

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Germinação e cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Capsicum*

Mariane Rabelo Coelho Fernandes

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Germinação e cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Capsicum*

Mariane Rabelo Coelho Fernandes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Oliveira Nogueira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Germinação e cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Capsicum*

Mariane Rabelo Coelho Fernandes

Orientadora: Prof. Dr. Ana Paula Oliveira Nogueira
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela Coordenação do Curso de Biotecnologia em __/__/__.

Edgar Silveira
Coordenador

Uberlândia – MG
Dezembro - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Germinação e cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Capsicum*

Mariane Rabelo Coelho Fernandes

Aprovado pela banca examinadora em: 15/12/2017 Nota:100

Ana Paula Oliveira Nogueira
Presidente da Banca

Uberlândia, 15 de dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia e ao seu corpo docente que me proporcionou enorme fonte de conhecimento durante a graduação.

Ao Programa Ciência sem Fronteiras, pelo qual pude realizar um dos maiores desejos de minha vida, além de me promover enorme crescimento profissional e pessoal.

A minha orientadora, Prof. Dr. Ana Paula Oliveira, pelos seus ensinamentos, correções e suporte no pouco tempo que lhe coube.

Aos membros da banca, por compartilharem comigo suas experiências acadêmicas e conhecimento.

Ao colega de laboratório, Bruno, pelo apoio ao longo do último ano.

A sétima turma de biotecnologia, que além de companheiros de turma, se tornaram amigos inseparáveis, que espero ter pela vida toda.

Aos meus pais, minhas irmãs, familiares e amigos, pela paciência e por me motivarem ao longo desses 5 anos.

Ao meu afilhado, Enzo, por ser a luz da minha vida e me proporcionar infinitos momentos de alegria.

Ao meu namorado, Gabriel, pelo carinho, apoio e confiança depositados em mim no momento em que mais precisei.

Aos meus sogros e cunhados, pelo carinho demonstrado em tão pouco tempo.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

As pimentas cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça são representantes do gênero *Capsicum*, tendo como característica marcante a ardência. Neste trabalho objetivou-se avaliar as condições ideais de cultivo *in vitro*, visando a micropropagação destas espécies de pimentas. Para geração de fonte de explantes, avaliou-se a germinação *in vitro* de sementes, provenientes de frutos frescos e secos e a morfologia das plântulas geradas em diferentes concentrações de sais e sacarose do meio MS. A indução de calos (IC) e a área coberta por células de calos (ACCC) em explantes foliares e caulinares obtidos de plântulas de cumari-do-pará foi induzida mediante utilização de 2,4-D e BAP. Observou-se que a germinação de sementes e vigor de plântulas de cumari-do-pará é mais satisfatória em meio MS50% e 15 g L⁻¹ de sacarose. Para as pimentas malagueta e dedo-de-moça, sugere-se que estudos para aumento da taxa de germinação sejam realizados, para que estas sejam utilizadas como fonte de explantes. Já a IC% e a ACCC% em explantes caulinares e foliares foram maiores quando se utiliza 2,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente, sendo a presença de BAP desnecessária. Conclui-se que, para cumari-do-pará, os objetivos foram atingidos.

Palavras-chave: *Capsicum chinense* Jacquin.; *Capsicum frutescens* L.; *Capsicum baccatum*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	1
1.1.1. <i>Principais espécies de <i>Capsicum</i> no Brasil</i>	2
1.1.2. <i>Valor econômico e nutricional das pimentas</i>	3
1.1.3. <i>Capsaicinoides</i>	5
1.2. Cultura de tecidos <i>in vitro</i>	7
1.2.1. <i>Germinação de sementes <i>in vitro</i></i>	10
1.2.2. <i>Calogênese</i>	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Geral	12
2.2. Específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Local	13
3.2. Germinação de sementes de pimentas e análise da morfologia das plântulas	13
3.2.1. <i>Fonte de sementes e assepsia</i>	13
3.2.2. <i>Germinação de sementes de pimentas e análise da morfologia das plântulas</i>	14
3.3. Indução de calogênese em explantes foliares e caulinares utilizando combinações de BAP e 2,4-D	16
3.4. Análises estatísticas	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Germinação <i>in vitro</i> e medidas morfológicas de plântulas de <i>Capsicum spp.</i>	17
4.2. Indução de calos (IC) e área coberta por células de calos (ACCC) em explantes caulinares e foliares de pimenta Cumari-do-pará	29
5. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICES	44
APÊNDICE A - Germinação de sementes de <i>Capsicum spp.</i> provenientes de frutos frescos ao longo de 30 dias	44
APÊNDICE B - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para germinação de sementes de <i>Capsicum spp.</i> provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS	44
APÊNDICE C - Germinação de sementes de <i>Capsicum spp.</i> provenientes de frutos secos ao longo de 30 dias	44
APÊNDICE D - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para germinação de sementes de <i>Capsicum spp.</i> provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS	44
APÊNDICE E - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de características morfológicas de plântulas de <i>Capsicum spp.</i> obtidas de germinação <i>in vitro</i> de sementes de frutos frescos	45
APÊNDICE F - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de características morfológicas de plântulas de <i>Capsicum spp.</i> obtidas de germinação <i>in vitro</i> de sementes de frutos secos	46

APÊNDICE G - Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células calos (ACCC) em explantes caulinares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, após 30 dias de cultivo	47
APÊNDICE H - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de indução de calos em explantes caulinares de <i>Capsicum chinense</i> Jacquin (cumari-do-pará) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo	47
APÊNDICE I - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de indução de calos em explantes foliares de <i>Capsicum chinense</i> Jacquin (cumari-do-pará) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo	47
APÊNDICE J Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células calos (ACCC) em explantes foliares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D.....	48
APÊNDICE K – Plântulas de cumari-do-pará proveniente de sementes frescas germinadas <i>in vitro</i> em meio MS	48
APÊNDICE L – Calos em explantes caulinares de cumari-do-pará, em que a) 1,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L ⁻¹ de BAP, b) 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L ⁻¹ de BAP e c) 2,0 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L ⁻¹ de BAP.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Porcentagem de germinação de sementes de malagueta e cumari-do-pará (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS, 30 dias após inoculação..... 18
- Tabela 2** – Porcentagem de germinação de sementes de malagueta, cumari-do-pará e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS, 30 dias após inoculação 20
- Tabela 3** – Características morfológicas de plântulas de malagueta e cumari-do-pará (*Capsicum spp.*) obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos frescos, 30 dias após a inoculação de sementes 24
- Tabela 4** – Características morfológicas de plântulas de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos secos, 30 dias após a inoculação de sementes 26
- Tabela 5** - Porcentagem de indução de calos em explantes caulinares de cumari-do-pará (*C. chinense*) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo 30
- Tabela 6** - Porcentagem de indução de calos em explantes foliares de cumari-do-pará (*C. chinense*) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos de pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	2
Figura 2 – Estrutura química da capsaicina	6
Figura 3 - Esquema representativo das diversas técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	9
Figura 4 - Sementes extraídas de frutos frescos de <i>Capsicum spp.</i>	14
Figura 5 – Medições de características morfológicas das plântulas obtidas <i>in vitro</i>	15
Figura 6 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (<i>Capsicum spp.</i>) provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS ao longo de 30 dias	17
Figura 7 – Germinação <i>in vitro</i> de sementes de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (<i>Capsicum spp.</i>) provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS ao longo de 30 dias	19
Figura 8 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células de calos (ACCC) em explantes caulinares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, 30 dias após a inoculação	29
Figura 9 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células de calos (ACCC) em explantes foliares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, 30 dias após a inoculação	32

LISTA DE ABREVIACOES

2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
ACCC	Área do explante coberta por células de calos
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido Alfa- Naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
cm	Centímetro
g	Gramma
g L ⁻¹	Gramma por Litro
ha	Hectare
IC	Indução de calos
Kg	Quilograma
KIN	Cinetina
m	Metro
mg L ⁻¹	Miligramma por Litro
mL	Mililitro
MS	Murashige e Skoog
MS0%	Meio de cultura composto por água e ágar
MS100%	Meio de cultura MS com concentração total de sais e 30 g L ⁻¹ de sacarose
MS50%	Meio de cultura MS com metade da concentração de sais e 15 g L ⁻¹ de sacarose
pH	Potencial de Hidrogênio
T	Tonelada
t/ha	Tonelada por hectare
v/v	Volume por volume (fração volumétrica)
und	Unidade

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pimentas do gênero *Capsicum*

As pimentas do gênero *Capsicum* são bastante apreciadas na culinária brasileira devido a sua característica mais marcante, a ardência (também chamada pungência). As diversas variedades de pimentas são consumidas *in natura*, desidratadas, moídas e também na forma de geleias e molhos (CARVALHO et al., 2006).

O gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae, é composto por plantas bem adaptadas ao clima tropical e tem como centro de origem as Américas (PINHEIRO; AMARO; PEREIRA, 2012). O Brasil, por sua vez, é um grande centro de diversidade genética do gênero, sendo as regiões sudeste e centro-oeste as principais áreas de cultivo no país (FURTADO; DUTRA; DELIZA, 2006). De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), no ano de 2014, foi produzido cerca de 32.300.000 t de *Capsicum* mundialmente, colhidas em uma área equivalente a 1.937.370 ha, com rendimento de 16,68 t/ha (FAO, 2014).

O gênero *Capsicum* apresenta 33 espécies, entretanto, apenas cinco espécies são domesticadas e cultivadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum pubescens* L, sendo que a última não é cultivada no Brasil (COSTA et al., 2015; MENICHINI et al., 2009; DUTRA et al., 2010). As plantas deste gênero possuem grande variabilidade quanto às suas características morfológicas, tais como tamanho, cor e formato de folhas, frutos e flores, entre outros. São, em sua maioria, anuais, diploides ($2n=24$) e autógamas, ou seja, a autofecundação ocorre em uma taxa igual ou superior a 95%, entretanto é possível que ocorra polinização por intermédio de abelhas e outros insetos, permitindo que a fecundação cruzada atinja até 40% entre plantas da mesma

espécie e, em alguns casos, do mesmo gênero. São consideradas, em sua maior parte, plantas arbustivas, com caule semilenhoso que pode exceder 1,0 m de altura. O sistema radicular é pivotante, podendo atingir até 1,2m de profundidade (FILGUEIRA, 2008; PICKERSGRILL, 2007; CARVALHO; BIANCHETTI, 2004; MARTIN; SANTIAGO; COOK, 1979).

1.1.1. Principais espécies de *Capsicum* no Brasil

As pimenteiros da espécie *C. chinense* Jacquin são bem adaptadas ao clima tropical e apresentam maior resistência a doenças deste clima do que as outras espécies. No Brasil, a espécie é representada pelas pimentas biquinho, cumari-do-pará (Figura 1A), pimenta de cheiro (Figura 1B), entre outras. Os frutos podem apresentar cor verde (imaturos) até amarelo e vermelho escuro (maduros), possuindo alta pungência e intenso aroma. A pimenta cumari-do-pará, especificamente, possui frutos de formato ovalado a triangular, com cerca de 3 cm de comprimento, sendo amarelos quando maduros e muito picantes (CARVALHO et al., 2006).



Figura 1 – Frutos de pimentas do gênero *Capsicum*. A) Pimentas Cumari-do-pará e malagueta em conserva; B) Pimenta de cheiro *in natura*; C) Pimentões *in natura*.

A espécie *Capsicum baccatum* L., representada pelas pimentas dedo-de-moça e cambuci, possui frutos de tamanho médio, polpa firme e com pungência variável de suave a

média. A pimenta dedo-de-moça possui pungência mediana, frutos alongados, com cerca de 7,5 cm de comprimento que são vermelhos quando maduros (CARVALHO et al., 2006).

As pimentas tabasco e malagueta são exemplares da espécie *Capsicum frutescens* L., que é um dos grupos de pimenta mais conhecidos, sendo consumidas *in natura*, em conservas e na forma de molhos. Seus frutos são do tipo baga, de forma cônica, alongada e cor verde ou vermelha, com 8 a 12 cm de comprimento e 1 a 2 cm de diâmetro (CARVALHO; BIANCHETTI, 2004). A pimenta malagueta (Figura 1A) possui alta pungência e seus frutos medem de 1 cm a 3 cm de comprimento e são vermelhos quando maduros (CARVALHO et al., 2006).

Por fim, os pimentões (Figura 1C), páprica e jalapeño, fazem parte do grupo de pimentas da espécie *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, que ocupa a maior área cultivada de pimentas no mundo. Esta espécie apresenta frutos que diferem quanto ao formato, tamanho, posição na planta, cor e à pungência (CARVALHO et al., 2006).

1.1.2. Valor econômico e nutricional das pimentas

No Brasil, o cultivo de pimentas ganhou popularidade nos últimos anos em todo território, com destaque para os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (RIBEIRO; REIFSCHNEIDER, 2008). O cultivo é realizado por pequenos, médios e grandes produtores de maneira individual ou de forma integrada a agroindústria (FURTADO; DUTRA; DELIZA, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

A informação disponível sobre valores de produção e comercialização de pimentas no Brasil não expressa a realidade econômica para esta hortaliça. Grande parcela da produção e comercialização ocorre em mercados regionais e locais, não datados, não contribuindo com valores estatísticos reais (DOMENICO; LILLI; MELO, 2010).

Atualmente, estima-se que a produtividade nacional média de pimentas esteja entre 10 a 45 t/ha ao ano. A pimenta malagueta, a mais cultivada no Brasil, tem uma produtividade de 10 t/ha. Outros exemplos de produtividade são das pimentas biquinho e de bode, que se encontra em torno de 20 t/ha (GENUNCIO; ZONTA; NASCIMENTO, 2015).

Segundo Rufino e Penteado (2006), a importância socioeconômica da pimenta deve-se ao alto valor agregado ao produto e ao emprego de mão-de-obra. No Brasil, segundo o Censo Agropecuário (IBGE, 2006), a produção de pimenta foi de aproximadamente 18700 t na safra de 2006, gerando um valor de produção de R\$29,77 milhões, sendo as regiões Nordeste (34,35% da produção) e Sudeste (30,13%) as maiores produtoras. De acordo com um levantamento feito pela Central de Abastecimento de Minas Gerais (CEASA-MG), na unidade de Uberlândia, no ano de 2016 o preço médio de pimentas foi de R\$8,64/kg e o total de pimentas ofertadas foi de aproximadamente 232 mil kg, sendo as pimentas de bode e biquinho as mais ofertadas.

O fruto é utilizado na medicina popular no combate às inflamações na garganta e diarreia, como dilatador capilar e expectorante (PIRES, 2004). Outras aplicações na medicina popular são para o tratamento de artrites, reumatismo, erupções cutâneas, feridas e picadas de animais (MEGHVANSI et al., 2010; VAN WYK; WINK, 2004).

Atualmente, existem diversos produtos desenvolvidos à base de capsaicina disponíveis no mercado. Estes produtos incluem pomadas anti-inflamatórias, pomadas para artrite, xampus, cremes hidratantes, entre outros. A capsaicina é comercializada principalmente na forma de pomadas, géis e cremes, que são bastante utilizadas no tratamento de artrites e artroses. O emplastro Sabiá é aplicado para o alívio de dores musculares (CARVALHO et al., 2006). Um adesivo tópico (Qutenza) à base de capsaicina de alta potência (8%) é utilizado no tratamento da dor associada à neuralgia pós-herpética, mediante supervisão médica (JONES; MOORE; PETERSON, 2011).

Além disso, do ponto de vista nutricional, os frutos de pimenta são fonte de vitaminas, proteínas, lipídeos, minerais e fibras. As vitaminas C, E e os carotenoides presentes nas pimentas agem como antioxidantes, que podem atuar na prevenção de doenças cardiovasculares, cataratas, câncer, entre outras (REIFSCHNEIDER, 2000).

1.1.3. Capsaicinoides

A principal característica das pimentas do gênero *Capsicum* é a pungência. Esta característica pode ser atribuída a alcaloides denominados capsaicinoides, que estão acumulados na placenta (tecido interno do fruto onde estão armazenadas as sementes) e são liberados quando o fruto sofre dano físico (CARVALHO et al., 2006) sendo que o grau de pungência varia entre espécies e variedades, tendo duas escalas de classificação mais comuns: a escala de Unidade de Calor de Scoville (SHU) e a escala de temperatura.

A escala de Unidade de Calor de Scoville (SHU) é uma forma de avaliar a pungência de pimentas, as quais podem ser elencadas em baixa (0 a 30 mil SHU), média (30 a 75 mil SHU), alta pungência (75 a 120 mil SHU) e, acima de 120 mil SHU, muito alta pungência (REIFSCHNEIDER, 2000). Segundo Bontempo (2007), a capsaicina pura equivale a 15.000.000 de unidades Scoville. Quando o valor de SHU ultrapassa 120 mil, as pimentas são utilizadas em conservas, na indústria farmacêutica e na indústria bélica, para fabricação de gás de pimenta (REIFSCHNEIDER, 2000). Já na Escala de Temperatura, criada por Julie Cohn, a pungência da pimenta é classificada em uma escala de 1 a 10, sendo espécies muito picantes classificadas de 8 a 10, espécies com média ardência de 4 a 6 e espécies com pouco ardor de 1 a 3 (LINGUANOTTO NETO, 2004).

São conhecidos aproximadamente 14 capsaicinóides, destes os que ocorrem em maior quantidade são a capsaicina (Figura 2), a diidrocapsaicina e a nordiidrocapsaicina, que variam

conforme a maturação do fruto e são responsáveis por mais de 90% da pungência (SIMÕES et al., 2010).

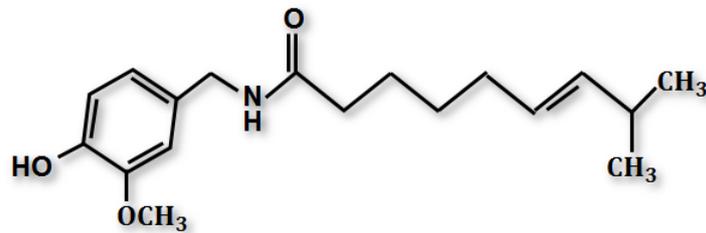


Figura 2 – Estrutura química da capsaicina.

A capsaicina vem sendo considerada uma substância medicinal, visto que apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, quimiopreventiva, bactericida, anticancerígena e anti-hemorragica. Além de atuar como estimulante do apetite, a capsaicina controla o colesterol, induz termogênese, influencia a liberação de endorfinas e funciona como analgésico natural (PINTO; PINTO; DONZELES, 2013; BONTEMPO, 2007).

De acordo com Bhutani et al. (2007) e Dou et al. (2011), a capsaicina também possui capacidade de bloquear vias de ativação relacionadas com a formação de tumores e, portanto, apresenta potencial para a prevenção e tratamento de mielomas múltiplos e outros tipos de câncer. Mori et al. (2006) relata que a capsaicina foi capaz de promover apoptose *in vitro* em linhagens celulares de câncer de próstata e reduziu significativamente o crescimento de massa tumoral *in vivo*.

Diversos estudos relatam o potencial medicinal das pimentas do gênero *Capsicum*, bem como potencial para uso no agronegócio, no controle de pragas. Segundo Neves et al. (2009), o extrato de pimenta malagueta apresentou atividade nematicida contra juvenis de *Meloidogyne javanica*. De acordo com Costa et al. (2009), as pimentas cumari, cambuci e malagueta podem ser usadas como conservantes naturais em alimentos, devido a presença de antioxidantes.

Guimarães et al. (2014) constata que extratos aquosos de sementes de pimenta dedo-de-moça apresentam atividade repelente sobre o gorgulho do milho e frutos de pimenta dedo-de-moça possuem atividade inseticida tanto na forma de extratos alcoólicos quanto de extratos aquosos. O uso de compostos bioativos de plantas no controle de pragas e vetores, por ser um método natural, torna-se mais seguro e barato do que a utilização de agroquímicos. Além disso, evita-se a bioacumulação de defensivos agrícolas no ambiente e em animais que não são alvos da desinfestação (MADHUMATHY; AIVAZI; VIJAYAN, 2007).

1.2. Cultura de tecidos *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais pode ser utilizada tanto na agricultura, por meio da multiplicação rápida e eficiente de plantas, da engenharia genética, da poliploidização, da conservação de germoplasma, quanto na indústria, pela produção de metabólitos secundários, tendo em vista sua alta produtividade em condições *in vitro* (ARIKAT et al., 2004; RAMACHANDRA RAO; RAVISHANKAR, 2002; BOTTA et al., 2001). O cultivo *in vitro*, por ser independente de clima ou estações do ano, permite uma produção contínua de plântulas ou calos (massa celular indiferenciada).

Portanto, os setores agrônomo e industrial são beneficiados pelo melhoramento nas técnicas de cultivo *in vitro* de pimentas. Uma possibilidade seria a análise da capacidade medicinal, agrônoma e industrial da capsaicina, produzindo-se esse composto por sistemas de suspensão celular, obtidos por intermédio de calos friáveis (calos que se fragmentam facilmente). Ademais, a transformação genética e obtenção de poliploides do gênero *Capsicum* são favorecidas pelo levantamento de dados sobre o cultivo *in vitro*.

Segundo Quisen e Angelo (2008), a cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas em que células e tecidos vegetais são cultivados *in vitro* em meio nutritivo sintético,

de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição, luz e temperatura, com o objetivo de gerar uma planta. A técnica de cultura de tecidos *in vitro* é baseada na Teoria da Totipotência que, segundo Termignoni (2005), determina que todas as células vegetais nucleadas vivas são totipotentes e qualquer fragmento vegetal (folha, caule, gema axilar) pode gerar uma planta completa desde que as condições nutricionais, hormonais e o meio de cultura sejam adequados.

Nas técnicas de cultura *in vitro*, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados de explantes, são retirados de um organismo vegetal, passam por uma desinfestação e são cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado (TORRES et al., 1998). O meio de cultura deve fornecer todas as substâncias essenciais, tais como os macronutrientes e micronutrientes, para o crescimento dos tecidos, sendo o padrão de crescimento e desenvolvimento controlado por meio dos reguladores de crescimento, como as auxinas e as citocininas (CALDAS et al., 1998)

Os principais reguladores de crescimento utilizados são as auxinas, tais como ácido naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB), que têm a capacidade de produzir crescimento celular e promover a divisão celular (KRIKORIAN, 1991), também pode-se citar o ácido diclorofenóxiacético (2,4-D), uma auxina sintética amplamente utilizada na indução de calos (NOGUEIRA et al., 2007). Outra classe de reguladores de crescimento são as citocininas, principalmente 6-Benzilaminopurina (BAP) e cinetina (CIN), que promovem divisão, alongamento e diferenciação celular (TAIZ; ZEIGER, 1991). O balanço de auxinas/citocininas adicionados ao meio de cultura, permite a regeneração da planta inteira, pois influencia a via metabólica que o explante deve seguir, sendo esta via destinada à emissão de raízes, brotos ou calos (SKOOG; MILLER, 1957).

Na técnica de cultura de tecidos mais empregada, a micropropagação, existem duas rotas de multiplicação (Figura 3), uma por meio da organogênese direta, na qual o explante se desenvolve em um indivíduo completo sem passar pela fase de formação de calos, e outra por meio da organogênese indireta, passando pela fase de calo (massa celular indiferenciada) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, obtenção de compostos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação por meio de geração de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000; SANTOS et al., 2005).

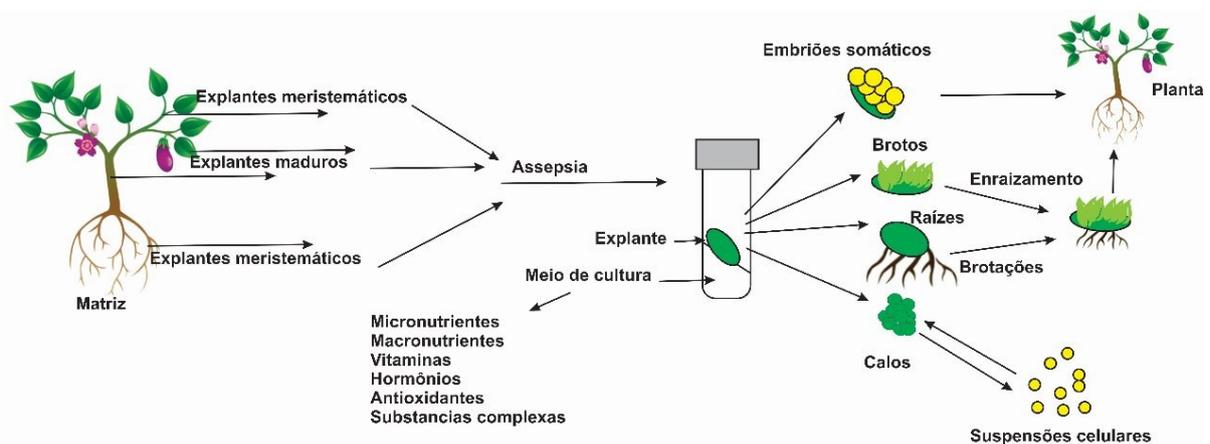


Figura 3 – Esquema representativo das diversas técnicas de cultivo *in vitro* (Adaptado de Andrade, 2002).

A proporção entre auxina e citocinina é determinante na resposta organogênica, em que altas razões auxina/citocinina geralmente induzem à formação de raiz, enquanto baixas proporções promovem a formação de brotos. Já a formação de calos, geralmente, ocorre em razões intermediárias da combinação entre ambos reguladores (TAKAHASHI, 2002).

1.2.1. Germinação de sementes *in vitro*

O primeiro passo para o sucesso do estabelecimento *in vitro* de uma espécie é a escolha de uma boa fonte de explantes. Parte das contaminações que ocorrem frequentemente em culturas de tecidos vegetais podem ser consequência da presença de microrganismos endofíticos (AZEVEDO, 1998). Desta forma a utilização de plantas germinadas *in vitro* para os experimentos de cultura de tecidos vegetais promove uma maior facilidade na obtenção de explantes assépticos, pois as sementes podem ser submetidas a protocolos de desinfecção mais intensos, devido a maior proteção do embrião (GRIGOLETTO, 1997). Do ponto de vista fisiológico, a capacidade das plântulas germinadas *in vitro* gerarem respostas, como a calogênese, aos reguladores de crescimento é favorecida por se encontrarem em um melhor estágio juvenil (GRIGOLETTO, 1997; GRATAPAGGLIA; MACHADO, 1998).

A germinação é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e das condições de germinação, que são variáveis entre as espécies vegetais (SALOMÃO; SOUSA-SILVA, 2003). Dessa forma, é importante otimizar o processo de germinação por meio de estudos de meio de cultura, favorecendo a obtenção de plantas saudáveis e vigorosas que possam ser utilizadas como fonte de explantes (ALMEIDA et al., 2013).

O meio de cultura MS, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962) é considerado o meio básico de cultura, composto de sais subdivididos em: macronutrientes, micronutrientes, fonte de carbono (sacarose), vitaminas e hexitol (mio-inositol). Entretanto, em alguns casos a utilização de composições menos concentradas em macronutrientes são mais satisfatórias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Segundo Souza (2003), ao adicionar-se sacarose ao meio de cultura, pode-se manter a plântula *in vitro* por um maior período de tempo, entretanto, para algumas espécies, não há necessidade de suplementação do meio de cultura com sacarose.

De acordo com Freitas e colaboradores (2008), os frutos da pimenteira são considerados carnosos e, portanto, suas sementes apresentam alto teor de água após a colheita e extração. A submissão das sementes a um processo de secagem é importante para que o teor de água seja diminuído até níveis adequados, levando a conservação de características como germinação e vigor durante o armazenamento e até o momento da semeadura.

O resultado das alterações morfológicas, físicas e fisiológicas, como variações no vigor e no acúmulo de matéria seca é definido como a maturação da semente, sendo este um processo que se inicia com a fertilização e se estende até a maturidade fisiológica - momento em a transferência de matéria seca da planta à semente é interrompida (MARCOS FILHO, 2005). A maturação fisiológica é um pré-requisito para o sucesso da germinação, visto que a maturação da semente é uma condição fundamental na determinação da qualidade da semente (DIAS et al., 2006). Além disso, segundo Nascimento e Freitas (2006), para sementes de frutos carnosos, como as pimentas, os maiores índices de vigor, reserva de matéria seca e germinação são encontrados no período de maturidade fisiológica destas.

1.2.2. Calogênese

Na calogênese, ou seja, na formação de massa de células indiferenciadas, utiliza-se explantes provenientes de tecidos jovens e não lignificados, pois estes apresentam maior potencial de resposta *in vitro*. A partir de calos friáveis, que se desintegram facilmente, pode-se obter uma suspensão celular, utilizada como uma fonte de extração de metabólitos secundários, a partir do cultivo de células em larga escala (VANISREE et al., 2004). O crescimento de calos também pode ser empregado na indução de variação somaclonal, bem como para possíveis estudos fisiológicos (DIXON; PAIVA, 1995; RODRIGUES; ALMEIDA, 2010).

São necessários reguladores de crescimento no meio de cultura para que ocorra a calogênese nos explantes inoculados, visto que os reguladores modificam o metabolismo das células, causando assim a desdiferenciação. O processo é influenciado pelo estado físico de incubação, como luminosidade e calor, pela constituição do meio nutritivo e pelo tipo de explante (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

De acordo com Vietez e San-José (1996), para que haja a formação de calos, recorrentemente é preciso que ocorra a adição de reguladores de crescimento exógenos ao meio de cultura. Sendo essa exigência devida à concentração e equilíbrio de auxinas e citocininas, ao conteúdo endógeno de hormônios no explante, ao genótipo da planta matriz e ao tipo de explante utilizado. Desta forma, estudos sobre as condições de cultivo *in vitro* de espécies produtoras de compostos bioativos com potencial valor medicinal, agrônômico e econômico são de extrema importância para que se permita futura produção em larga escala deste composto.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as condições de cultivo *in vitro* visando a micropropagação das pimentas cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*).

2.2. Específicos

- Avaliar a germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos secos e frescos de cumari-

do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) em diferentes concentrações de sais do meio MS.

- Avaliar as características morfológicas de plântulas de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) germinadas *in vitro* em diferentes concentrações de sais do meio MS, visando fontes potenciais de explantes;
- Avaliar as concentrações de BAP e 2,4-D necessárias para indução de calos em explantes caulinares e foliares de pimenta cumari-do-pará (*C. chinense*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (4C-222b), do Instituto de Genética e Bioquímica - INGEB, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

3.2. Germinação *in vitro* e análise da morfologia de plântulas geradas *in vitro*

3.2.1. Fonte de sementes e assepsia

Nesta pesquisa, foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro com uso de sementes extraídas de frutos frescos e o segundo com sementes extraídas de frutos secos (submetidos a secagem natural/armazenamento por aproximadamente 20 dias). Os frutos das

espécies cumari-do-pará (*Capsicum chinense* Jacquin), malagueta (*C. frutescens* L.) e dedo-de-moça (*C. baccatum* L.) foram adquiridos em comércio local no município de Uberlândia-MG.

Para assepsia das sementes de ambos experimentos, os frutos foram previamente lavados com detergente neutro e, em câmara de fluxo laminar, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 2,5% por dez minutos. Após este procedimento, foram lavados três vezes com água destilada autoclavada, em seguida foram cortados com auxílio de um bisturi. As sementes foram extraídas (Figura 4), imersas em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto e lavadas com água destilada autoclavada. Adicionou-se solução de hipoclorito de sódio 2,5% por cinco minutos e por fim as sementes foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada.

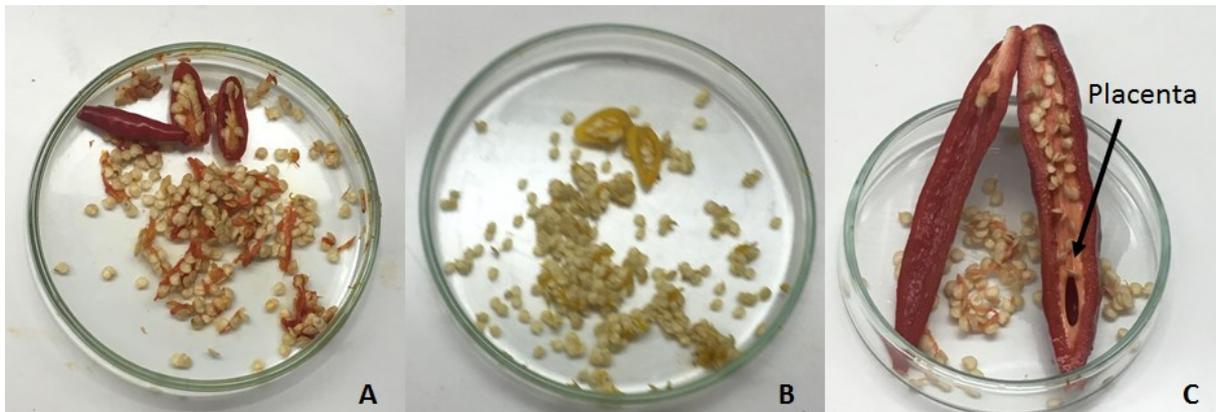


Figura 4 - Sementes extraídas de frutos frescos de *Capsicum* spp. A) Pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.). B) Pimenta cumari-do-pará (*Capsicum chinense* Jacquin). C) Pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum* L.)

3.2.2. Germinação de sementes de pimentas e análise da morfologia das plântulas

Com intuito de avaliar a germinação de sementes e morfologia das plântulas de pimenta cultivada *in vitro*, os experimentos foram realizados em esquema fatorial, sendo o

primeiro fator, constituído pelas espécies (malagueta, dedo-de-moça e cumari-do-pará) e o segundo fator, pelo meio de cultura MS (0, 50 e 100% das concentrações de sais suplementados com 0, 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose). Adotou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso com seis repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco contendo 30 mL de meio de cultivo, onde foram inoculadas 10 sementes. Antes da inoculação das sementes, o pH do meio de cultura foi corrigido para 5,8 e os meios foram solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar. Por fim, os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C e 1,1 atm, durante 20 minutos. O número de sementes germinadas foi avaliado a cada 2 dias por um período de 30 dias.

Ao final dos 30 dias, mediu-se: o comprimento da parte aérea e da raiz principal (cm), cuja soma resultou no tamanho da plântula e o comprimento e largura das folhas primordiais (cm), conforme figura 5. Avaliou-se também o número de folhas, de raízes secundário e a matéria fresca das plântulas (g). Os processos metrológicos foram realizados com o uso de régua milimétrica e balança de precisão, medindo, quando disponíveis, 5 plântulas de cada repetição.

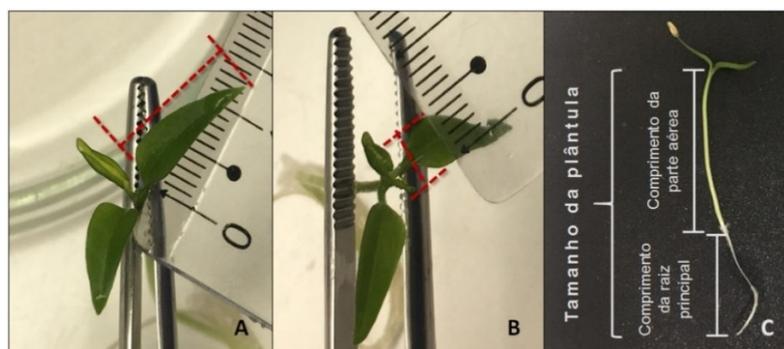


Figura 5 – Medições de características morfológicas das plântulas obtidas *in vitro*. A) Medida do comprimento da folha primordial (cm). B) Medida da largura da folha primordial (cm). C) Medida da parte aérea e da raiz principal (cm), resultando no tamanho da plântula (cm).

3.3. Indução de calogênese em explantes foliares e caulinares utilizando combinações de BAP e 2,4-D

Inocularam-se segmentos de folhas ou caules, obtidos de plântulas de pimenta cumari-do-pará, em meios de cultura MS suplementados com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹) combinado com BAP (0,0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹). O pH foi corrigido para 5,8 e os meios foram solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar e suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose. Por fim, os meios de cultura foram autoclavados a 120°C e 1,1 atm, durante 20 minutos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em que cada tratamento foi constituído por 12 repetições, sendo cada repetição um tubo contendo 10 ml de meio de cultivo, onde foram inoculadas um explante caulinar ou foliar. Os tratamentos foram mantidos sob fotoperíodo de 16h. A cada 7 dias, durante um mês, foram feitas observações acerca da indução de caule (IC) e área do explante coberta por células de calos (ACCC). A ACCC foi contabilizada por meio de uma adaptação do método descrito por Mendonça et al. (2013), em que a ACCC foi dada pelas porcentagens 0, 10, 25, 50, 75, 90 ou 100% de área do explante coberta por células de calos.

3.4 . Análises estatísticas

Os dados de germinação, caracteres morfológicos das plântulas e indução de calos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial. Anteriormente à análise, procedeu-se a transformação dos dados para atender às pressuposições da ANOVA, conforme descrito abaixo, de acordo com Ferreira (2011):

Transformação para germinação: $\arcsen\sqrt{P(\%)}$, em que $100\% = 100 - \frac{1}{4}N$ e $0\% = \frac{1}{4}N$

Transformação para características morfológicas e indução de calos: $\sqrt{x + 0,5}$

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Programa Genes (CRUZ, 2016).

Os dados de área coberta por células de calo foram submetidos somente à análise descritiva, pelo programa EXCEL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Germinação *in vitro* e medidas morfológicas de plântulas de *Capsicum spp.*

A taxa de germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos frescos de três espécies de pimenta ao longo de 30 dias após a inoculação está apresentada na Figura 6. Os tratamentos correspondentes ao meio MS0% foram perdidos, devido a não gelificação do ágar.

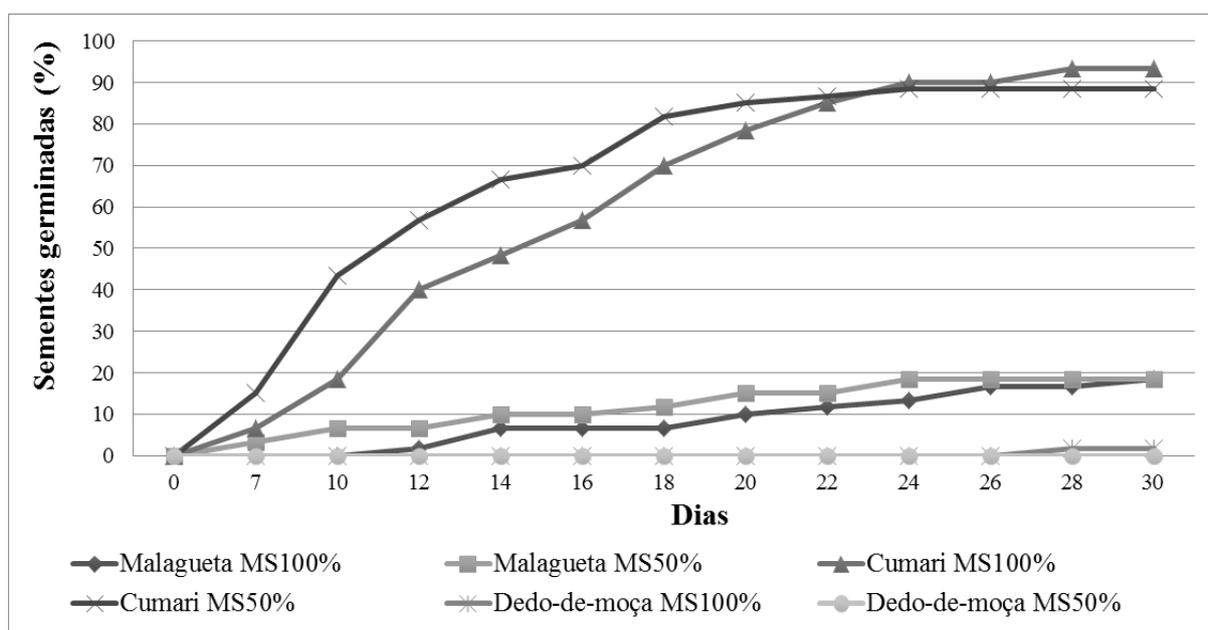


Figura 6– Germinação *in vitro* de sementes de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS ao longo de 30 dias.

Notou-se que a germinação de sementes cumari-do-pará (*C. chinense*) iniciou-se ao sétimo dia após a inoculação em ambos os meios de cultura (MS50% e MS100%). Ademais, observou-se que, ao final dos 30 dias, a pimenta cumari-do-pará apresentou alta taxa de germinação em ambos os meios de cultura testados, sendo 93,3% no meio MS100% e 83,3% no MS50%. A germinação da espécie malagueta (*C. frutescens*) iniciou-se no dia 7 após a inoculação das sementes em meio MS50% e no dia 12 após a inoculação em meio MS100%. A taxa de germinação foi visivelmente menor nestas pimentas em relação às sementes de cumari-do-pará, visto que apenas 18,3% sementes germinaram em ambos os meios de cultivo. Por outro lado, as sementes de pimenta dedo-de-moça (*C. baccatum*) não germinaram em nenhum dos meios de cultura testados.

Considerando-se que não houve germinação para as sementes de dedos-de-moça, analisaram-se estatisticamente apenas os dados de malagueta e cumari-do-pará.

Desta forma, pela análise de variância constatou-se que não houve efeito significativo para a interação entre espécie e meio de cultura, havendo significância apenas para a espécie. Pela Tabela 1, observou-se a superioridade de germinação *in vitro* das sementes de pimenta cumari-do-pará.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação de sementes de malagueta e cumari-do-pará (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS, 30 dias após inoculação.

Tipo de pimenta	Meio de Cultura		Média
	MS50% ¹	MS100% ²	
Malagueta	16,30	17,35	16,82 bb
Cumari-do-pará	88,76	93,20	90,98 aa
Média	52,53 AA	55,27 AA	
Coeficiente de Variação (%)		18,39	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ Meio MS com metade das concentrações de sais e 15 g L⁻¹ de sacarose.

² Meio MS com concentração total de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose.

Na germinação *in vitro* de sementes provenientes de frutos secos, constatou-se que as sementes de cumari-do-pará, embora tenha ocorrido um decréscimo em relação às provenientes de frutos frescos, ainda possuem a melhor taxa de germinação entre as três pimentas, nos três meios testados, sendo a melhor taxa, ao longo de 30 dias, no meio MS100% (80% de sementes germinadas), seguido pelo meio MS0% (68% de sementes germinadas) e pelo meio MS50% (64% de sementes germinadas), sendo o início da germinação no quinto dia após inoculação (Figura 7).

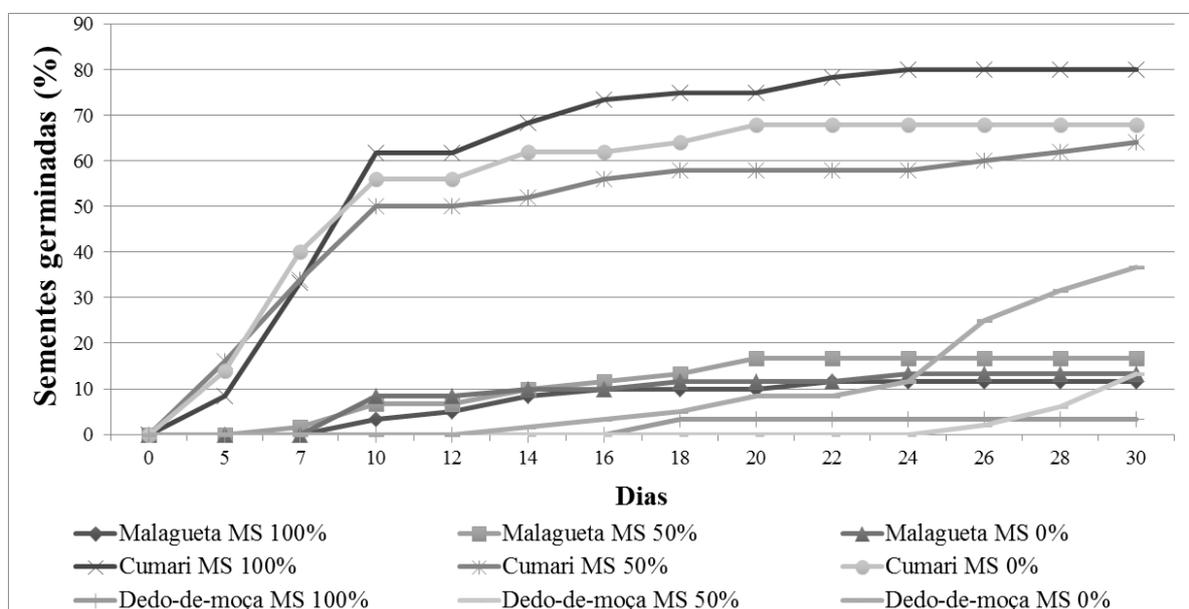


Figura 7 – Germinação *in vitro* de sementes de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS ao longo de 30 dias.

Para a pimenta malagueta, o início da germinação de sementes no meio MS50% se deu ao sétimo dia após a inoculação, já a germinação nos meios MS100% e MS0%, se iniciaram no dia 10 após a inoculação (Figura 7). As taxas de germinação para essas pimentas, ao longo de 30 dias, foram ligeiramente menores em comparação com as taxas de germinação de frutos frescos, sendo que MS50% apresentou 16,7% sementes germinadas,

seguida pelo meio água e ágar, com 13,3% de sementes germinadas e pelo meio MS100%, com 11,6% sementes germinadas.

Entretanto, para a pimenta dedo-de-moça, a secagem agiu positivamente sobre a germinação nos meios MS0% e MS50%, sendo as taxas de germinação 36,7% e 13,3% de sementes germinadas, respectivamente. O início da germinação para as sementes desta espécie ocorreu no dia 14 após a inoculação no meio MS0%, no dia 18 após a inoculação no meio MS100% e no dia 26 após a inoculação no meio MS50% (Figura 7).

De acordo com a análise de variância, constatou-se que houve efeito significativo da interação entre espécie e meio de cultura. Pela Tabela 2, observou-se novamente a superioridade de germinação *in vitro* das sementes de pimenta cumari-do-pará, não havendo diferença significativa dos meios de cultura. A pimenta dedo-de-moça apresentou maiores taxas de germinação em meio MS0% e MS50%, não havendo diferença significativa entre estes. Para as pimentas malagueta, não se observou diferença significativa entre os meios de cultura, entretanto esta pimenta apresentou inferioridade nas taxas de germinação em relação à dedo-de-moça no meio MS0%.

Tabela 2 – Porcentagem de germinação de sementes de malagueta, cumari-do-pará e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS, 30 dias após inoculação.

Tipo de Pimenta	Meio de Cultura		
	MS0% ¹	MS50% ²	MS100% ³
Malagueta	14,34 Ac	15,03 Ab	10,75 Ab
Cumari-do-pará	69,81 Aa	64,56 Aa	80,96 Aa
Dedo-de-moça	34,79 Ab	11,98 ABb	5,66 Bb
Coefficiente de Variação (%)		33,44	

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ Meio composto por água e ágar.

² Meio MS com concentração total de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose.

³ Meio MS com metade das concentrações de sais e 15 g L⁻¹ de sacarose.

Com base nos resultados de ambos os experimentos de germinação, constatou-se que para a pimenta cumari-do-pará a taxa de germinação é maior quando estas são provenientes de frutos frescos. Em um estudo com mangabeira, Ledo et al. (2007) relata que não foi observada diferença significativa dos tratamentos para a porcentagem de germinação aos vinte dias, que variou de 95 a 100%.

Entretanto, nota-se no presente estudo que o meio de cultura MS100% foi o que apresentou a maior taxa de germinação de pimenta cumari-do-pará, o que é mais evidente no experimento com sementes de frutos secos. Zanotti et al. (2012), estudando a germinação de sementes de copaíba, observaram que houve mais sementes germinadas em meio com concentração total de sais do que em meio com concentração de sais reduzida pela metade. Já Naves (2001), na propagação *in vitro* de bromélia imperial, avaliou a germinação de sementes utilizando meio MS em diferentes concentrações e observou uma maior porcentagem de germinação das sementes presentes nos meios com concentrações superiores a 75% do MS.

A secagem dos frutos de pimenta cumari-do-pará atuou negativamente sobre a germinação dessas pimentas, possivelmente reduzindo o teor de água das sementes até um nível crítico, o que afeta a qualidade destas, tornando-as menos viáveis para germinação.

Baseado na baixa taxa e no início de germinação dessas variedades, considerou-se uma das prováveis causas, a possibilidade de dormência das sementes de pimentas malagueta e dedo-de-moça. Segundo Carneiro et al. (2010), a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum* apresenta dormência em suas sementes, o que dificulta a propagação. Segundo Rivas, Sundstrom e Edwards (1984), a porcentagem de germinação de sementes de pimenta malagueta é menor do que em outras pimentas.

Baskin e Baskin (2004) definem a dormência como a incapacidade de uma semente viável germinar sob quaisquer condições ambientais que favoreçam sua germinação. Entretanto, alguns autores, como Fenner e Thompsom (2005), sugerem que a dormência não

deve ser condicionada somente à ausência de germinação, mas que diferentes condições ambientais modificam a dormência de uma semente, de forma que uma semente não dormente é aquela que não requer condições específicas para germinar.

Sendo assim, é necessário que as sementes destas variedades sejam submetidas a tratamentos para superação de dormência. Randle e Honma (1981) recomendam que após a secagem das sementes, estas sejam armazenadas por um período mínimo de seis semanas, para que a dormência seja completamente superada.

Com base nos resultados apresentados, inferiu-se que a secagem das sementes contribuiu para a germinação de pimentas dedo-de-moça, provavelmente permitindo a maturação fisiológica das mesmas.

A secagem, por ter sido realizada de forma natural, pode ter agido como repouso para os frutos e sementes de pimentas. Segundo Dias et al. (2006) e Vidigal et al. (2006), algumas sementes dão prosseguimento ao processo de maturação quando são mantidas, por algum tempo, nos frutos após a colheita, o que permite com que as sementes alcancem o máximo de germinação e vigor. Desta forma, o armazenamento dos frutos após a colheita, sem que haja extração das sementes, pode apresentar alguns benefícios, pois além de permitir a maturação das sementes, possibilita a colheita de frutos imaturos, evitando que estes sejam injuriados por condições desfavoráveis no campo (BARBEDO et al., 1994; MARTINS et al., 2006).

De acordo com Ricci et al. (2013), sementes que não atingiram a maturidade fisiológica e que são submetidas à germinação logo após a colheita apresentam menor porcentagens de germinação quando comparadas com sementes que foram colocadas para germinar após um período de armazenamento. Castro, Godoy e Cardoso (2008) relatam que esta situação também é observada quando se faz armazenamento (repouso) de outros frutos carnosos como pimentão, abóbora, melancia e tomate.

Além disso, constatou-se que a presença de sacarose e de sais podem ter dificultado a germinação nessas espécies, pois as soluções de açúcares e sais que compõem o meio de cultivo, além de exercerem o papel nutritivo, também atuam no crescimento celular e na morfogênese, visto que modificam as propriedades osmóticas do meio de cultura. Segundo George e colaboradores (1993), o aumento da concentração de sacarose diminui a porcentagem de germinação, pois a concentração de sacarose afeta a regulação osmótica do meio de cultura. Concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura dificulte a absorção de água pelas sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Almeida et al. (2013), ao estudar a germinação de jenipapo, constatou que na ausência de sais e da sacarose houve mais de 90% de germinação, não diferindo estatisticamente do meio composto por $\frac{1}{2}$ MS e 30 g L^{-1} de sacarose (78%).

De acordo a análise de variância para as características morfológicas das plântulas de pimentas obtidas *in vitro* a partir de sementes de frutos frescos, observou-se que houve efeito significativo, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, da interação entre espécie e meio de cultura somente para as características largura da folha (cm) e comprimento da folha (cm). Para as características tamanho da plântula (cm), comprimento da raiz principal (cm) e comprimento da parte aérea (cm) ocorreu significância para o meio de cultivo. Já para os caracteres número de raízes secundárias (und), número de folhas (und) e matéria fresca (g) observou-se houve efeito significativo para a espécie (Tabela 3).

Observou-se que para as características cuja interação entre espécie e meio de cultura exerceu efeito significativo, a pimenta malagueta apresentou menores médias para a característica largura de folha quando cultivada em meio MS100% em relação a cumari-do-pará. Já para a característica comprimento da folha, não houve diferença significativa do meio de cultura no cultivo das pimentas malagueta, enquanto que a pimenta cumari-do-pará apresentou superioridade quando cultivada em meio MS50% (Tabela 3).

Tabela 3 - Características morfológicas de plântulas de malagueta e cumari-do-pará (*Capsicum spp.*) obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos frescos, 30 dias após a inoculação de sementes.

Característica	Tipo de pimenta	Meio de cultura		Média
		MS 50	MS 100	
Tamanho da Plântula	Malagueta	10,12	8,25	9,18 aa
	Cumari-do-pará	9,56	8,49	9,03 aa
	Média	9,84 AA	8,37 AB	
Coeficiente de Variação (%)		6,55		
Comprimento da Parte aérea	Malagueta	4,68	3,94	4,31 aa
	Cumari-do-pará	4,21	3,54	3,88 aa
	Média	4,45 AA	3,74 BB	
Coeficiente de Variação (%)		7,69		
Número de Raízes Secundárias	Malagueta	11,80	11,54	11,67 aa
	Cumari-do-pará	1,47	1,85	1,66 bb
	Média	6,64 AA	6,69 AA	
Coeficiente de Variação (%)		16,23		
Comprimento da Raiz Principal	Malagueta	5,44	4,29	4,86 aa
	Cumari-do-pará	5,34	4,93	5,14 aa
	Média	5,39 AA	4,61 BB	
Coeficiente de Variação (%)		7,12		
Número de Folhas	Malagueta	3,11	2,60	2,86 bb
	Cumari-do-pará	3,86	3,73	3,79 aa
	Média	3,49 AA	3,16 AA	
Coeficiente de Variação (%)		8,82		
Largura da Folha	Malagueta	0,51 Aa	0,39 Ab	
	Cumari-do-pará	0,39 Ba	0,61 Aa	
	Média			
Coeficiente de Variação (%)		7,9		
Comprimento da folha	Malagueta	1,37 Aa	1,20 Ab	
	Cumari-do-pará	1,11 Ba	1,60 Aa	
	Média			
Coeficiente de Variação (%)		9,18		
Peso	Malagueta	0,0907	0,0759	0,0833 aa
	Cumari-do-pará	0,0615	0,0488	0,0551 bb
	Média	0,0761 AA	0,0624 AA	
Coeficiente de Variação (%)		1,67		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ Meio MS com metade das concentrações de sais e 15 g L⁻¹ de sacarose.

² Meio MS com concentração total de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose.

Para a característica tamanho da plântula não se observou diferença significativa do meio de cultura para a pimenta cumari-do-pará, enquanto que houve superioridade do meio

MS50% para a pimenta malagueta. Em relação as características comprimento da raiz principal e comprimento da parte aérea, houve maiores médias das pimentas malagueta e cumari-do-pará quando estas foram cultivadas em meio de cultura MS50% (Tabela 3).

Verificando-se as médias para número de raízes secundárias e matéria fresca (Tabela 3), notou-se superioridade da pimenta malagueta em relação à pimenta cumari-do-pará em ambos os meios de cultura, já o número médio de folhas foi maior nas pimentas cumari-do-pará.

Observou-se que, no geral, as plantas provenientes de sementes cultivadas em meio MS50% aparentam ter um vigor mais alto do que as cultivadas em meio MS100%, tanto para as pimentas cumari-do-pará quanto para as malaguetas, que apresentam médias semelhantes na maioria dos caracteres morfológicos.

Para as características morfológicas de plântulas de pimentas obtidas a partir de frutos secos, constatou-se que houve interação significativa entre os fatores espécie e meio de cultura, ao nível de 5% de probabilidade do teste F, exceto para o número de raízes secundárias, para o qual não houve significância de nenhum dos fatores (Tabela 4).

Para as características tamanho da plântula, comprimento da raiz principal e comprimento da parte aérea, notou-se que para as pimentas cumari-do-pará e malagueta não houve diferença significativa dos meios de culturas testados. Para dedo-de-moça o meio MS50% forneceu as maiores médias para comprimento da raiz principal e comprimento da parte aérea. No meio MS0%, nenhuma das espécies apresentou superioridade, não havendo diferença significativa entre elas. Enquanto no meio MS50%, observa-se as maiores médias para tamanho da plântula e comprimento da parte aérea nas pimentas dedo-de-moça. Para o meio MS100% geraram as maiores médias para tamanho da plântula, comprimento da parte aérea e comprimento da raiz principal foram obtidas no cultivo de cumari-do-pará e malagueta (Tabela 4).

Tabela 4 - Características morfológicas de plântulas de cumari-do-pará, malagueta e dedo-de-moça (*Capsicum spp.*) obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos secos, 30 dias após a inoculação de sementes.

Característica	Tipo de pimenta	Meio de Cultivo			
		MS 0%	MS 50%	MS 100%	
Tamanho da Plântula	Cumari-do-pará	3,91 Aa	4,28 Ab	4,11 Aa	
	Malagueta	6,07 Aa	6,08 Aab	6,08 Aa	
	Dedo-de-moça	4,49 Aa	8,43 Aa	1,09 Bb	
Coeficiente de Variação (%)		22,26			
Comprimento da Parte aérea	Cumari-do-pará	2,07 Aa	2,20 Ab	2,12 Aa	
	Malagueta	3,00 Aa	3,46 Aab	3,16 Aa	
	Dedo-de-moça	2,49 Ba	4,97 Aa	0,66 Ca	
Coeficiente de Variação (%)		21,10			
Número de Raiz Secundária	Cumari-do-pará	0,00	0,00	0,00	0,00 a
	Malagueta	0,39	0,00	0,34	0,25 a
	Dedo-de-moça	0,17	0,00	0,48	0,22 a
	Média	0,19 A	0,00 A	0,28 A	
Coeficiente de Variação (%)		45,35			
Comprimento da Raiz Principal	Cumari-do-pará	1,83 Aa	2,09 Aa	1,98 Aa	
	Malagueta	3,04 Aa	2,59 Aa	2,92 Aa	
	Dedo-de-moça	2,02 Aa	3,43 Aa	0,62 Bb	
Coeficiente de Variação (%)		19,00			
Número de Folhas	Cumari-do-pará	2,13 Aa	2,14 Aa	2,15 Aa	
	Malagueta	2,81 Aa	2,16 Aa	2,68 Aa	
	Dedo-de-moça	0,34 Bb	1,40 Aa	0,28 Bb	
Coeficiente de Variação (%)		15,19			
Largura da Folha	Cumari-do-pará	0,29 Aa	0,35 Aab	0,34 Aa	
	Malagueta	0,30 Aa	0,28 Ab	0,38 Aa	
	Dedo-de-moça	0,15 Ba	0,73 Aa	0,17 Ba	
Coeficiente de Variação (%)		13,50			
Comprimento da Folha	Cumari-do-pará	0,85 Ab	0,94 Aa	0,92 Ab	
	Malagueta	1,06 Aa	1,03 Ba	1,25 Aa	
	Dedo-de-moça	0,03 Ac	0,15 Ab	0,06 Ac	
Coeficiente de Variação (%)		4,86			
Peso	Cumari-do-pará	0,0184 Aa	0,0184 Ab	0,0184 Aa	
	Malagueta	0,0300 Aa	0,0300 Ab	0,0329 Aa	
	Dedo-de-moça	0,0155 Ba	0,0506 Aa	0,0155 Ba	
Coeficiente de Variação (%)		1,12			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ Meio composto por água e ágar.

² Meio MS com concentração total de sais e 30 g L⁻¹ de sacarose.

³ Meio MS com metade das concentrações de sais e 15 g L⁻¹ de sacarose

Observou-se que para as características largura da folha não houve diferença significativa do meio de cultura para as espécies malagueta e cumari-do-pará, sendo que para dedo-de-moça o meio MS50% apresentou as melhores médias, sendo a espécie significativa neste meio de cultura. Para o comprimento da folha, não houve diferença significativa do meio de cultura para as espécies dedo-de-moça e cumari-do-pará, á para a pimenta malagueta, as menores médias nesta característica foram obtidas no meio MS50%. Para esta característica houve diferença significativa da espécie em todos os meios de cultura testados, sendo que a pimenta malagueta apresentou superioridade em relação às demais espécies (Tabela 4).

Já para o número de folhas e a matéria fresca (Tabela 4), o meio de cultura não apresentou efeito significativo para as pimentas cumari-do-pará e malagueta. A pimenta dedo-de-moça, por sua vez, apresentou as melhores médias quando cultivadas em meio MS50%. O fator espécie só foi significativo nas plântulas cultivadas em meio MS50%, em que a pimenta dedo-de-moça apresentou superioridade em relação as demais.

Para a característica número de raízes secundárias nenhum dos fatores, nem sua interação, foram significativos. Ao avaliar o efeito da sacarose na germinação de *Capsicum annuum*, Nascimento et al. (2015) constataram que não houve variação significativa sobre o número de raízes das plântulas entre os meios de cultura MS acrescidos com 0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹ de sacarose. Em um ensaio sobre a germinação de sementes de *Euphorbia heterophylla*, Prudente et al. (2015) não observaram diferença significativa no número médio de raízes em sementes cultivadas em meio MS 100% e MS 50%. Estes resultados corroboram com os obtidos para plântulas provenientes de sementes de frutos secos.

De forma geral, o meio de cultura MS50% apresentou as melhores médias para as espécies avaliadas. Resultados semelhantes foram relatados por Ledo et al. (2014) , que observou que plântulas de cambuizeiro (*Myrciaria tenella* O. Berg) apresentavam maior

desenvolvimento da parte aérea quando cultivadas em meio MS com 50% da concentração total de sais e 15 g L^{-1} de sacarose. O desenvolvimento da parte aérea do acesso OIT de Jenipapeiro também é favorecido na presença de sacarose (30 g L^{-1}) e meio de cultivo MS com metade da concentração de sais (ALMEIDA et al., 2013).

De acordo com Maldaner e colaboradores (2006), as concentrações de nutrientes no meio de cultura influencia diversos processos metabólicos, o que resulta em crescimento e diferenciação de tecidos. Segundo Reis et al. (2008), a presença de maior concentração de nutriente no meio produz plântulas mais vigorosas e maiores, embora possa reduzir a germinação.

Em relação a concentração de sacarose, Reis et al. (2008), em um estudo com *Melissa officinalis* L., constatou que a presença de 15 g L^{-1} de sacarose proporcionou os melhores resultados para comprimento da parte aérea das plântulas. Segundo estes mesmos autores, esses resultados devem-se ao fato das sementes possuírem reservas nutritivas em seu interior, permitindo com que a emissão da radícula e crescimento da parte aérea seja possível sem que haja grandes concentrações de sacarose no meio de cultura. Ademais, em meios de cultura que contenham altas taxas de fonte de carbono, as pressões osmóticas destes são alteradas o que pode favorecer a perda de água da semente para o meio, dificultando tanto sua germinação como o crescimento.

Comparando-se os resultados dos experimentos de germinação *in vitro* e morfologia das plântulas geradas *in vitro* a partir de sementes de frutos secos e frescos, inferiu-se que por apresentarem alta taxa de germinação e plântulas vigorosas, as plântulas de pimentas cumarido-pará provenientes de frutos frescos, são excelentes fontes de explantes quando cultivadas em meio MS50%, visto que este meio, por ser diluído, é mais econômico que o meio de cultura MS100%.

4.2. Indução de calos (IC) e área coberta por células de calos (ACCC) em explantes caulinares e foliares de pimenta Cumari-do-pará

Aos 14 dias após a inoculação de explantes, foram observados os primeiros calos nos tratamentos contendo 1 mg L^{-1} de 2,4-D + 0 mg L^{-1} de BAP e 2 mg L^{-1} de 2,4-D + 0 mg L^{-1} de BAP, tanto para explantes caulinares quanto para explantes foliares.

Ao final de 30 dias, para o experimento contendo explantes caulinares, observou-se formação de calos nos tratamentos suplementados 1 mg L^{-1} de 2,4-D e suas combinações com BAP, 2 mg L^{-1} de 2,4-D e suas combinações com BAP (com exceção do tratamento suplementado com 4 mg L^{-1} de BAP) e também no tratamento suplementado com 4 mg L^{-1} de 2,4-D e 4 mg L^{-1} de BAP (Figura 8).

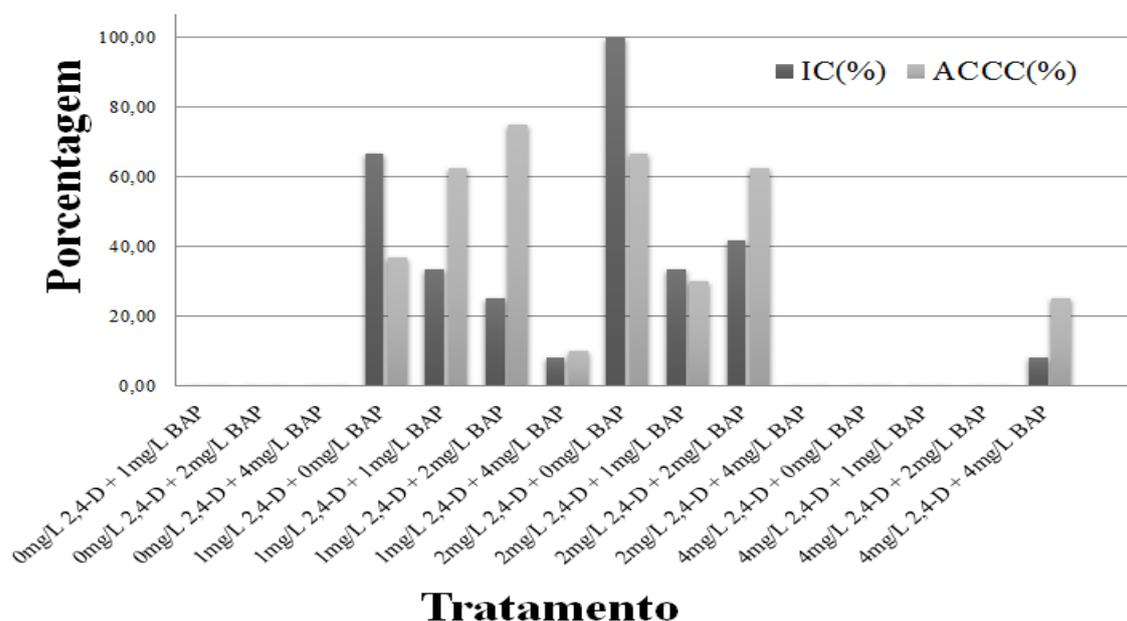


Figura 8 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células de calos (ACCC) em explantes caulinares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, 30 dias após a inoculação.

Mediante análise de variância, constatou-se que para os explantes caulinares ocorreu efeito significativo da interação entre os dois reguladores de crescimento (2,4-D e BAP) na

indução de calos, sendo que a maior indução de calos (99,9% de IC) ocorre na presença de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e na ausência de BAP, seguido pela combinação de 1,0 mg L⁻¹ + 0,0 mg L⁻¹ de BAP, que apresentou 43,3% de calogênese (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de indução de calos em explantes caulinares de cumari-do-pará (*C. chinense*) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo.

BAP ¹	2,4-D ²			
	0 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹
0 mg L ⁻¹	0,00 Ca	43,30 Ba	99,99 Aa	0,00 Ca
1 mg L ⁻¹	0,00 Ba	27,39 Aa	27,39 Ab	0,00 Ba
2 mg L ⁻¹	0,00 Ba	19,97 ABab	27,39 Ab	0,00 Ba
4 mg L ⁻¹	0,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	6,28 Aa
Coefficiente de Variação (%)		24,89		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ 6-Benzilaminopurina

² Ácido diclorofenóxiacético

Em relação à área do explante coberta por células de calos (ACCC), as maiores médias para explantes caulinares foram observadas nos tratamentos 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg L⁻¹ de BAP (66,6%), seguido por 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2 mg L⁻¹ de BAP e 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L⁻¹ de BAP, ambos com 62,5% de ACCC, todavia o primeiro apresentou maior número de explantes induzidos em comparação com os últimos (Figura 8).

Já para os explantes foliares, constatou-se que, com base na análise de variância, 2,4-D e sua interação com BAP promovem efeito significativo na calogênese, verificando-se a maior porcentagem de indução (35,16%) quando os explantes foram inoculados em meio suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,0 mg L⁻¹ de BAP. Os meios de cultura suplementados com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D e com 0,0 mg L⁻¹ ou 1,0 mg L⁻¹ de BAP, geraram

27,37% de indução de calos, sendo considerados os segundos melhores meios para indução (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de indução de calos em explantes foliares de cumari-do-pará (*C. chinense*) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo.

BAP ¹	2,4-D ²			
	0 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹
0 mg L ⁻¹	0,00 Ba	35,16 Aa	27,37 Aa	0,00 Ba
1 mg L ⁻¹	0,00 Ba	0,00 Bb	27,37 Aa	0,00 Ba
2 mg L ⁻¹	0,00 Aa	6,28 Ab	6,28 Aab	0,00 Aa
4 mg L ⁻¹	0,00 Aa	12,95 Aab	0,00 Ab	6,28 Aa
Coefficiente de Variação (%)		24,26		

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

¹ 6-Benzilaminopurina

² Ácido diclorofenóxiacético

Conforme figura 9, observou-se que todos os meios de cultura suplementados com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, com exceção da combinação de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg L⁻¹ de BAP, ou 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D foram capazes de induzir a formação de calos em explantes foliares de cumari-do-pará. Meios de cultura sem suplementação com 2,4-D ou com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, com exceção do tratamento suplementado com 4,0 mg L⁻¹ e 0,0 mg L⁻¹, não induziram a calogênese nestes explantes (Figura 9).

Os tratamentos que geraram maiores porcentagem de ACCC em explantes foliares de cumari-do-pará foram as combinações de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 4 mg L⁻¹ de BAP e 1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg L⁻¹ de BAP, ambos com 50% de ACCC. Entretanto, o último tratamento apresentou médias maiores de indução de calos (Figura 9).

É importante ressaltar que ocorre diferença entre os valores de indução de calos (IC) das Tabelas 5 e 6 e Figuras 8 e 9, respectivamente, devido à transformação empregada nos dados das tabelas para submissão destes à análise de variância.

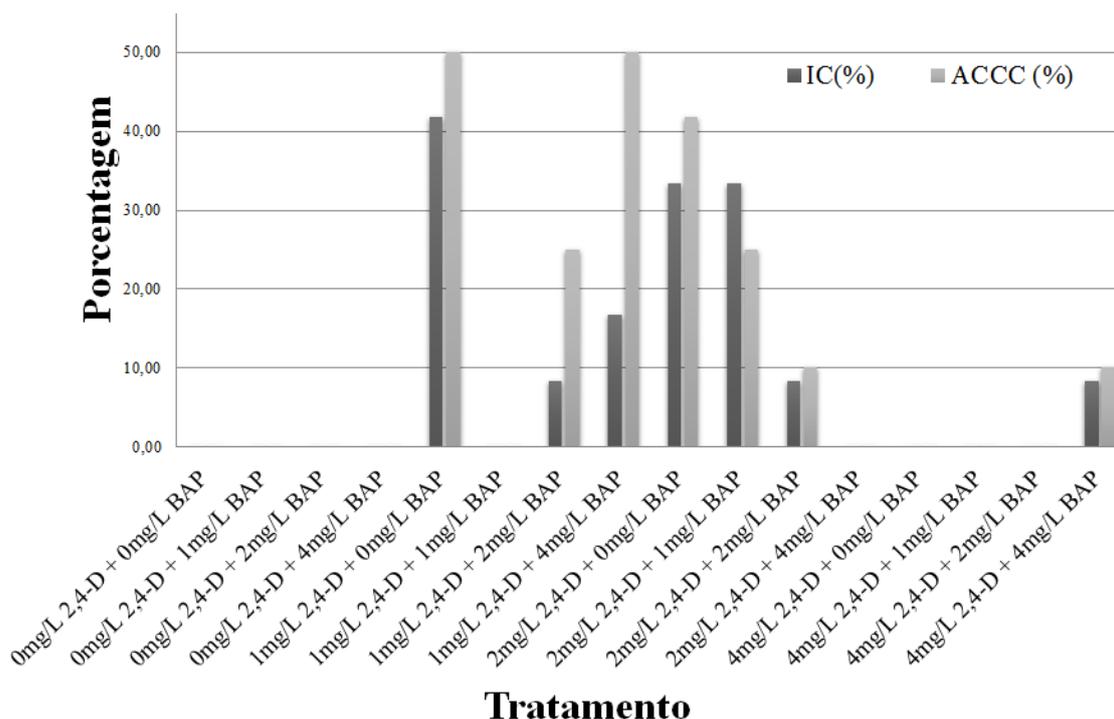


Figura 9 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células de calos (ACCC) em explantes foliares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, 30 dias após a inoculação.

Sendo assim, neste trabalho, ao se observar as variáveis IC e ACCC, constatou-se que para explantes caulinares de pimenta cumari-do-pará, o tratamento composto por 2 mg L⁻¹ de 2,4-D na ausência de BAP foi satisfatório para a indução de calos, resultando em 100% de indução e uma média de 66,6% de área coberta por calos. Além disso, notou-se que 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, sem presença de BAP, gera a maior indução de calos (41,67%) e grande área coberta por células de calos (45%) em explantes foliares de *C. chinense* Jacquin. Desta forma, observou-se a maior superioridade na indução de calos bem como na área coberta por células de calos de explantes caulinares em relação à explantes foliares.

Verificou-se também que, para os dois tipos de explantes, os tratamentos contendo altas concentrações de reguladores de crescimento (4 mg L⁻¹), isoladamente ou combinados entre si, apresentaram baixa ou nenhuma formação de calos (Figura 8 e 9). Além disso, notou-se que a presença do regulador de crescimento 2,4-D, isoladamente, na concentração de 1 mg

L⁻¹ ou 2 mg L⁻¹ é suficiente para a calogênese, enquanto o uso de BAP não é necessário para a formação de calos.

Smozinski e Santos (2015), ao estudarem a indução de calos em explantes de *Capsicum chinense* cv. Guaraci cumari-do-pará, relataram as combinações de 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 2,5 mg L⁻¹ BAP e 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D, como sendo as mais satisfatórias para formação de calos em explantes foliares e em segmentos nodais e entrenodais, respectivamente. Em um experimento com *C. annuum*, Farias Filho (2006) relata a calogênese com o uso de uma concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, bem como formação de calos em *C. chinense* com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Kittipongpatana et al. (2007), observaram a calogênese em explantes foliares de *C. annuum* em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,1 mg L⁻¹ de BAP. O uso de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP é recomendado para a indução de calos em explantes foliares de *Capsicum annuum* (SOUZA, 2016).

De acordo com Paz (2016), a maior porcentagem de indução e proliferação de calos friáveis em *Capsicum frutescens* cv. Stromboli ocorreu em meio suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Gomes et al. (sem data) relata que, em nim indiano (*Azadirachata indica* A. Juss), a presença de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultura induziu maior formação de calos, 100 e 80%, respectivamente, nos explantes, na ausência de BAP. Santos et al. (2003) também não observou calogênese em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Rubi inoculados em meio suplementados com BAP, na ausência de 2,4-D. Esses resultados corroboram com os obtidos neste experimento, visto que baixas concentrações de auxina (1,0 e 2,0 mg L⁻¹) foram consideradas as mais satisfatórias para indução de calos.

Além disso, de acordo com Pinhal et al. (2011), o balanço hormonal entre auxinas e citocininas deve ser equilibrado para promover a formação de calos. Desta forma, pode-se inferir que para pimenta cumari-do-pará, as concentrações 1 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, na

ausência de BAP, promoveram calogênese devido ao balanço com o conteúdo endógeno de citocininas presente no explantes foliares e caulinares.

Já em relação à baixa indução de calogênese em altas concentrações de 2,4-D e BAP (4 mg L^{-1}), Smozinski e Santos (2015) relatam resultados semelhantes em *C. cv. Guaraci cumari-do-pará*, visto que o meio de cultura suplementado com a maior concentração de 2,4-D ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) causou necrose em 96% dos explantes. Palú, Silva e Pasqual (2004) relatam que a partir da concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D ocorreu diminuição na formação de calos em *Coffea arabica* L., provavelmente devido a um efeito fitotóxico causado por concentrações maiores que $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Nogueira et al. (2007), em um estudo de indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno, relata que as áreas cobertas por calos foram significativamente maiores quando os explantes foram inoculados na presença de 2,4-D, evidenciando que a presença desta auxina é essencial no processo de calogênese. Santos et al. (2014), obtiveram maiores porcentagens da área foliar coberta por calo (AFCC) nos tratamentos suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ou $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis., onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da AFCC.

Já Cerqueira et al. (2002), trabalhando com a indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn) verificaram efeito significativo da combinação de auxina e citocinina, obtendo 100% de área coberta com calos em explantes foliares em meio acrescido com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Estes mesmos autores obtiveram 75% de área coberta por calo em explantes caulinares, quando utilizou-se $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Sendo assim, pode-se inferir que a proliferação de calos é dependente da espécie bem como da resposta do explante a reguladores de crescimento. Segundo Karp (1995), as diferenças observadas ocorrem devido à variação na sensibilidade do explante aos fitoreguladores e/ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se que plântulas de cumari-do-pará, provenientes de sementes de frutos frescos, germinadas em meio de cultura MS50% são excelentes fontes de explantes devido ao grande número e alto vigor de plântulas geradas *in vitro*. Em relação a indução de calos nessa espécie, a maior formação de calos e grande área coberta por calos foram obtidas em segmentos caulinares, quando cultivados em meio de cultura suplementado com a combinação de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg L⁻¹ de BAP. Além disso, o meio MS com metade da concentração de sais e suplementado com 15 g L⁻¹ (MS50%) de sacarose forneceu, no geral, os valores mais altos para as características morfológicas para as três espécies estudadas.

Embora a secagem dos frutos tenha favorecido a germinação de sementes e maior vigor de plântulas das pimentas dedo-de-moça, as taxas de germinação dessas, assim como de pimenta malagueta, ainda foram consideradas baixas e, portanto, recomenda-se que novos estudos acerca da germinação dessas pimentas sejam feitos, especialmente, estudos relacionados à superação de dormência e maturação de sementes.

Testes de aclimação das plântulas obtidas *in vitro* e estudos de suspensões celulares são de extrema importância para complementação de informações que contribuam para a exploração comercial destas espécies, bem como de seus compostos bioativos, como a capsaicina.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.S. et al. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* jenipapeiro. **Scientia Plena**, v.9, n.10, p.1-6, 2013.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Planaltina, **Embrapa Cerrados**, 16p., 2002.
- ARIKAT, N. A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1, p. 193-202, 2004.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.117-137, 1998
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed science research**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2004.
- BHUTANI, M. et al. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6- inducible STAT3 activation. **Clinical Cancer Research**, v.13, n.10, p.3024-3032, 2007.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde, 2007. 110 p.
- BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354- 379.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 87-132.
- CARNEIRO, G. G. et al. Germinação de pimentas cambuci submetidas à superação de dormência em água quente. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 882-885, 2010. Disponível em: < <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7225/6621> >. Acesso em: 15 nov. 2017.
- CARVALHO, S. I. C. et al. Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. **Embrapa Hortaliças- Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. **Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp.*)**: Botânica. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004.
- CASTRO, M. M.; GODOY, A. R.; CARDOSO, A. I. I. Qualidade de sementes de quiabeiro em função da idade e do repouso pós-colheita dos frutos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1491-1495, 2008.
- CENTRO DE ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS S A – CEASA (MG). **Informações de Mercado**. Disponível em: < <http://www.ceasaminas.com.br/> > Acesso: 30 de nov. de 2017.

- CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.
- COSTA, L.M. et al. Antimicrobial activity of the genus *Capsicum*. **Higiene Alimentar**, v.23, n.174/175, p.140-145, 2009.
- COSTA, L.V. et al. Caracterização de acessos de pimentas do Amazonas. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 290-298, 2015.
- CRUZ, C. D. Programa Genes - Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen. **Acta Sci., Agron.**, Maringá, v. 38, n. 4, p. 547-552, Dec. 2016. Disponível em: < <http://arquivo.ufv.br/dbg/genes/genes.htm> >
- DIAS, D.C.F.S. et al. Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. **Seed Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 691-699, 2006.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Waterbury, v. 7, n. 7, p.1085. 1995.
- DOMENICO, C. I.; LILLI, A. J. O.; MELO, A. M. T. **Caracterização de componentes de produção de híbridos intra-específicos de pimenta-hortícola**. CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 50. Resumos. Guarapari: ABH (CD-ROM). 2010.
- DOU, D. et al. Tumor Cell Growth Inhibition Is Correlated With Levels of Capsaicin Present in Hot Peppers. **Nutrition and Cancer**, v.63, n.2, p.272-281, 2011.
- DUTRA, F. L. A. et al. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 243-251, 2010.
- FARIAS-FILHO, L. P. F. **Calogênese em anteras e diversidade genética de acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima com base em marcador RAPD**. 54 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.
- FENNER, M.; THOMPSON, K. **The ecology of seeds**. Cambridge: Cambridge University, 2005.
- FERREIRA, P. V. Análise de Variância. In: FERREIRA, P. V. **Estatística Experimental**. [S.l.: s.n.], cap. 4, p. 105-117, 2011. Disponível em: <<https://prodvegetal.files.wordpress.com/2012/03/cap-4.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2017.
- FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2008. 402 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> > Acesso em: 30 nov. 2017.

FREITAS, R. A.; NASCIMENTO, W. M.; CARVALHO, S. I. C. Produção de sementes. In: Ribeiro, S. C. R.; Carvalho, S. I. C.; Henz, G. P.; Reifschneider, F. J. B. **Pimenta *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.173-187, 2008.

FURTADO, A. A. L.; DUTRA, A. S.; DELIZA, R. Processamento de Pimenta Dedo-de-Moça (*Capsicum baccatum* var. *pendulum*) em conserva. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

GENUNCIO, G. C.; ZONTA, E.; NASCIMENTO, E. C. **Pimenta – Tipos e ardências que fazem toda a diferença**. 2015. Disponível em: <
<http://www.revistacampoenegocios.com.br/pimenta-tipos-e-ardencias-que-fazem-toda-a-diferenca/>>. Acesso em: 20 de nov. 2017.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D. **Plant propagation by tissue culture**. Netherlands: Background, 2008. 501p.

GEORGE, E. F. et al. **Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology**. Exegetics limited, 1993.

GOMES, K. K. P. et al. **Calogênese *in vitro* em Segmentos Nodais de Nim indiano**. Disponível em: <
http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/44_640.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.

GRIGOLETTO, E. R. **Micropropagação de *Hancornia speciosa* Gomez (Mangabeira)**. 1997. 73 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 1997.

GUIMARÃES, S. S. et al. Ação repelente, inseticida e fagoinibidora de extratos de pimenta dedo-de-moça sobre o gorgulho do milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 322-328, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo agropecuário 2006**. Rio de Janeiro, 2007. 777p. Disponível em: <
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf> Acesso em: 15 nov. 2017.

JONES, V. M.; MOORE, K. A.; PETERSON, D. M. Capsaicin 8% topical patch (Qutenza) - a review of the evidence. **Journal of pain & palliative care pharmacotherapy**, v. 25, n. 1, p. 32-41, 2011.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.

KITTIPONGPATANA, N. et al. Effect of Some Factors on the Growth of *Capsicum annuum* L. Cell Suspension Culture and Biotransformation of Hydroquinone to Arbutin. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2007.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In:ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-78.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (Edição Especial) p. 56-63, 2000.

LEDO, A. S. et al. *In vitro* germination and acclimatization of cambui tree type seedlings. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1355-1359, 2014.

LEDO, A.S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.5, n.4, p.989-993, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000400007 >. Acesso em: 15 nov. 2017.

LINGUANOTTO NETO, N. **Dicionário Gastronômico: pimentas com suas receitas**. São Paulo: Boccato, 2004.

MADHUMATHY, A. P.; AIVAZI, A.; VIJAYAN, V. A. Larvicidal efficacy of *Capsicum annuum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Jornal of Vector Borne Diseases**, Índia, v.44, n.1, p.223-226, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de semente de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MALDANER, J. et al. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1201-1206, 2006.

MARTIN, F. W.; SANTIAGO, J.; COOK, A. A. **Vegetables for the hot humid tropics** (Part 7. the Peppers, *Capsicum* Series). Science and Education Administration / U. S. Department of Agriculture). New Orleans, 1979. 18p.

MARTINS, G. N. et al. Influência do repouso pós-colheita de frutos na qualidade fisiológica de sementes de mamão. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 2, p. 142-146, 2006.

MEGHVANSI, M. K. et al. Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 1-14, 2010.

MENDONÇA, E.G. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobacterial method. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 3, p. 419-429. 2013.

MENICHINI, F. et al. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum Chinese* Jacq. Cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 553-560, 2009.

MORI, A. et al. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 3222–3229, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, K. S. et al. Efeito de diferentes concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro de plântulas de *Capsicum annuum*. **Anais do II Simpósio da RGV Nordeste**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2015.

NASCIMENTO, W. M.; FREITAS, R. A. Produção de sementes de pimentas. In: RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P.; CARVALHO, S. I. C.; LOPES, C. A. (Org.) **Cultivo de pimentas (*Capsicum spp.*) no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. p. 30-39.

NAVES, V. C. **Propagação in vitro da bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms**. 2001. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

NEVES, W. S. et al. Ação nematicida de extratos de alho, mostarda, pimento malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsaicinóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 4, p. 255-261, 2009.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.366-70, 2007.

PAZ, E. S. **Indução e dinâmica de crescimento de calos e de suspensão celular de *Capsicum Frutescens* cv. Stromboli**. 2006. 59 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

PALÚ, E. G.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 736-742, 2004.

PICKERSGRILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, p. 925–940, 2007.

PINHAL, H.F. et al. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINHEIRO, B. J.; AMARO G. B.; PEREIRA, R. B. Nematóides em pimentas do gênero *Capsicum*. Brasília, DF. Embrapa. **Circular Técnica** n.104. Outubro, 2012.

PINTO, C.M.F.; PINTO, C. L.O; DONZELES, S. M. L. Pimenta *Capsicum*: Propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2013.

PIRES, P. A. et al. Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da *Capsicum frutescens* – Solanaceae (Pimenta Malagueta). **Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida**, v. 4, n. 2, jul.-dez., p. 129-134, 2004.

PRUDENTE, D. O.; RESENDE, J. M.; NERY, F. C. Cultivo *in vitro* de nabo forrageiro. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 2, n. 3, 2015.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazonia Ocidental, Manaus-AM, 48 p., 2008.

RAMACHANDRA RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

RANDLE, W. M; HONMA, S. Dormancy in peppers. **Scientia Horticulturae**, v. 14, n. 1, p. 19-25, 1981.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Org.) **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa Hortaliças, 2000. 113p.

REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**. V 55, n. 3, p. 160-167, 2008.

RICCI, N. et al. Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 2, 2013.

RIBEIRO, C. S. C. et al. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 153p.

RIBEIRO, C. S. C.; REIFSCHNEIDER F. J. B. 2008. Genética e melhoramento. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org). **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 55-69.

RIVAS, M.; SUNDSTROM, F. J.; EDWARDS, R. L. Germination and crop development of hot pepper after seed priming. **HortScience**, v. 19, n. 2, p. 279-281, 1984.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calluses from *Cissussicyoides* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

RUFINO, J.L.S.; PENTEADO, D.C.S. Importância econômica, perspectiva e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**, v.27, n.235, p.7-15, 2006.

SALOMÃO A. N.; SOUSA-SILVA J. C. Germinação, análise e armazenamento de sementes. In: Salomão A. N. et al. (Eds) **Germinação de sementes e produção de mudas e plantas do Cerrado**. Rede de Sementes do Cerrado, p.3-10, 2003.

SANTOS, M. R. A. et al. Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 10, n. 2, p. 41-46, 2014.

SANTOS, B. R. et al. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.

SANTOS, C. G. et al. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2010. 1102 p.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** V.11, p.118-131, 1957.

SMOZINSKI, C. V; SANTOS, M. R. A. **Indução de calos em explantes foliares, nodais e entrenodais de *Capsicum chinense* Jacq. cultivar Guaraci Cumari do Pará**. 2015. Disponível em: < <http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/handle/123456789/1976> >. Acesso em: 18 de nov. 2017.

SOUZA, P. G. **Indução e padrão de crescimento de calos friáveis de *Capsicum Annuum* cv. Pimentão amarelo**. 1026. 39 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2016.

SOUZA, A. V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica [*Lychnophora pinaster* (Mart.)]**. 2003. 126 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Cytokinins. **Plant Physiology**. California: Cummings, 1991. cap. 17, p. 452-471.

TAKAHASHI, E. K. **Transferência do gene *atacina A* para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.

TORRES, A.C, et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.261-264.1998.

VAN WYK, B. E.; WINK, M. **Medicinal plants of the world: an illustrated scientific guide to important medicinal plants and their uses**. Portland: Timber Press, 2004.

VANISREE, M. et al. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1-22, 2004.

VIDIGAL, D.S. et al. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.87-93, 2006.

VIETEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Wallingford, v. 32, p. 140-147, Jul./Sept. 1996.

ZANOTTI, R. F. et al. Germinação e indução da calogênese *in vitro* de copaíba. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 986-991, 2012. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/germinacao%20e%20induca%20i.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Germinação de sementes de *Capsicum spp.* provenientes de frutos frescos ao longo de 30 dias.

Pimenta		Dias												
		0	7	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Malagueta	MS100%	0,00	0,00	0,00	1,7	6,7	6,7	06,7	10,0	11,7	13,3	16,7	16,7	18,3
	MS50%	0,00	3,3	6,7	6,7	10,0	10,0	11,7	15,0	15,0	18,3	18,3	18,3	18,3
Cumari-do-pará	MS100%	0,00	6,7	18,3	40,0	48,3	56,7	70,0	78,3	85,0	90,0	90,0	93,3	93,3
	MS50%	0,00	15,0	43,3	56,7	66,7	70,0	81,7	85,0	86,7	88,3	88,3	88,3	88,3
Dedo-de-moça	MS100%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,7	1,7
	MS50%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

APÊNDICE B - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para germinação de sementes de *Capsicum spp.* provenientes de frutos frescos em diferentes concentrações de meio MS.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Somas de Quadrado	Quadrados Médios	Fcal	Probabilidade (%)
Espécies	1	4,28702	4,28702	177,25949	0,0**
Meios	1	0,01268	0,01268	0,52426	100,0 ns
Espécies x Meios	1	0,00615	0,00615	0,25412	100,0 ns
Resíduo	20	0,4837	0,02419		
Coefficiente de Variação (%)				18,40	

** - Significativo a nível de 1% de significância do Teste F. ns - Não significativo no Teste F.

APÊNDICE C - Dados utilizados na geração da Figura 7 – Germinação de sementes de *Capsicum spp.* provenientes de frutos secos ao longo de 30 dias.

Pimenta		Dias													
		0	5	7	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Malagueta	MS100%	0,00	0,00	0,00	3,3	5,0	8,3	10,0	10,0	10,0	11,7	11,7	11,7	11,7	11,7
	MS50%	0,00	0,00	1,7	6,7	6,7	10,0	11,7	13,3	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7
	MS0%	0,00	0,00	0,00	8,3	8,3	10,0	10,0	11,7	11,7	11,7	13,3	13,3	13,3	13,3
Cumari-do-pará	MS100%	0,00	8,3	33,3	61,7	61,7	68,3	73,3	75,0	75,0	78,3	80,0	80,0	80,0	80,0
	MS50%	0,00	16,0	34,0	50,0	50,0	52,0	56,0	58,0	58,0	58,0	60,0	62,0	64,0	
	MS0%	0,00	14,0	40,0	56,0	56,0	62,0	62,0	64,0	68,0	68,0	68,0	68,0	68,0	
Dedo-de-moça	MS100%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	
	MS50%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,0	6,0	
	MS0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,7	3,3	5,0	8,3	8,3	11,7	25,0	31,7	

APÊNDICE D - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para germinação de sementes de *Capsicum spp.* provenientes de frutos secos em diferentes concentrações de meio MS.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Somas de Quadrado	Quadrados Médios	Fcal	Probabilidade (%)
Espécies	2	4,66782	2,33391	58,26041	0,0**
Meios	2	0,13604	0,06802	1,69789	19,45837 ns
Espécies x Meios	4	0,47241	0,1181	2,94817	3,01576 *
Resíduo	45	1,8027	0,04006		
Coefficiente de Variação (%)				33,44	

** - Significativo a nível de 1% de significância do Teste F. * - Significativo a nível de 5% de significância do Teste F. ns - Não significativo no Teste F

APÊNDICE E - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de características morfológicas de plântulas de *Capsicum spp.* obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos frescos.

Variável	FV ¹	GL ²	SQ ³	QM ⁴	Fcal	Probabilidade (%)
Tamanho da Planta	Espécies	1	0,00325	0,00325	0,07884	100,0 ns
	Meios	1	0,33794	0,33794	8,2083	0,95704**
	Espécies x Meios	1	0,02484	0,02484	0,60341	100,0 ns
	Resíduo	20	0,82341	0,04117		
Coefficiente de Variação (%)					6,55	
Comprimento da parte aérea	Espécies	1	0,06232	0,06232	2,29428	14,54948 ns
	Meios	1	0,16313	0,16313	6,00541	2,35859 *
	Espécies x Meios	1	0,00005	0,00005	0,00196	100,0 ns
	Resíduo	20	0,54327	0,02716		
Coefficiente de Variação (%)					7,70	
Número de raízes secundárias	Espécies	1	24,4945	24,49452	151,3035	0,0 **
	Meios	1	0,01225	0,01225	0,07569	100,0 ns
	Espécies x Meios	1	0,04091	0,04091	0,25267	100,0 ns
	Resíduo	20	3,2378	0,16189		
Coefficiente de Variação (%)					16,23	
Comprimento da raiz principal	Espécies	1	0,02243	0,02243	0,80573	100,0 ns
	Meios	1	0,16631	0,16631	5,97328	2,39164 *
	Espécies x Meios	1	0,03917	0,03917	1,40698	24,94577 ns
	Resíduo	20	0,55685	0,02784		
Coefficiente de Variação (%)					7,12	
Número de Folhas	Espécies	1	0,34782	0,34782	11,73815	0,26736 **
	Meios	1	0,04441	0,04441	1,49885	23,50739 ns
	Espécies x Meios	1	0,01777	0,01777	0,59983	100,0 ns
	Resíduo	20	0,59263	0,02963		
Coefficiente de Variação (%)					8,82	
Largura da folha	Espécies	1	0,00368	0,00368	0,60536	100,0 ns
	Meios	1	0,00345	0,00345	0,56798	100,0 ns
	Espécies x Meios	1	0,04776	0,04776	7,85466	1,09916 *
	Resíduo	20	0,12162	0,00608		
Coefficiente de Variação (%)					7,91	
Comprimento da folha	Espécies	1	0,00303	0,00303	0,19756	100,0 ns
	Meios	1	0,01954	0,01954	1,27513	27,21678 ns
	Espécies x Meios	1	0,08936	0,08936	5,83012	2,54537 *
	Resíduo	20	0,30655	0,01533		
Coefficiente de Variação (%)					9,18	
Matéria fresca	Espécies	1	0,0021	0,0021	13,1465	0,16825 **
	Meios	1	0,0005	0,0005	3,15863	9,07372 ns
	Espécies x Meios	1	0,0	0,0	0,01449	100,0 ns
	Resíduo	20	0,00319	0,00016		
Coefficiente de Variação (%)					1,67	

¹ Fontes de variação. ² Grau de Liberdade. ³ Soma de Quadrados. ⁴ Quadrado Médio.

** - Significativo a nível de 1% de significância do Teste F. * - Significativo a nível de 5% de significância do Teste F. ns - Não significativo no Teste F

APÊNDICE F - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de características morfológicas de plântulas de *Capsicum spp.* obtidas de germinação *in vitro* de sementes de frutos secos.

Variável	FV ¹	GL ²	SQ ³	QM ⁴	Fcal	Probabilidade (%)
Tamanho da planta	Espécies	2	1,70777	0,85389	3,28502	4,89267 *
	Meios	2	2,60681	1,30341	5,01439	1,19897 *
	Espécies x Meios	4	4,91701	1,22925	4,72911	0,35958 **
	Resíduo	36	9,3576	0,25993		
Coefficiente de Variação (%)					6,55	
Comprimento da parte aérea	Espécies	2	0,72069	0,36035	2,63	8,58825 ns
	Meios	2	1,55428	0,77714	5,67198	0,72194 **
	Espécies x Meios	4	2,45679	0,6142	4,48273	0,48333 **
	Resíduo	36	4,9325	0,13701		
Coefficiente de Variação (%)					7,70	
Número de raízes secundárias	Espécies	2	0,19454	0,09727	0,73431	100,0 ns
	Meios	2	0,20956	0,10478	0,79103	100,0 ns
	Espécies x Meios	3	0,15793	0,05264	0,39742	100,0 ns
	Resíduo	16	2,1194	0,13246		
Coefficiente de Variação (%)					16,23	
Comprimento da raiz principal	Espécies	2	0,75299	0,3765	3,6057	3,73801 *
	Meios	2	0,63532	0,31766	3,04226	6,01483 ns
	Espécies x Meios	4	1,57081	0,3927	3,76092	1,17508 *
	Resíduo	36	3,759	0,10442		
Coefficiente de Variação (%)					7,12	
Número de folhas	Espécies	2	4,00472	2,00236	39,79521	0,0 **
	Meios	2	0,1084	0,0542	1,07722	35,12613 ns
	Espécies x Meios	4	0,76261	0,19065	3,78905	1,13441 *
	Resíduo	36	1,8114	0,05032		
Coefficiente de Variação (%)					8,82	
Largura da folha	Espécies	2	0,00016	0,00008	0,00546	100,0 ns
	Meios	2	0,0912	0,0456	3,02558	6,10128 ns
	Espécies x Meios	4	0,21024	0,05256	3,48714	1,65971 *
	Resíduo	36	0,5426	0,01507		
Coefficiente de Variação (%)					7,91	
Comprimento da folha	Espécies	2	2,25735	1,12868	415,46339	0,0 **
	Meios	2	0,01427	0,00714	2,62658	8,61389 ns
	Espécies x Meios	4	0,02862	0,00716	2,63395	4,997 *
	Resíduo	36	0,0978	0,00272		
Coefficiente de Variação (%)					9,18	
Matéria fresca	Espécies	2	0,00059	0,0003	4,43333	1,89998 *
	Meios	2	0,00059	0,0003	4,43333	1,89998 *
	Espécies x Meios	4	0,00134	0,00034	5,03333	0,25088 **
	Resíduo	36	0,0024	0,00007		
Coefficiente de Variação (%)					1,13	

¹ Fontes de variação. ² Grau de Liberdade. ³ Soma de Quadrados. ⁴ Quadrado Médio.

** - Significativo a nível de 1% de significância do Teste F. * - Significativo a nível de 5% de significância do Teste F. ns - Não significativo no Teste F

APÊNDICE G - Dados utilizados na geração do Figura 8 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células calos (ACCC) em explantes caulinares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D, após 30 dias de cultivo.

Tratamento	IC(%)	ACCC(%)
0mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	0,00	0
1mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	66,67	36,67
1mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	33,33	62,5
1mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	25,00	75
1mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	8,33	10
2mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	100,00	66,67
2mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	33,33	30
2mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	41,67	62,5
2mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	8,33	25

APÊNDICE H - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de indução de calos em explantes caulinares de *Capsicum chinense* Jacquin (cumari-do-pará) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Somas de Quadrado	Quadrados Médios	Fcal	Probabilidade (%)
BAP	3	0,83176	0,27725	7,01176	0,02556 **
2,4 D	3	1,56862	0,52287	13,22353	0,0 **
BAP x 2,4-D	6	1,30067	0,21678	5,48235	0,01248 **
RESÍDUO	96	3,79595	0,03954		
Coefficiente de Variação (%)				24,89	

** - Significativo a nível de 1% de significância do Teste F

APÊNDICE I - Resumo da análise de variância em esquema fatorial para médias de indução de calos em explantes foliares de *Capsicum chinense* Jacquin (cumari-do-pará) sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 30 dias de cultivo.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Somas de Quadrado	Quadrados Médios	Fcal	Probabilidade (%)
BAP	3	0,16186	0,05395	1,60491	19,29461 ns
2,4-D	3	0,36279	0,12093	3,59724	1,61532 *
BAP x 2,4-D	6	0,45209	0,07535	2,24131	4,51939 *
RESÍDUO	101	3,3954	0,03362		
Coefficiente de Variação (%)				24,26	

* - Significativo ao nível de 5% de significância do Teste F. ns - Não significativo no Teste F

APÊNDICE J - Dados utilizados na geração do Figura 9 – Porcentagem de indução de calos (IC) e área do explante coberta por células calos (ACCC) em explantes foliares de cumari-do-pará em diferentes combinações de BAP e 2,4-D

Tratamento	IC(%)	ACCC (%)
0mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	0,00	0
0mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	0,00	0
1mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	41,67	50
1mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	0,00	0
1mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	8,33	25
1mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	16,67	50
2mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	33,33	41,67
2mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	33,33	25
2mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	8,33	10
2mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 0mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 1mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 2mg/L BAP	0,00	0
4mg/L 2,4-D + 4mg/L BAP	8,33	10

APÊNDICE K – Plântulas de cumari-do-pará proveniente de sementes frescas germinadas *in vitro* em meio MS.



APÊNDICE L – Calos em explantes caulinares de cumari-do-pará, em que **a)** 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP, **b)** 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,0 mg L⁻¹ de BAP e **c)** 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP.

