae**, 14, e3709-e3709.
- Ross, M. A., & Childs, D. J. (1995). **Herbicide mode-of-action summary**. *Weed science (West Lafayette, Ind.)(USA)*.
- Silva, L. J.; Medeiros, A. D., & Oliveira, A. M. S. (2019). SeedCalc, uma nova ferramenta de software R automatizada para germinação e processamento de dados de comprimento de plântulas. **Journal of Seed Science**, 41(2), 250-257 (2019).

- Stummel, J. R.; Bosland, P. (2007). Ornamental Pepper *Capsicum annuum*. ***Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*** (Anderson NO, ed.), 561-599.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). ***Fisiologia e desenvolvimento vegetal***. Artmed Editora. 858p.
- Talebi, S. F., Saharkhiz, M. J., Kermani, M. J., Sharafi, Y. & Fard, F. R. (2017). Effect of different antimetabolic agents on polyploid induction of anise hyssop (*Agastache foeniculum* L.). ***Caryologia***, 70(2), 184-193.
- Tammu, R. M., Nuringtyas, T. R., & Daryono, B. S. (2021). Colchicine effects on the ploidy level and morphological characters of Katokkon pepper (*Capsicum annuum* L.) from North Toraja, Indonesia. ***Journal of Genetic Engineering and Biotechnology***, 19, 1-8.
- Touchell, D. H.; Palmer, I. E.; Ranney, T. G. (2020). In vitro ploidy manipulation for crop improvement. ***Frontiers and Plant Science***, 11(722), 1-11.
- Tracy, S. R., Nagel, K. A., Postma, J. A., Fassbender, H., Wasson, A., & Watt, M. (2020). Crop improvement from phenotyping roots: highlights reveal expanding opportunities. ***Trends in plant science***, 25(1), 105-118.
- Trojak-Goluch, A., Kawka-Lipińska, M., Wielgusz, K., & Praczyk, M. (2021). Polyploidy in industrial crops: Applications and perspectives in plant breeding. ***Agronomy***, 11(12), 2574.
- Wu, J., Cheng, X., Kong, B., Zhou, Q., Sang, Y., & Zhang, P. (2022). In vitro octaploid induction of *Populus hopeiensis* with colchicine. ***BMC Plant Biology***, 22(1), 176.
- Xia, E., Tong, W., Hou, Y., An, Y., Chen, L., Wu, Q., ... & Wan, X. (2020). The reference genome of tea plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into its genome evolution and adaptation. ***Molecular plant***, 13(7), 1013-1026.
- Zeng, Q., Liu, Z., Du, K., & Kang, X. (2019). Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)***, 138, 571-581.
- Zhang, Y. S., Chen, J. J., Cao, Y. M., Duan, J. X., & Cai, X. D. (2020). Induction of tetraploids in 'Red Flash' caladium using colchicine and oryzalin: morphological, cytological, photosynthetic and chilling tolerance analysis. ***Scientia Horticulturae***, 272, 109524

11 ARTIGO 2

INDUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPLÓIDES EM PIMENTEIRAS ORNAMENTAIS (*Capsicum annuum* L.)

Resumo

Pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum*) possuem demanda crescente no cenário mundial pelo potencial decorativo associado a produção de frutos para o consumo *in natura* e/ou processamento. Isto tem demandado novas cultivares com variabilidade nas formas e cores de folhas, flores e frutos. A poliploidia representa uma forma alternativa de ampliar a diversidade genética dessa espécie, auxiliando na introdução de novos genótipos aos programas de melhoramento genético. A indução artificial de poliploides, dependem de agentes despolimerizantes da β -tubulina. Dentro deste contexto, este trabalho objetivou induzir e identificar poliploides em *C. annuum* com o uso da orizalina e da trifluralina. Sementes de genótipos de *C. annuum* foram imersas em soluções e doses de orizalina e trifluralina e tempos distintos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas). O controle consistiu da imersão de sementes em água destilada e deionizada nos mesmos tempos de exposição. Foram produzidas duas plantas tetraplóides e uma triplóide de *C. annuum* com o uso da orizalina como agente indutor, enquanto a trifluralina foi ineficiente na indução de poliploides nas condições testadas. Os poliplóides apresentaram área estomática, comprimento e largura dos estômatos maiores do que os diplóides correspondentes, e menor densidade estomática. Plantas poliplóides também exibiram maior espessura da folha e número de cloroplastos por célula-guarda (dobro), quando comparado aos diplóides. A orizalina é eficiente na indução de poliploides de *C. annuum* a partir de sementes, mas é dependente do genótipo, da dose e do tempo de exposição.

Palavras-chave: tetraplóide; triplóide; agentes indutores; anatomia foliar; pimenteiras ornamentais.

Abstract

Ornamental pepper trees (*Capsicum annuum*) are in growing demand worldwide due to their decorative potential associated with the production of fruit for fresh consumption and/or processing. This has demanded new cultivars with variability in the shapes and colors of leaves, flowers and fruits. Polyploidy is an alternative way of increasing the genetic diversity of this species, helping to introduce new genotypes into breeding programs. The artificial induction of polyploids depends on β -tubulin depolymerizing agents. In this context, the aim of this study was to induce and identify polyploids in *C. annuum* using orizalin and trifluralin. Seeds of *C. annuum* genotypes were immersed in solutions and doses of orizalin and trifluralin and different exposure times (24, 48, 72 and 96 hours). The control consisted of immersing the seeds in distilled and deionized water for the same exposure times. Two tetraploid and one triploid *C. annuum* plants were produced using orizalin as the inducing agent, while trifluralin was inefficient in inducing polyploids under the conditions tested. The polyploids had larger stomata area, length and width than the corresponding diploids, and lower stomata density. Polyploid plants also exhibited greater leaf thickness and number of chloroplasts per guard cell (double) when compared to diploids. Orizalin is efficient in inducing polyploids of *C. annuum* from seeds, but it is dependent on genotype, dose and exposure time.

Keywords: tetraploid; triploid; inducing agents; leaf anatomy; ornamental peppers.

12 INTRODUÇÃO

As pimenteiras (*Capsicum* spp.) são originárias da América Central e do Sul, e pertencem a família botânica das Solanáceas (Heiser 1979; Grubben e El Tahir 2004). Existem 38 espécies que compõem o gênero *Capsicum* segundo a Rede de Informação de Recursos de Germoplasma (GRIN 2023), dentre estas, *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum* são as mais importantes economicamente e possuem um número cromossômico de $2n = 2x = 24$ (Dagnoko et al. 2013; Sousa et al., 2015). Existe uma ampla diversidade do gênero *Capsicum* e isto se reflete em uma abundante variação fenotípica entre os acessos de pimenteiras existentes (Zonneveld et al. 2015; Fortunato et al. 2019).

O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais movimenta 2,1 bilhões de dólares, com um crescimento médio do faturamento de 10,54% nos últimos 10 anos (Lima Júnior et al. 2022). As pimenteiras ornamentais tem contribuído significativamente com o mercado de plantas ornamentais, em função do seu alto valor agregado garantido pela grande diversidade de características morfológicas disponíveis, e pela dupla finalidade de uso, pois podem ser utilizadas como plantas decorativas e/ou para a produção e consumo de frutos (Costa et al. 2020; Rego e Rego 2016). A variabilidade existente e a elevada divergência genética entre os acessos disponíveis elevam o potencial de desenvolvimento de novas cultivares de pimenteiras ornamentais (Rodrigues et al. 2023).

O programa de melhoramento genético de pimenteiras ornamentais da Universidade Federal da Paraíba em parceria com a Universidade Federal de Viçosa vem desenvolvendo linhagens, híbridos e cultivares que visam atender aos anseios dos produtores, consumidores e o mercado (Rego e Rego 2016). Dentre os vários métodos empregados para o melhoramento de plantas autógamas (Borém et al. 2021), o genealógico ou *pedegree* é o preferido na condução do melhoramento de espécies de *Capsicum* (Rêgo et al. 2016; Selvakumar et al. 2022). Estes métodos de melhoramento utilizados em pimenteiras ornamentais levam até oito gerações para se obter uma cultivar com caracteres de interesse, enquanto, a indução de indução de poliploides reduz esse tempo consideravelmente.

A poliploidização é um método alternativo usado para gerar germoplasma inexistente com características específicas de importância no melhoramento de plantas, fornecendo maior diversidade alélica, heterozigosidade e geração de novas variações fenotípicas (Udall e Wendel 2006; Kulkarni e Borse 2010). Em plantas, a

poliploidia foi reportada pela primeira vez em 1907 e é um dos mecanismos mais proeminentes de especiação e diversificação em plantas superiores (Lutz 1907; Wendel e Doyle 2005; Miri 2020).

Plantas poliplóides contém três ou mais conjuntos completos de cromossomos por núcleo celular (Ranney 2006) e apresentam maior capacidade de adaptação a ambientes estressantes, maior efeito tamponante, estruturas maiores e robustas como os órgãos vegetativos e reprodutivos, e maior eficiência fisiológica (Chambhare e Nikam 2021). Os poliplóides podem ser formados espontaneamente na natureza, em virtude da produção de gametas não reduzidos ($2n$) durante a gametogênese (Harlan e De Wet 1975).

A obtenção artificial de poliplóides é realizada com a utilização de agentes antimitóticos, pois estes influenciam no processo mitótico em células somáticas, explantes ou sementes. Os agentes antimitóticos impedem a formação das fibras do fuso ao interferir na polimerização da tubulina, proteína necessária para a separação dos cromossomos homólogos duplicados durante a interfase, e assim, impede o processo mitótico que dá origem a células com o número de cromossomos duplicados (Eeckhaut et al. 2018).

Algumas características foliares como o aumento do tamanho dos estômatos, do número de cloroplastos por célula guarda e a redução da densidade estomática são indicativos da poliploidização (Chambhare e Nikam 2021; Yan et al. 2022). Há alguns relatos na literatura sobre a indução de poliplóides no gênero *Capsicum*, particularmente em *C. annuum* usando colchicina (Kulkarni e Borse 2010; Selvakumar et al. 2022), porém usando orizalina e trifluralina, são inexistentes. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi induzir e identificar poliplóides de *C. annuum* a partir de doses e tempos de exposição distintos a orizalina e trifluralina.

13 MATERIAL E MÉTODOS

13.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes de três genótipos de pimenteiras ornamentais (*C. annuum*) foram utilizadas neste estudo. Os acessos UFPB-001 e UFPB-004 pertencentes ao Banco de Germoplasma de Pimenteiras da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), enquanto, a Floribela é uma cultivar comercial da Feltrin®. Os experimentos foram iniciados no dia 03 de dezembro de 2021 e realizado no setor de Biotecnologia Vegetal da UFPB, Areia, Paraíba, Brasil.

13.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois experimentos com o intuito de avaliar a indução de poliplóides de pimenteiras, usando dois diferentes agentes antimutogênicos, orizalina e trifluralina. No primeiro e segundo experimentos, foram adotados um esquema fatorial triplo e um delineamento inteiramente casualizado. O fatorial 3x5x4 utilizado contou com a combinação de três genótipos, cinco concentrações de antimutogênicos e quatro tempos de exposição. A diferença entre os experimentos foi o agente indutor de poliploidia utilizado, orizalina no primeiro e trifluralina no segundo.

Vinte e cinco sementes de cada genótipo foram imersas em tubos Eppendorf de 2,0 mL contendo 1000 µL de diferentes doses de antimutogênicos (0.00, 0.05, 0.1, 0.2 e 0.4%) e submetidas a diferentes tempos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas), cada tratamento foi constituído de repetições (5 sementes), totalizando 60 tratamentos e 300 observações por experimento. Após a exposição aos antimutogênicos, as sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno de 200 células contendo substrato Plantmax HT®. As plântulas obtidas foram transplantadas aos 40 dias após a semeadura (DAS) para vasos de 1L preenchidos com substrato Plantmax HT®, os quais foram devidamente identificados conforme os tratamentos mencionados acima.

As plantas foram irrigadas diariamente e, em dias alternados, com solução nutritiva, elaborada com base em Furlani et al. (1999) cuja composição em g/1.000L é: 1.000g de nitrato de cálcio; 1.250g de nitrato de potássio; 250g de MKP; 500g de sulfato de magnésio; 1,5g de ácido bórico; 25g de quelatec AZ; 25g de ultraferro; 110g de cloreto de potássio e 150g de sulfato de potássio. Cada planta recebeu 50 mL de solução nutritiva a cada aplicação. O controle de pragas e doenças foi realizado semanalmente e de forma preventiva, durante todo o ciclo da cultura.

13.3 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA AOS TRATAMENTOS

As plântulas sobreviventes foram contadas ao final do vigésimo primeiro dia após a semeadura (DAS). A taxa de sobrevivência de plântulas (TS) foi estimada pela fórmula descrita a seguir (Rodriguez 1996).

$$TS (\%) = (\text{total de plântulas sobreviventes} / \text{total de sementes}) \times 100$$

13.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As plantas produzidas foram analisadas morfolologicamente seguindo os descritores de *Capsicum* do IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). As variáveis analisadas foram altura da planta (cm), diâmetro do caule (cm), comprimento da folha (cm) e largura da folha (cm), índice de forma da folha (comprimento/largura da folha), diâmetro da corola (mm) e índice de forma da flor

(comprimento/largura da pétala, em cm). Todas as medidas foram realizadas usando régua graduada e paquímetro digital.

Estas avaliações ao longo do tempo possibilitaram a seleção contínua de plantas com variações morfológicas em relação ao controle. Plantas que apresentaram uma ou mais variações morfológicas, tais como: porte alto ou baixo em relação ao controle, entrenós curtos, presença de folhas grandes, coriáceas e espessas, mal formação de flores e ausência de frutos, também foram submetidas a análise anatômica de suas folhas.

13.5 ANÁLISE ANATÔMICA

13.5.1 Densidade estomática

Foi realizada a “impressão digital” usando esmalte de unha transparente da marca Risqué® para determinar a densidade estomática por mm². Para tanto, foi aplicada uma camada de esmalte sobre a epiderme abaxial da folha e após 15 minutos, a película foi removida com o auxílio de uma lâmina bisturi e montada em água destilada e deionizada (DDA). As imagens foram capturadas por meio câmera acoplada a microscópio invertido (Modelo Axio Image Carl Zeiss, Alemanha) e a um computador.

13.5.2 Contagem de cloroplastos por célula-guarda

Foram amostradas duas folhas de cada planta, das quais, seções paradérmicas feitas à mão da epiderme abaxial foram obtidas com o auxílio lâmina de barbear. A preparação foi montada em lâminas para posterior observação microscópica. As imagens foram obtidas do mesmo modo descrito acima. A determinação do número de cloroplastos por célula-guarda foi realizada a partir das imagens capturadas, obtidas com lente objetiva de 50x. Para cada folha, quatro campos de 1 mm² foram amostrados aleatoriamente. O tamanho dos estômatos e o número de cloroplastos por célula-guarda foi determinado no aumento de 50x via o software ImageJ®.

13.6 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Pontas de raízes de pimenteiras (*Capsicum annuum*) cultivadas em vasos foram coletadas, lavadas em água de torneira, pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 24 h a 10 °C, fixadas em Carnoy (etanol/ácido acético 3:1 v/v) por 2h-24h em temperatura ambiente e, posteriormente, armazenadas a -20 °C. Em seguida, as pontas de raízes foram lavadas em água destilada e digeridas em solução enzimática contendo 2% de celulase e 20% de pectinase (p/v) por 1 h a 37°C. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em ácido acético a 60%

(Guerra e Souza 2002). As melhores lâminas foram selecionadas e coradas com 10 μ L de DAPI (4,-6-diamidinino-2-fenilindol) com meio de montagem glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio de epifluorescência Carl Zeiss® (Alemanha) equipado com câmera de vídeo AxioCam MRC5 com o auxílio do software Axiovision 4.8.

13.7 ANÁLISE DE DADOS

Os dados coletados foram analisados estatisticamente com o uso do software R Studio® e o pacote “ExpDes.pt” para a análise de variância e teste de média de Scott-Knott e de regressão ao nível de 5% de probabilidade (Ferreira et al. 2018; RStudio Team, 2020). As tabelas e os gráficos foram elaborados no Excel 2021® e no SigmaPlot 10.0®, respectivamente.

14 RESULTADOS

A análise de variância revelou diferenças significativas para a característica taxa de sobrevivência de plântulas em relação as interações dos fatores genótipos e concentrações (G x C) e concentrações e tempos de exposição (C x T) ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$) (Tab. 1). Foi observado que o tratamento de sementes de *C. annuum* com orizalina e trifluralina influenciou na sobrevivência de plântulas, e que isto depende das combinações do genótipo, da dose usada, e do tempo de exposição aos quais as sementes foram submetidas.

Tabela 1 Análise de variância para taxa de sobrevivência de plântulas de três genótipos de pimenteiros submetidos a doses de orizalina

FV	GL	Taxa de Sobrevivência	
		Orizalina	Trifluralina
Genótipo (G)	2	1,06**	0,01 ^{ns}
Concentração (C)	4	1,28**	1,72**
Tempo de Exposição (T)	3	0,15**	0,50**
G x C	8	0,12**	0,07**
G x T	6	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}
C x T	12	0,11**	0,16**
G x C x T	24	0,02 ^{ns}	0,02 ^{ns}
Resíduo	240	0,04	0,02
Total	299	-	-
CV (%)		21,94	16,26

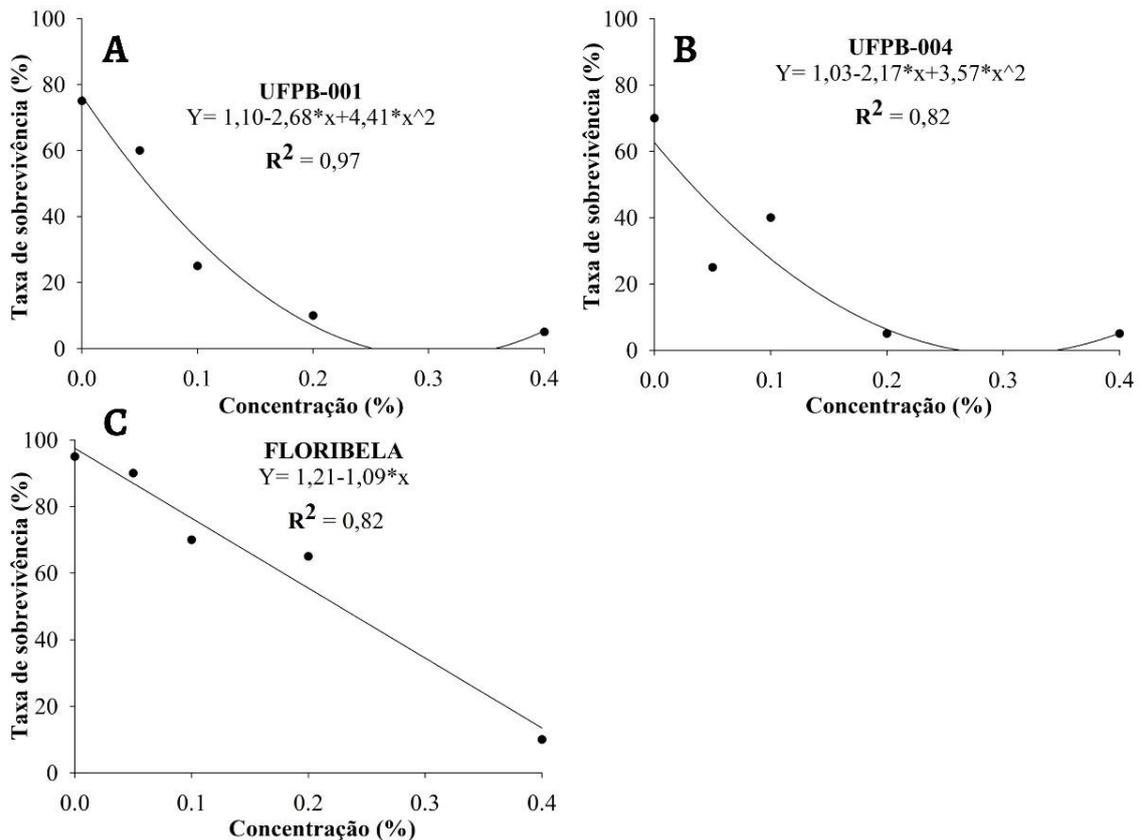
Legenda: **Significância estatística ao nível de 1% de probabilidade, ^{ns}Não significativo ($p > 0,05$)

Verificou-se que os genótipos (G), concentrações (C) e tempos de exposição (TE) interferem significativamente na taxa de sobrevivência de plântulas obtidas de sementes tratadas com orizalina, no entanto, apenas fatores C e TE exercem algum efeito sobre a variável taxa de sobrevivência de plântulas quando tratadas com trifluralina.

Para os desdobramentos das interações, observou-se que a taxa de sobrevivência das plântulas variou em função das doses aplicadas e inversamente proporcional ao aumento das doses, explicando o comportamento diferenciado dos genótipos (Fig. 1). O modelo de regressão mostrou-se adequado com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 80% nos genótipos UFPB-001, UFPB-004 e Floribela (Fig. 1), contudo, o modelo de melhor ajuste foi o quadrático para os acessos do BAG/UFPB (Figs. 1A e 1B), e linear para a cultivar comercial (Fig. 1C). Os modelos de regressão validam a hipótese de que o aumento na concentração de orizalina leva a uma redução acentuada na sobrevivência de plântulas a partir da dose de 0,2% nos genótipos UFPB, no entanto, essa a cv. Floribela mostrou-se mais tolerante aos efeitos tóxicos da orizalina, e por este motivo, havendo apenas uma redução considerável na maior concentração adotada (0,4%).

A trifluralina foi mais tóxica aos genótipos avaliados, com redução na taxa de sobrevivência de plântulas de pimenteiras a partir da dose 0,05% em relação ao controle. A letalidade foi observada já na concentração de 0,1% de trifluralina, embora tenha-se registrado a formação de plântulas na concentração de 0,4%, em taxa reduzida para todos os genótipos. A Floribela foi mais sensível aos efeitos tóxicos da trifluralina que os demais genótipos, não repetindo a resposta visualizada na sua interação com a orizalina (Anexo I).

Fig. 1 Taxa de sobrevivência de três genótipos de *C. annuum* submetidos a concentrações de orizalina.



As combinações entre concentrações e tempos de exposição adotadas, permitem inferir que, ocorre redução na sobrevivência de plântulas a medida em que a concentração de orizalina aumenta em todos os tempos de exposição utilizados (Fig. 2), entretanto, conforme o tempo de exposição ao agente indutor é prolongado há uma tendência de queda proeminente a partir da dose de 0,1% em períodos de exposição superiores a 48 horas. A análise de regressão explica a variância existente nas interações de concentrações e tempos de exposição, com comportamento similares, à medida que a concentração aumenta, há um declínio na taxa de sobrevivência das plântulas ao longo do tempo (Figs. 2A-D).

Fig. 2 Taxa de sobrevivência de pimenteiros submetidas a concentrações de orizalina por diferentes tempos de exposição.

A taxa de sobrevivência foi influenciada pela interação positiva ($p < 0,01$) entre concentrações e tempos de exposição a trifluralina. A exposição de sementes de pimenteiros a doses de trifluralina por período superior a 24 horas, considerou-se tóxica a sobrevivência de plântulas desde a concentração de 0,05% em relação ao controle, não havendo diferença estatística entre as concentrações de 0,1%, 0,2% e

0,4% associados aos tempos de 48, 72 e 96 horas de exposição. Entretanto, a maior concentração (0,4%), igualou a taxa de sobrevivência no comparativo com o controle na exposição por 24h, enquanto concentrações menores (0,1% e 0,2%) ocasionaram efeitos letais sobre esta variável (Anexo II).

14.1 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE POLIPLÓIDES

Não foi verificada diferenças estatísticas ($p > 0,05\%$) na taxa de indução de poliplóides de pimenteiros (*C. annuum*), no entanto, a orizalina possibilitou a formação de três plantas poliplóides (Tab.2), um de cada genótipo avaliado. Não foi registrado nenhuma planta poliplóide induzida artificialmente via trifluralina, ainda que sejam encontradas várias modificações morfológicas induzidas pelos dois agentes indutores de poliploidia.

Tabela 2 Indução de poliplóides de três genótipos de pimenteiros submetidos a doses de orizalina

Tratamento	Concentração (%)	Duração do tratamento (h)	Genótipos					
			UFPB 001		UFPB 004		FLORIBELA	
			Diplóides	Tetraplóides	Diplóides	Tetraplóides	Diplóides	Triplóides
Controle	0,00	24	5	-	4	-	5,00	-
		48	4	-	4	-	5,00	-
		72	3	-	3	-	5,00	-
		96	3	-	3	-	4,00	-
Orizalina	0,05	24	2	-	1	-	5,00	-
		48	2	-	1	-	4,00	-
		72	4	-	2	-	5,00	-
		96	4	-	1	-	4,00	-
	0,1	24	2	-	3	-	5,00	-
		48	3	1 (33,33%)	3	-	5,00	-
		72	0	-	1	1 (50,00%)	3,00	-
		96	0	-	0	-	1,00	-
	0,2	24	2	-	1	-	3,00	-
		48	0	-	0	-	3,00	-
		72	0	-	0	-	2,00	1 (33,33%)
		96	0	-	0	-	4,00	-
	0,4	24	1	-	1	-	1,00	-
		48	0	-	0	-	0,00	-
		72	0	-	0	-	0,00	-
		96	0	-	0	-	0,00	-

Legenda: PE: Porcentagem de emergência (%) e TLR: Taxa de letalidade relativa (%).

Letras diferentes na coluna representam diferença estatística significativa.

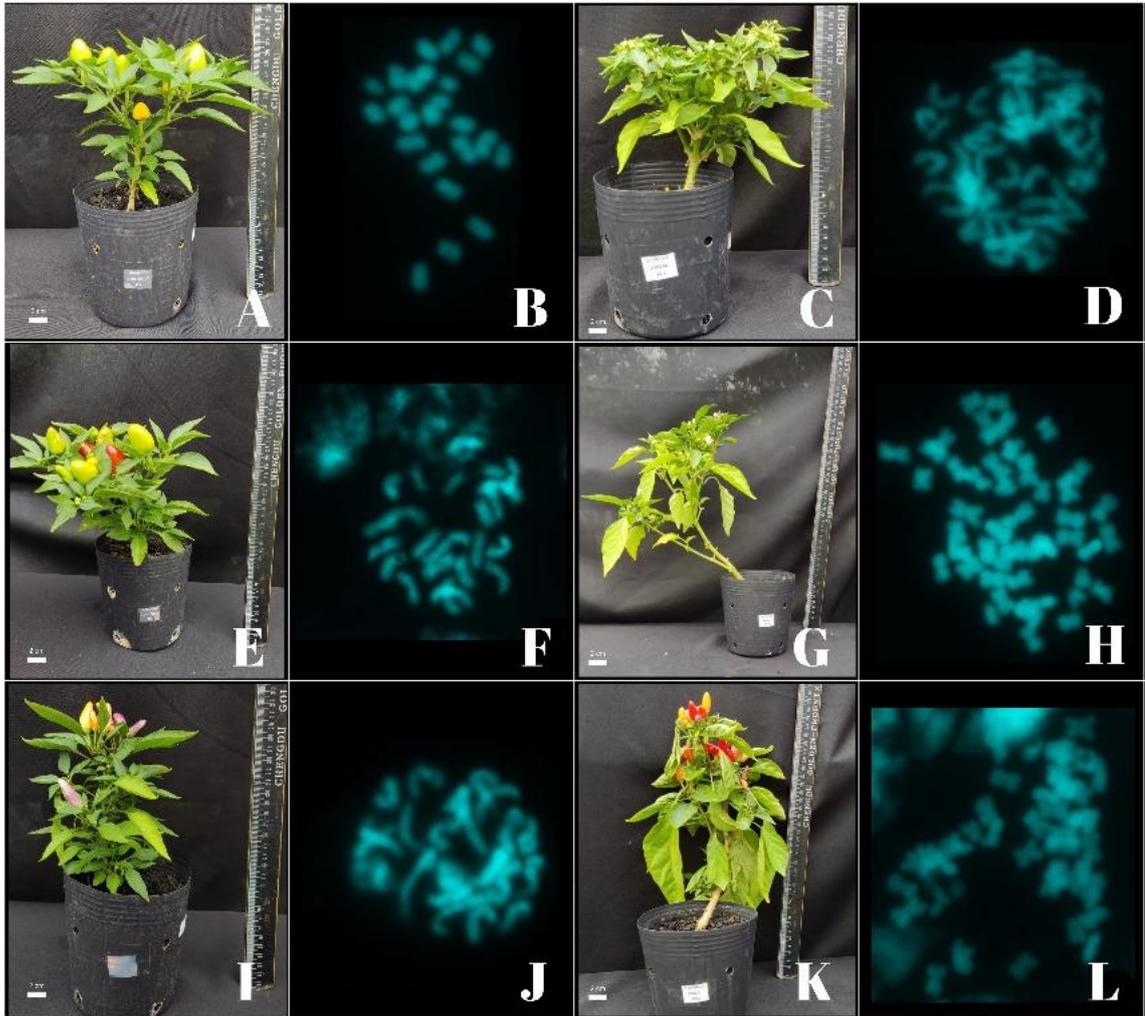
A taxa de indução de poliploides variou de 33,33% a 50% (Tab. 2). Foram produzidos uma planta triplóide da cv. Floribela (0,2% + 72h de exposição), e dois tetraplóides, dos acessos UFPB-001 (0,1% de orizalina + 48h de exposição) e UFPB-004 (0,1% de orizalina + 72h de exposição).

14.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Sementes expostas as doses de 0,1% de orizalina por 48 e 72 horas possibilitaram a formação de plantas tetraplóides de UFPB-001 (Fig. 3C e 3D) e UFPB-004 (Fig. 3G e 3H), respectivamente. Foi induzido a formação de uma planta triplóide da cultivar Floribela (Fig. 3K e 3L) na dose de 0,2% aliado a um tempo de exposição de 48h.

Os genótipos controles UFPB-001 (Fig. 3A e 3B), UFPB-004 (Fig. 3E e 3F) e Floribela (Fig. 3I e 3J) são diplóides e contém 24 cromossomos, contudo, o indivíduo triplóide e os dois tetraplóides correspondentes possuem 36 e 48 cromossomos, nesta ordem (Fig. 3). Desta forma, a partir deste estudo, recomenda-se doses de orizalina entre 0,1 e 0,2% para induzir poliploidia na espécie *C. annuum* e com tempo de exposição variando entre 48 e 72h. Novos estudos podem avançar nessa recomendação usando como base esses intervalos.

Fig. 3 Esporófito adulto ($2n$) e citogenética das plantas controles e dos poliplóides produzidos a partir de concentrações de orizalina.



Legenda: Controle – UFPB-001 (A e B), Tetraplóide – UFPB-001 (C e D), Controle – UFPB-004 (E e F), Tetraplóide – UFPB-004 (G e H), Controle – Floribela (I e J), Triplóide – Floribela (K e L).

14.3 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS MORFO-ANATÔMICAS

Características morfológicas

Não houve diferenças estatísticas no índice de forma da folha (comprimento/ largura da folha) entre os diplóides e poliplóides avaliados nesse estudo ($p < 0,05$), contudo, o comprimento e largura da folha (cm) foram maiores nos poliplóides em relação aos diplóides, exceto no tetraploide produzido, derivado da planta UFPB-001, que apresentou largura da folha similar aos genótipos controles (Tab. 3).

Tabela 3 Parâmetros foliares entre diplóides e poliplóides dos acessos UFPB-001, UFPB-004 e cultivar Floribela.

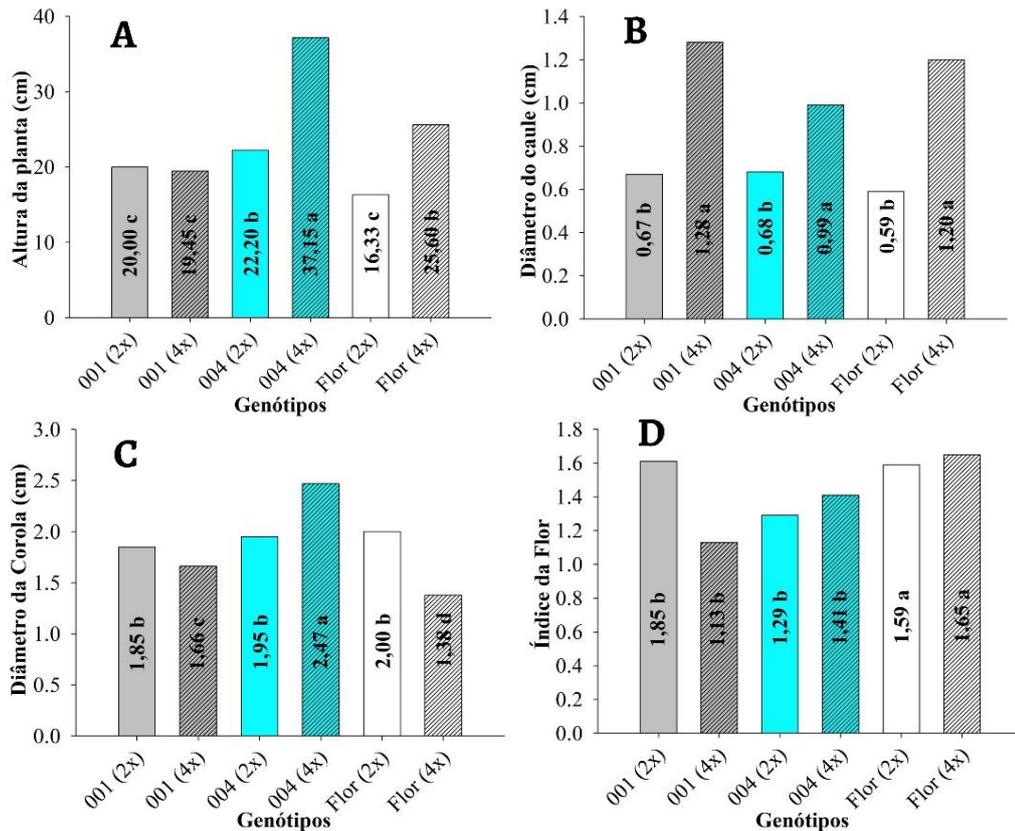
Acesso	2n	Comprimento da folha (cm)	Largura da Folha (cm)	Índice da Folha (cm)
Controle				
UFPB-001	2x = 24	4,46 c ± 0,60	1,73 b ± 0,30	2,59 ± 0,15
UFPB-004	2x = 24	4,01 c ± 0,62	1,71 b ± 0,17	2,34 ± 0,16
FLORIBELA	2x = 24	4,78 c ± 0,91	2,03 b ± 0,34	2,45 ± 0,81
Oryzalina				
UFPB-001 0,10% (48h)	4x = 48	6,65 b ± 0,56	2,42 b ± 0,38	2,78 ± 0,33
UFPB-004 0,10% (72h)	4x = 48	8,37 a ± 1,23	3,15 a ± 0,87	2,76 ± 0,51
FLORIBELA 0,20% (48h)	3x = 36	8,63 a ± 1,68	3,38 a ± 0,39	2,56 ± 0,44

Legenda: Letras diferentes na coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A altura da planta variou de 16,33 a 37,15 cm nas plantas avaliadas, e esse intervalo evidenciou a diferença significativa encontrada (Fig. 4). Assim, os poliplóides possuem uma maior altura em relação aos indivíduos diplóides, exceto para o tetraploide produzido a partir do acesso UFPB-001, que não diferiu estatisticamente do seu controle (Fig. 4A).

O maior diâmetro do caule foi observado nos três poliplóides ao serem comparados aos controles diplóides, e isso corrobora com o efeito “Gyga” proporcionado pelo aumento de ploidia (Fig. 4B). Entretanto, apenas o tetraploide UFPB-004 (0,10% por 72h) produziu flores de diâmetro da corola superior, enquanto notavelmente houve uma redução nessa característica nos outros poliplóides na comparação com os respectivos controles (Fig. 4C).

Fig. 4 Características morfoagronômicas de diplóides e poliplóides de pimenteiras ornamentais.



Legenda: Letras diferentes nas barras representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Características anatômicas

A densidade estomática foi reduzida significativamente nos tetraplóides ($2n = 4x$) em comparação com os indivíduos diplóides ($2n = 2x$), contudo, o mesmo comportamento não foi observado para o indivíduo triploide ($2n = 3x$) (Tab. 4). Os poliplóides formados apresentaram área estomática superior aos tratamentos controles (diplóides), e isto evidencia aumentos na ordem de 19,3%, 31,5% e 14,55% para UFPB-001, UFPB-004 e Floribela, respectivamente (Tab. 4).

Tabela 4 Parâmetros estomáticos entre diplóides e poliplóides dos acessos UFPB-001, UFPB-004 e cultivar Floribela.

Acesso	$2n$	Densidade estomática (estômatos/mm)	Área estomática (μm^2)	Comprimento do estômato (μm)	Largura do estômato (μm)
Controle					
UFPB-001	$2x = 24$	101,10 a \pm 11,03	1030,51 c \pm 58,21	43,08 c \pm 1,59	30,75 b \pm 1,33
UFPB-004	$2x = 24$	84,72 b \pm 7,12	852,96 e \pm 11,79	41,09 c \pm 1,70	28,86 b \pm 1,55
FLORIBELA	$2x = 24$	111,07 a \pm 8,38	957,69 d \pm 23,02	43,53 c \pm 0,92	29,60 b \pm 0,56
Oryzalina					

UFPB-001 0,10% (48h)	4x = 48	91,13 b \pm 6,15	1277,14 a \pm 46,55	50,77 a \pm 1,85	33,18 a \pm 1,68
UFPB-004 0,10% (72h)	4x = 48	42,01 c \pm 9,41	1244,76 a \pm 31,86	51,19 a \pm 1,45	32,40 a \pm 1,24
FLORIBELA 0,20% (48h)	3x = 36	116,05 a \pm 10,24	1120,71 b \pm 20,43	45,96 b \pm 2,02	31,52 a \pm 1,05

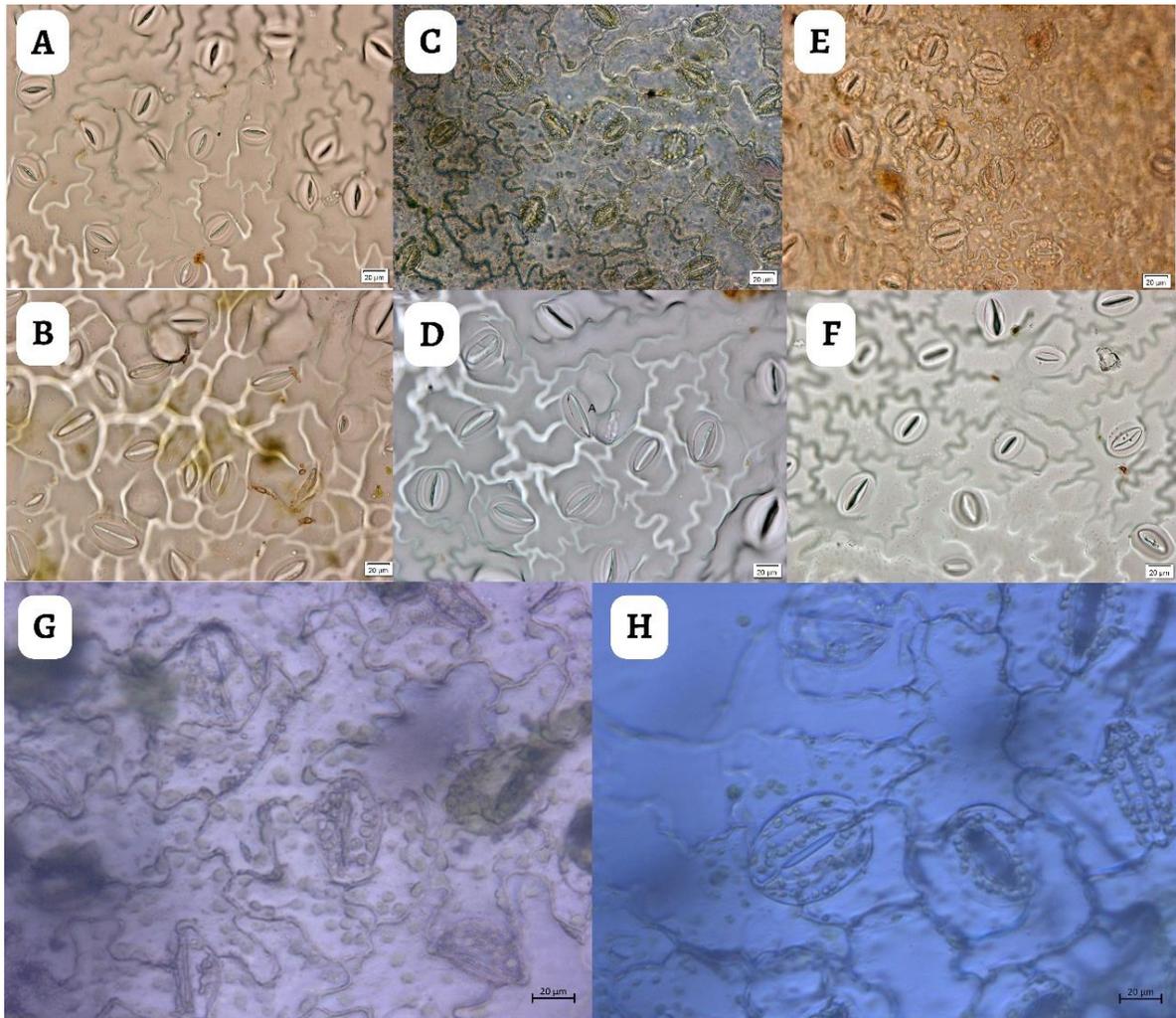
Legenda: Letras diferentes na coluna representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Ambos os tetraplóides produzidos apresentaram área estomática maior que o triplóide, e isto é um indicativo de que o aumento do nível de ploidia também eleva a área estomática e conseqüentemente reduz a densidade estomatal em *C. annuum*. Novos estudos devem ser realizados para validar ou refutar esta hipótese.

Os indivíduos diplóides possuem um menor comprimento e a largura do estômato em comparação aos tetraplóides e triplóide induzidos neste estudo, no entanto, o comprimento do estômato foi maior nos tetraplóides em relação ao triplóide ($p < 0,05$). Na Fig. 5 é possível visualizar a diferença de tamanho e da densidade de estômatos em genótipos diplóides (Fig. 5A, 5C e 5E) e poliplóides de pimenteiros (Fig. 5B, 5D e 5F). Foram observados em média, 9 e 18 cloroplastos por célula-guarda em todos genótipos diplóides (Fig. 5G) e poliplóides (Fig. 5H), respectivamente.

Foi possível verificar um aumento de 15 a 20% no comprimento estomático na comparação entre indivíduos diplóides e poliplóides dos genótipos UFPB-001 e UFPB-004 (Fig. 5), entretanto, verificou-se um aumento relativamente menor (5,2%) na comparação entre o diplóide e o triplóide, e isto é mais um indicador da existência de uma relação direta entre o aumento no nível de ploidia e do tamanho estomático.

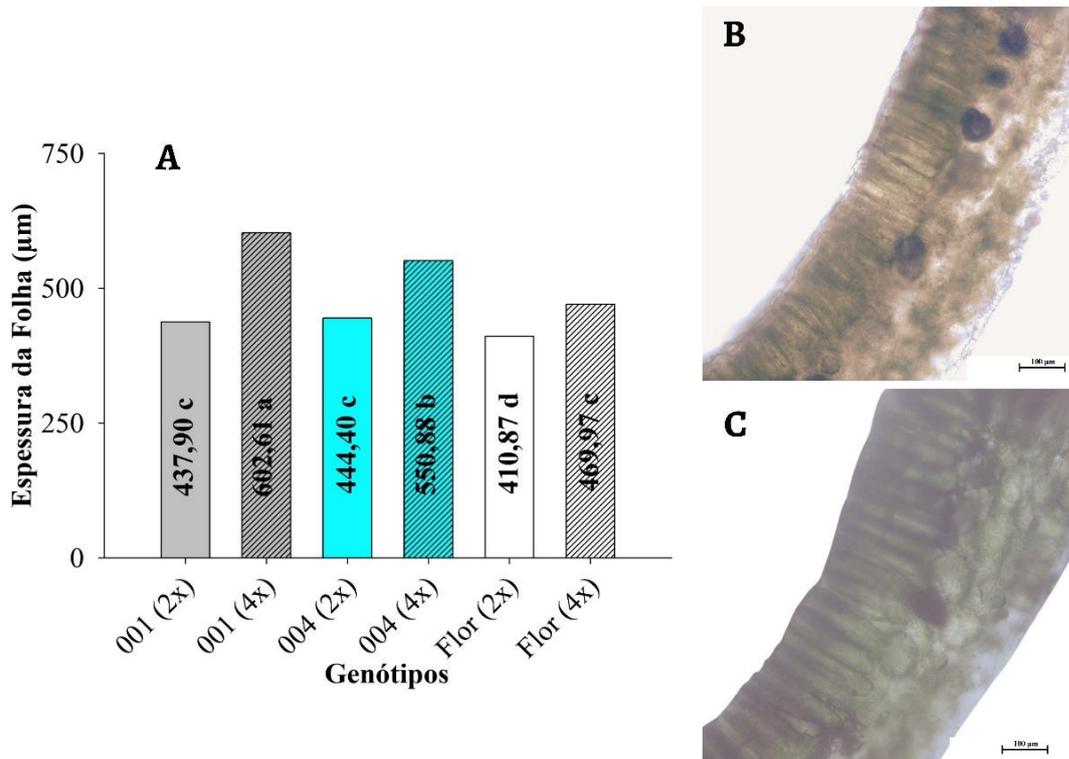
Fig. 5 Tamanho, densidade dos estômatos, e número de cloroplastos por célula-guarda na epiderme inferior da folha de diplóides (A, C, E e G) e poliplóides (B, D, F e H) de pimenteiros cultivadas em casa de vegetação.



Legenda: Controle – UFPB-001 (A), Tetraploide – UFPB-001 (B), Controle – UFPB-004 (C e G), Tetraploide – UFPB-004 (D e H), Controle – Floribela (E), Triplóide – Floribela (F).

Os poliplóides possuem uma maior espessura da folha ao serem comparados com os controles originais (Fig. 6), de aspecto coriácea no tetraploide (Fig. 6C) originado a partir do acesso UFPB-001 (Fig. 6B), diferindo estatisticamente dos demais (Fig. 6A). A espessura da folha da planta derivada da cultivar Floribela foi inferior aos outros controles, e isso demonstra que as folhas deste genótipo diplóide são naturalmente mais delicadas e finas, no entanto, a espessura do triploide diferiu do controle na cv. Floribela.

Fig. 6 Análise comparativa da espessura folha (μm) entre diplóides e poliplóides de *C. annuum*



Legenda: Letras diferentes nas barras representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

15 DISCUSSÃO

A utilização de agentes indutores de poliploidia é uma técnica importante para reduzir o tempo de obtenção de cultivares melhoradas (Iannicelli et al. 2020), embora em alguns casos, esses produtos causem efeitos fitotóxicos às células, tecidos e órgãos das plantas, inclusive, ampliando a variabilidade genética existente (Touchell, Palmer e Ranney 2020) e, permitindo a seleção de genótipos superiores. A identificação da melhor combinação entre o agente antimitótico e o tempo de exposição proporciona maior eficiência na poliploidização artificial e triagem mais rápida da espécie e/ou genótipo trabalhados (Niazian e Nalouisi 2020).

A colchicina é um agente antimitótico muito utilizado na indução de poliploidia em diversas espécies da família solanácea como a *Solanum lycopersicum* (Cola et al. 2014), *Solanum melongena* (Basay et al. 2011), *Solanum tuberosum* (Swaminathan 1951), *Capsicum annuum* (Selvakumar et al. 2022), contudo, a elevada toxicidade ao meio ambiente, aos seres humanos e outros animais tem levado a uma procura por alternativas de menor potencial tóxico e também de maior eficácia, dentre elas, alternativas estudadas são a orizalina e trifluralina (Mir et al. 2021). Estudos demonstram que a orizalina e trifluralina possuem uma menor toxicidade, maior afinidade com as tubulinas vegetais e eficácia superior na indução de poliplóides com

o uso de menores doses em comparação com a colchicina (Touchell et al. 2020), sendo assim, mais viáveis economicamente do que a colchicina (Ahmadi e Ebrahimzadeh 2020).

A orizalina induziu a formação de tetraplóides e de um triplóide de pimenteiras ornamentais e isso comprova a viabilidade e eficácia desse agente indutor na poliploidização de *C. annuum*, corroborando com Sánchez et al. (2020) que observaram maior eficácia na duplicação cromossômica e formação de duplo-haploides de pimentão (*C. annuum*) em comparação com a colchicina. A trifluralina não levou a formação de indivíduos poliplóides de pimenteiras, entretanto, Denaeghel et al. (2015) demonstraram que a trifluralina é um importante indutor de poliploidia em plantas ornamentais como a **Escallonia** sp., sendo mais eficaz que a orizalina e colchicina. Além disso, Faleiro et al. (2016) conseguiram elevar o nível de ploidia de híbridos interespecíficos de capim elefante e milho com o uso da trifluralina, contudo, o presente estudo traz à tona a ineficácia da trifluralina na indução de poliplóides de *C. annuum* nas condições testadas.

Caules mais espessos são desejados em programas de melhoramento de ornamentais, pois permitem maior transporte de solutos e açúcares, mais sustentação da parte aérea, assim, evita o tombamento das plantas ornamentais em vaso durante o transporte. Outra possibilidade é seu uso como porta-enxerto em virtude do maior vigor e eficiência no transporte do xilema e floema (Chaicharoen, Satrabhandhu e Kruatrachue, 1995; Ramsey e Ramsey, 2014; Hassanzadeh, Zakaria e Azad, 2020).

O tamanho dos estômatos é um método eficaz na identificação de poliplóides de várias plantas (Yan et al. 2022), contudo, não houveram diferenças significativas no comprimento e a largura dos estômatos e células-guarda da pimenteira Katokkon (*C. annuum*) tratados com colchicina (Tammu et al. 2021), ainda assim, este método foi eficaz para identificar poliplóides de três genótipos de *C. annuum* neste estudo. O aumento na área estomática e a redução na densidade estomática nos poliplóides em relação aos diplóides verificados nesta pesquisa corroboram com os resultados encontrados por Azeez et al. (2019) em espécies diplóides e poliplóides de *Physalis* spp.

A espessura da folha e o número de cloroplastos por célula-guarda também servem como indicativo de poliploidização em diversas espécies como *Kaempferia rotunda* (Soonthornkalump et al. 2016), *Musa* sp. (Madail et al. 2022) e *Dendrobium cariniferum* (Zhang e Gao 2021) esta hipótese também foi validada para os genótipos

de *C. annuum* testados na presente pesquisa, pois os poliplóides apresentaram maior espessura foliar e maior número de cloroplastos ($p < 0,01$) em relação aos diplóides.

Os resultados encontrados reforçam a hipótese de que existe uma maior eficiência da orizalina na produção de poliplóides de *C. annuum*, tendo em vista que, Tammu et al. (2020) não conseguiu produzir poliplóides de pimenteira Katokkon com o uso da colchicina, assim como como Kùlahlioylu & Çürük (2017) que utilizando colchicina e orizalina como indutores de poliploidia em duas cultivares berinjela, outra solanácea, demonstraram maior eficácia da orizalina na poliploidização desta espécie.

A interação entre genótipos e concentrações de orizalina e trifluralina devem ser consideradas na determinação de protocolos eficazes no processo de poliploidização de *C. annuum*, como também, as combinações entre concentrações e tempos de exposição ao se trabalhar com sementes como explantes. A trifluralina é mais tóxica às sementes dos genótipos estudados, e quando associada a períodos longos de exposição reduz consideravelmente a sobrevivência de plântulas de pimenteiras ornamentais, necessitando de novos estudos para avaliar períodos de tempo inferiores a 24 horas para analisar a eficácia na indução de poliplóides com o uso de trifluralina.

A variabilidade de características morfo-anatômicas observadas neste estudo, favorece a ampliação da diversidade disponível e otimização do programa de melhoramento genético de pimenteiras da Universidade Federal da Paraíba, tendo em vista que, a superioridade observada em poliplóides vem sendo o alvo de melhoristas desde o século XX para diversas espécies de plantas, particularmente as ornamentais (Sattler et al. 2016), e por este motivo, várias pesquisas visam incrementar a variabilidade existente por meio da poliploidização, com o intuito de utilizar esses novos genótipos na identificação e introdução de características interesse em cultivares elites, como tolerância a seca em cultivares em mutantes de *C. annuum* induzidos por colchicina (Maryam e Aminu 2022) e ao calor em tetraplóides de *Asparagus officinalis* (Chen et al. 2020), e na resistência a nematoides em hexaplóides de *Ipomoea batatas* (Obata et al. 2022), entre outras.

16 CONCLUSÃO

A técnica de indução de poliplóides adotada nesse estudo foi eficaz para o sucesso da poliploidização de *C. annuum*, e que os tratamentos de 0,10% de orizalina por 48 e 72 horas de exposição favoreceu a tetraploidização de acessos de UFPB-001 e UFPB-004, respectivamente. Além disso, o tratamento 0,20% por 48h

possibilitou a produção de um triploide da cultivar comercial Floribela. Os poliplóides produzidos nesse estudo são genótipos valiosos e devem ser incorporados ao programa de melhoramento de pimenteiros ornamentais da Universidade Federal da Paraíba e também contribuir como referência para novos trabalhos com o melhoramento genético de pimenteiros (*C. annuum*).

17 REFERÊNCIAS

- Ahmadi, B., & Ebrahimzadeh, H. (2020). In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant cell reports**, 39(3), 299-316.
- Azeez, S. O., Faluyi, J. O., & Oziegbe, M. (2019). Cytological, foliar epidermal and pollen grain studies in relation to ploidy levels in four species of *Physalis* L.(Solanaceae) from Nigeria. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, 13(4), 1960-1968.
- Başay, S., Şeniz, V., & Ellıaltıođlu, Ş. (2011). Obtaining dihaploid lines by using anther culture in the different eggplant cultivars. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 9(2 part 1), 188-190.
- Blasco, M., Badenes, M.L. & Naval, M.d.M. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 120, 453–461 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0612-3>
- Borém, A., Miranda, G. V., & Fritsche-Neto, R. (2021). **Melhoramento de plantas**. Oficina de Textos.
- Casian Junior, J. C., Rodrigues, V. A. P., Soares, I. F. G., de Almeida, R., Mauricio, L. S., Paula, F. C., ... & Moulin, M. M. (2021). Avaliação da diversidade genética de *Capsicum* spp. Com base em descritores morfoagronômicos e bromatológicos. **Revista Ifes Ciência**, 7(1), 01-11.
- Chaicharoen, S., Satrabhandhu, A. R. I. Y. A., & Kruatrachue, M. (1995). In vitro induction of polyploidy in white mulberry (*Morus alba* var. S54) by colchicine treatment. **J. Sci. Soc. Thailand**, 21, 229-242.
- Chambhare, M. R., & Nikam, T. D. (2021). In vitro induction and assessment of tetraploid plants from shoot cultures of diploid Niger (*Guizotia abyssinica* (Lf) Cass.): a multipurpose oilseed crop. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-13.
- Chen, H., Lu, Z., Wang, J., Chen, T., Gao, J., Zheng, J., ... & Yi, K. (2020). Induction of new tetraploid genotypes and heat tolerance assessment in *Asparagus officinalis* L. **Scientia Horticulturae**, 264, 109168.
- Cola, G. P. A., Marques, A. M., Damasceno, S., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2014). In Vitro Polyploidization in *Solanum lycopersicum* Mill. 'Santa Cruz Kada Gigante'. **Cytologia**, 79(3), 351-358.

Costa, L. S., da Silva, L. D. S. N., da Silva Filha, C. M. R., dos Santos, J. F. F., & Silva, R. N. O. (2020). Caracterização de genótipos de *Capsicum* spp. por técnicas multivariadas no sul do Piauí. **Brazilian Journal of Development**, 6(12), 97371-97385.

Dagnoko, S., Yaro-Diarisso, N., Sanogo, P. N., Adetula, O., Dolo-Nantoumé, A., Gamby-Touré, K., Traoré-Théra, A., Katilé, S., & Diallo-Ba, D. (2013). Overview of pepper (*Capsicum* spp.) breeding in West Africa. **African Journal of Agricultural Research**, 8(13), 1108-1114.

Denaeghel, H., Van Laere, K., Leus, L., Van Huylenbroeck, J., & Van Labeke, M. C. (2015, June). **Induction of Tetraploids in *Escallonia* spp.** In *XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders 1087* (pp. 453-458).

Eeckhaut, T., Veken, J. V. D., Dhooghe, E., Leus, L., Laere, K. V. & Huylenbroeck, J. V. (2018). **Ploidy breeding in ornamentals.** In: Huylenbroeck, J. V., *Ornamental crops* (pp. 145-173). Springer, Boston, MA.

Faleiro, F. G., Kannan, B., & Altpeter, F. (2016). Regeneration of fertile, hexaploid, interspecific hybrids of elephantgrass and pearl millet following treatment of embryogenic calli with antimetabolic agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 124, 57-67.

Ferreira, E. B., Cavalcanti, P. P., Nogueira, D. A., & Ferreira, M. E. B. (2018). **Package 'ExpDes. pt'**.

Fu, L., Zhu, Y., Li, M. *et al.* Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 139, 237–248 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01671-x>

Furlani, P. R., Silveira, L. C. P., Bolonhezi, D., & Faquin, V. (1999). **Cultivo hidropônico de plantas** (Vol. 180). Campinas: Instituto Agronômico.

Gantait, S., & Mukherjee, E. (2021). Induced autopolyploidy—a promising approach for enhanced biosynthesis of plant secondary metabolites: an insight. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 19, 1-13.

Grubben, G. J. H., & El Tahir, I. M. (2004). *Capsicum annum* L. *PROTA*, 2, 154-163.
Grubben, G. J. H., El Tahir, I. M. (2004). *Capsicum annum* L. In: Grubben, GJH & OA Denton (eds.). *PROTA 2: Vegetables/Légumes*. [CDRom]. PROTA, Wageningen, The Netherlands.

Guerra, M., Souza, M. J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ed. 1. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2002. 131p.
Harlan, J. R., & De Wet, J. M. (1975). On Ô. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *The botanical review*, 41, 361-390.

- Hassanzadeh, F., Zakaria, R. A., & Azad, N. H. (2020). Polyploidy induction in *Salvia officinalis* L. and its effects on some morphological and physiological characteristics. **Cytologia**, 85(2), 157-162.
- Heiser CB Jr (1979) Peppers— *Capsicum* (Solanaceae). In: Simmonds NW (ed) **Evolution of crop plants**. Longman, New York, pp 265–273.
- Jiang, Y., Liu, S., Hu, J. *et al.* Polyploidization of *Plumbago auriculata* Lam. in vitro and its characterization including cold tolerance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 140, 315–325 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01729-w>
- Külahlıoğlu, İ., & Çürük, S. (2017). Effect of Different Oryzalin and Colchicine Applications in Liquid Medium on Tetraploid Plant Production in Eggplant. **Journal of Applied Biological Sciences**, 11(3), 42-47.
- Kulkarni, M., & Borse, T. (2010). Induced polyploidy with gigas expression for root traits in *Capsicum annuum* (L.). **Plant Breeding**, 129(4), 461-464.
- Lima Junior, J. C., Nakatani, J. K., Monaco Neto, L. C., Lima, L. A. C. V., Kalaki, R. B., & Camargo, R. B. (2022). **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. IBRAFLORE & MAPA: Brasil. 132p.
- Lutz, A. M. (1907). A preliminary note on the chromosomes of *Oenothera lamarckiana* and one of its mutants, *O. gigas*. *Science*, 26(657), 151-152.
- Madaíl, R. H., Pio, L. A. S., Rezende, R. A. L. S., Pasqual, M., & Silva, S. D. O. (2022). Banana leaf anatomy characteristics related to ploidy levels. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 44.
- Maryam, M. G., & Aminu, Y. (2022). Response of two varieties of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) to mutation and seasonal variations. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, 13(1), 42-45.
- Mir, R., Calabuig-Serna, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2021). Doubled haploids in eggplant. **Biology**, 10(7), 685.
- Miri, S. M. (2020). Artificial polyploidy in the improvement of horticultural crops. **Journal of Plant Physiology and Breeding**, 10(1), 1-28.
- Obata, N., Tabuchi, H., Kurihara, M., Yamamoto, E., Shirasawa, K., & Monden, Y. (2022). Mapping of nematode resistance in hexaploid sweetpotato using a next-generation sequencing-based association study. **Frontiers in Plant Science**, 13.
- Ramsey, J., & Ramsey, T. S. (2014). Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, 369(1648), 20130352.
- Ranney, T. G. (2006). **Polyploidy**: From evolution to new plant development. In *Combined proceedings international plant propagators' society* (Vol. 56, pp. 137-142).

Regalado, J.J., Carmona Martín, E., Castro, P. *et al.* Study of the somaclonal variation produced by different methods of polyploidization in *Asparagus officinalis* L.. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 122, 31–44 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0747-x>

Rêgo, E. R.; Rêgo, M. M. (2016). **Genetics and Breeding of Chili Pepper** *Capsicum* spp. In *Production and breeding of chilli peppers (Capsicum spp.)* (pp. 57-80). Springer, Cham.

Rodrigues, C. A. P. S., do Rêgo, M. M., dos Santos Pessoa, A. M., da Silva Sousa, E., & do Rêgo, E. R. (2023). RAPD markers in the discrimination of genetic variability in ornamental peppers. **Comunicata Scientiae**, 14, e3709-e3709.

Rodriguez, D. J. (1996). A model for the establishment of polyploidy in plants. **The American Naturalist**, 147(1), 33-46.

RStudio Team (2020). **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, PBC, Boston, MA URL.

Sánchez, M. A., Coronado, Y. M., & Coronado, A. C. M. (2020). Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in *Capsicum* spp. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, 73(1), 9047-9056.

Sattler, M. C., Carvalho, C. R., & Clarindo, W. R. (2016). The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, 243, 281-296.

Selvakumar, R., Manjunathagowda, D. C., & Singh, P. K. (2022). **Capsicum: Breeding Prospects and Perspectives for Higher Productivity**. *Capsicum-New Perspectives*.

Soonthornkalump, S., Chuenboonngarm, N., Jenjittikul, T., Thammasiri, K., & Soontornchainaksaeng, P. (2017). Morphological and stomatal guard cell characteristics of in vitro *Kaempferia rotunda* L. (Zingiberaceae) through colchicine induced polyploidy. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, 14(3), 235-242.

Sousa, W. R. D. N., Lopes, A. C. D. A., Carvalho, R. D., Gomes, R. L. F., & Peron, A. P. (2015). Karyotypic characterization of *Capsicum* sp. accessions. **Acta Scientiarum. Agronomy**, 37, 147-153.

Swaminathan, M. S. (1951). Notes on induced polyploids in the tuber-bearing *Solanum* species and their crossability with *Solanum tuberosum*. **American potato journal**, 28, 472-489.

Tammu, R. M., Nuringtyas, T. R., & Daryono, B. S. (2021). Colchicine effects on the ploidy level and morphological characters of Katokkon pepper (*Capsicum annum* L.) from North Toraja, Indonesia. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 19, 1-8.

Touchell, D. H., Palmer, I. E., & Ranney, T. G. (2020). In vitro ploidy manipulation for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, *11*, 722.

Udall, J. A., & Wendel, J. F. (2006). Polyploidy and crop improvement. **Crop Science**, *46*, S-3.

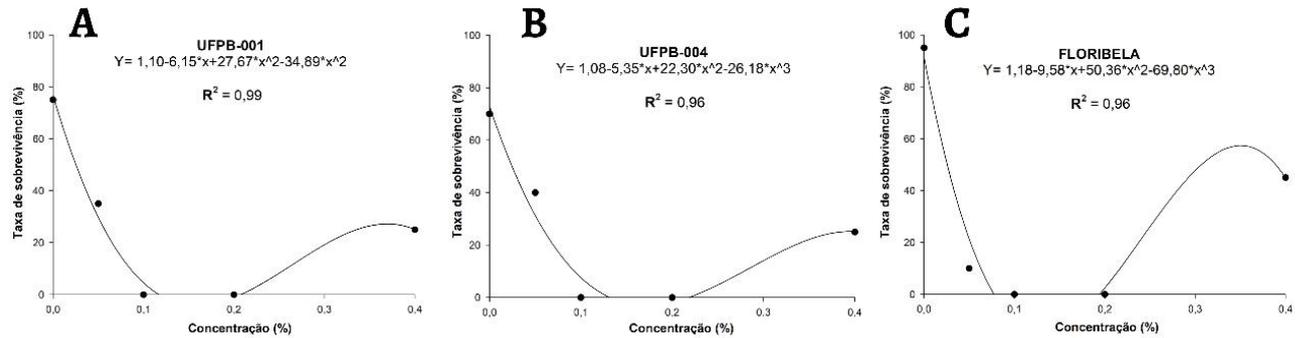
Wendel, J., & Doyle, J. (2005). **Polyploidy and evolution in plants**. In *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants* (pp. 97-117). Wallingford UK: CABI publishing.

Yan, Y. J., Qin, S. S., Zhou, N. Z., Xie, Y., & He, Y. (2022). Effects of colchicine on polyploidy induction of *Buddleja lindleyana* seeds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, *149*(3), 735-745.

Zhang, X., & Gao, J. (2021). Colchicine-induced tetraploidy in *Dendrobium cariniferum* and its effect on plantlet morphology, anatomy and genome size. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, *144*, 409-420.

7. Anexos

I. Taxa de sobrevivência de três genótipos de *C. annuum* submetidos a concentrações de trifluralina.



II. Taxa de sobrevivência de pimenteiras submetidas a concentrações de trifluralina por diferentes tempos de exposição.

