

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA MULTIPLICAÇÃO  
*IN VITRO* DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

ÁREA: Biotecnologia Vegetal

Aluna: Gracy Kelly Mazuhovitz  
Orientadora: Prof. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado, como parte das exigências  
para a conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA  
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA-PR  
Novembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR PALOTINA  
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA MULTIPLICAÇÃO  
*IN VITRO* DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

Aluna: Gracy Kelly Mazuhovitz  
Supervisora: Prof. Dra Luciana Bicca Dode  
Orientadora: Prof. Dra. Roberta Paulert

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado, como parte das exigências  
para a conclusão do CURSO DE  
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA  
EM BIOTECNOLOGIA

PALOTINA-PR  
Novembro de 2013

*“Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo.”*

George R. R. Martin

Dedico à José Mazuhovitz  
Rutiléia Gomes Mazuhovitz  
E Leandro Pegas de Brito Maurenre

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Mazuhovitz e Rutiléia Gomes Mazuhovitz por acreditarem e apoiarem todos meus projetos bem como por me darem sempre o exemplo de que com força e dedicação tudo é possível e principalmente por me darem força nos momentos difíceis.

Ao Leandro Pêgas de Brito Maurenre pelo companheirismo, apoio, paciência e por me mostrar que nenhum problema é grande o suficiente para nos fazer parar.

Aos meus irmãos Leandro Marcelo Mazuhovitz e Camila Gomes Mazuhovitz pelos momentos de descontração, pela amizade e por todas as experiências que adquirimos juntos.

A Professora Doutora Roberta Paulert por me orientar e pela disposição em me ajudar.

A Professora Doutora Luciana Bicca Dode pelo excelente trabalho que desempenha, por ser uma supervisora tão dedicada e principalmente por me receber no laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciência e Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas e neste caso agradeço também ao Professor Doutor Luciano da Silva Pinto coordenador do curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

A Priscila Juliana Trebien pelas quartas-feiras mais animadas dos últimos tempos e por me fazer rir nos momentos difíceis.

A Tharyn Reichel, Cintia S. Garcia, Daniele Masiero pelo espírito de equipe dentro e fora do laboratório sempre dispostas a ajudarem.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma das atividades para otimização das condições de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum baccatum</i> . .....	8
FIGURA 2- Processo de abertura dos frutos e retirada das sementes das pimentas (a) cambuci e (b) dedo-de-moça.....	9
FIGURA 3. Frascos contendo água-ágar e as sementes de <i>Capsicum baccatum</i> dispostas para germinação. ....	10
FIGURA 4. Frascos contendo sementes de <i>Capsicum baccatum</i> no meio de cultura água-ágar 6% e GA <sub>3</sub> .....	10
FIGURA 5. Plântulas de <i>Capsicum baccatum</i> mensuradas medidas com auxílio de uma régua. ....	11
FIGURA 6. Comparação da média de germinação diária das sementes de pimenta Dedo-de-moça ( <i>in natura</i> e comercial) e Cambuci ( <i>in natura</i> e comercial).....	13
FIGURA 7. Germinação média de sementes de <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> em água-ágar contendo 1,88 mg/L de GA <sub>3</sub> .....	14
FIGURA 8. Influência da concentração de GA <sub>3</sub> no desenvolvimento das plantas de <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> .....	15
FIGURA 9. Calos induzidos a partir de (a) cotilédones e (b) hipocótilos com 5mg/ L de BAP e 0,2 mg/ L de ANA após 30 dias de cultivo. ....	16
FIGURA 10. Calos induzidos a partir de (a) cotilédones e (b) hipocótilos com 2 mg/L de 2,4-D após 10 dias de cultivo. ....	16
FIGURA 11. Ápices que apresentaram hiperhidricidade à esquerda.....	17
FIGURA 12. Plântulas regeneradas através de ápices de <i>C. baccatum</i> em meio pulse contendo carvão ativo. (a) Formação de raízes (b) Parte aérea. ....	17

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
CDTEC	Centro de desenvolvimento de Ciência e tecnologia
2,4 – D	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético
Var.	Variedade

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 PIMENTAS .....	2
2.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	3
2.2.1 Meios Nutritivos.....	3
2.2.2 Reguladores de Crescimento .....	4
2.2.3 Explantes .....	5
2.2.4 Organogênese .....	5
2.2.5 Aclimação.....	6
3 OBJETIVO GERAL.....	7
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL E ATIVIDADES DO ESTÁGIO .....	8
4.2 PREPARO DAS SEMENTES .....	9
4.2.1 Desinfestação das sementes de <i>C. baccatum in natura</i> e comerciais .....	9
4.3 TRANSFERÊNCIA DAS SEMENTES DE <i>C. baccatum</i> PARA O MEIO DE GERMINAÇÃO	9
4.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Capsicum baccatum</i> EM DIFERENTES	
CONCENTRAÇÕES DE GA <sub>3</sub> .....	10
4.5 INDUÇÃO DE CALOS de <i>C. baccatum</i> .....	11
4.6 CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES .....	11
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
5.1 COMPARAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COMERCIAIS COM AS	
SEMENTES <i>IN NATURA</i> .....	13
5.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>C. baccatum</i> SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	
DE GA <sub>3</sub> .....	13
5.3 INDUÇÃO DE CALOS .....	15
5.4 CULTIVO DE ÁPICES .....	16
6 CONCLUSÕES.....	18
7 REFERÊNCIAS .....	19



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e possui cinco espécies domesticadas *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* e *Capsicum frutescens* L. (LINS et al., 2001) que são mundialmente apreciadas. Estas espécies possuem importância econômica na indústria alimentícia por possuir características sensoriais que agradam ao homem, além de fornecerem princípios ativos para a indústria farmacêutica e cosmética (MAPELI et al., 2011). As plantas são também utilizadas como ornamentais devido ao porte pequeno e diferentes cores dos frutos no processo de maturação (CARVALHO et al., 2003).

A presença de dois capsaicinóides (capsaicina e diidrocapsaicina) agrega às pimentas a pungência ou picância. Os frutos são também ricos em vitaminas e carboidratos, além de possuir vários antioxidantes que ajudam a prevenir doenças como câncer e mal de Parkinson (REIFSCHNEIDER, 2000).

A *Capsicum baccatum* é extremamente difundida na América do Sul, possui variedades domesticadas e não domesticadas. As pimentas dedo-de-moça e cambuci pertencem a espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, espécie domesticada. São muito apreciadas na culinária, sendo a cambuci uma pimenta cujos frutos são campanulados de coloração vermelha ou amarela quando maduros com pungência doce e a dedo-de-moça que possui frutos alongados e vermelhos quando maduros de pungência picante (REIFSCHNEIDER, 2000; LOPES et al., 2007).

No Brasil o cultivo de pimenta é muito importante tanto economicamente quanto socialmente, uma vez que o mesmo necessita de um elevado número de mão-de-obra além de garantir a permanência dos pequenos produtores no campo (REIFSCHNEIDER, 2000).

Entretanto como todo organismo vivo, sofrem ações de agentes endógenos e do ambiente (fatores bióticos e abióticos) (MAPELI et al., 2011). As pimentas são plantas extremamente suscetíveis a ataques de pragas e doenças causadas por fungos, nematoides e vírus, existe então um crescente número de pesquisas de transformação genética realizadas com o intuito de se obter plantas resistentes à tais ataques.

O aperfeiçoamento do cultivo *in vitro* destas espécies é de suma importância para que essa transformação ocorra uma vez que uma das principais dificuldades é regenerar uma planta de qualidade e livre de contaminações após a transformação. Desta forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar as condições para cultivar e multiplicar *in vitro* tecidos e células de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* tipos cambuci e dedo-de-moça.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PIMENTAS

A família Solanaceae compreende aproximadamente 90 gêneros e cerca 3000 espécies catalogadas. São plantas cosmopolitas, ou seja, cultivadas em várias partes do mundo e se adaptam bem a climas tropicais e temperados (BARROSO, 1991). Algumas das espécies presentes nesta família utilizadas na alimentação humana são: a batata (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*S. lycopersicum* L.) e as pimentas e pimentões (*Capsicum*) (GIACOMIN, 2010).

As espécies que pertencem ao gênero *Capsicum* compreendem uma grande variedade de pimentas e pimentões, desde as pimentas doces até as com elevado grau de pungência. São originárias das Américas, porém são produzidas por diversos países. No Brasil a única espécie que não é produzida é a *C. pubescens* e as espécies mais consumidas são a *C. baccatum* e a *C. chinense* que se adaptam bem ao clima equatorial e tropical (MAPELI et al., 2011).

Além de estimularem o apetite e ajudarem na digestão, estes frutos possuem alto valor nutricional sendo fonte de: vitaminas, proteínas, lipídios, glicídios, minerais, celulose, água e fibras. Um importante componente são os antioxidantes, sendo os principais as vitaminas C, E e os carotenóides que existem evidências de prevenirem doenças como: mal de Alzheimer, mal de Parkinson, doenças cardiovasculares, cataratas e câncer (REIFSCHNEIDER, 2000).

A *Capsicum baccatum* é extremamente difundida na América do Sul, segundo relatos históricos ela é cultivada desde cerca de 2500 a.C. e sua origem é da região da Bolívia e Peru (REIFSCHNEIDER, 2000).

*Capsicum baccatum* var. *pendulum* é a variedade mais consumida no sul e sudeste do Brasil, sendo os tipos dedo-de-moça e cambuci os mais comuns. A pimenta dedo-de-moça é caracterizada por possuir frutos alongados e pendentes que são verdes quando imaturos e vermelhos quando maduros, sua pungência é de um picante baixo e é geralmente utilizada em molhos, conservas e na calabresa. Por outro lado a pimenta cambuci (também conhecida como “Chapéu-de-Frade”) possui frutos campanulados e pendentes com coloração verde quando imaturos e vermelhos ou amarelos quando maduros, sua pungência é doce e é utilizada geralmente em saladas e cozidos (LOPES et al., 2007).

Atualmente as pimentas possuem uma importante posição econômica, uma vez que a China e a Índia são grandes produtores com um milhão de hectares cultivados com *Capsicum*. O Brasil também tem importante papel nesta produção uma vez que possui uma área cultivada

anualmente de aproximadamente dois mil hectares, sendo que Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul são os principais produtores. A produção média varia de espécie para espécie entre 10 e 30 t/ha (LOPES et al., 2007).

Um dos principais problemas referente ao cultivo da pimenta é que é uma planta suscetível a doenças causadas por fungos nematoides e vírus, bem como ao ataque de pragas. Devido à isso a pesquisa com melhoramento para obter cultivares resistentes a estes ataques tem se tornado cada vez mais frequente (BLAT, 2004; CARVALHO et al., 2009; PEREIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

## 2.2 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* consiste em estabelecer o cultivo de células e tecidos vegetais sob condições controladas, como assepsia, luz, temperatura, aeração, CO<sub>2</sub> e a composição do meio de cultura que deve apresentar todos os nutrientes que a planta necessita (QUISEN et al., 2008), bem como reguladores de crescimento que podem acelerar e melhorar este processo.

Embora haja trabalhos com sucesso relativo em relação à morfogênese no gênero *Capsicum* (OCHOA-ALEJA & IRETA-MORENO, 1990; RAMIREZ-MALAGÓN & OCHOA-ALEJA, 1992; HUSAIN et al., 1999; MASIEIRO et al., 2012.), estabelecimento de um cultivo *in vitro* para a pimenta tem sido problemático, uma vez que as pimentas apresentam severa recalcitrância (RÊGO et al., 2011). Outro fator que limita este cultivo é a dependência do genótipo que influencia a organogênese, pois o gênero *Capsicum* apresenta forte especificidade genotípica em sua capacidade de regeneração das diferentes cultivares quando são submetidas à cultura de tecidos, dificultando assim o estabelecimento de um protocolo modelo (JOSHI et al., 2007).

### 2.2.1 Meios Nutritivos

Os meios nutritivos são essenciais para o cultivo de tecido, uma vez que fornecem todos os nutrientes, minerais e compostos orgânicos que a planta precisa para realizar seus processos metabólicos, energéticos e estruturais. White, em 1945, definiu os principais nutrientes utilizados até hoje nos meios nutritivos e em 1962 Murashige e Skoog a partir de

suplementação do meio White criaram o meio de cultivo MS cuja composição é utilizada até hoje (CALDAS et al., 1998).

Os meios nutritivos de maneira geral tem a seguinte composição: água, macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, vitaminas, mio Inositol, hormônios, misturas complexas, outros aditivos e ágar ou semelhantes.

Além da composição outras características são importantes como o pH, por exemplo, que deve estar ligeiramente ácido entre 5 e 6. O pH pode ter efeitos diretos e indiretos sobre o cultivo de células uma vez que este pode influenciar na absorção de nutrientes e hormônios. Para a utilização do meio este deve ser autoclavado para manter a assepsia do cultivo *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Para o cultivo de pimentas geralmente se utiliza o meio MS com 3% de sacarose que é descrito por diversos autores (BUYUKALACA, MAVITUNA, 1996; VALADEZ-BUSTOS et al.,2009 ) obtendo-se sucesso. Porém há variações quanto à concentração de sacarose de 1 a 10% em diversas pesquisas dependendo do que se está testando, por exemplo, para germinação usa-se geralmente água-ágar ou MS com 1% de sacarose (VALADEZ-BUSTOS et al.,2009;) já para organogênese a concentração de sacarose geralmente é mais alta de 3 à 10% (AROUS et al.,2001, BINZEL et al., 1996).

O meio de cultura geralmente é suplementado com reguladores de crescimento que vão variar dependendo o tipo de indução que se espera.

A assepsia também é um fator limitante no cultivo de pimentas *in vitro*. Melhorias quanto à redução de contaminantes e oxidação são descritas por Penalva et al.,(2009), sugerindo a utilização de carvão ativo no meio de cultivo.

### 2.2.2 Reguladores de Crescimento

A utilização de reguladores de crescimento ou hormônios em concentrações ideais é um fator determinante para o crescimento e desenvolvimento do cultivo *in vitro*. Existem várias classes de reguladores de crescimento, mas os principais são auxinas, citocininas, giberelinas, e etileno que é o único hormônio em estado gasoso.

As giberelinas são muito utilizadas na germinação e alongamentos de plantas e são substancias quimicamente relacionadas ao ácido giberélico (GA<sub>3</sub>). As citocininas são responsáveis por induzir a divisão celular nas plantas, no cultivo *in vitro* quando se utiliza uma maior concentração de citocinina do que de auxina há a indução de formação de parte

aérea, são exemplos de citocinina o ácido indolbutírico(AIB) e ácido naftalenoacético (ANA). As auxinas são substâncias quimicamente relacionadas ao ácido indolil-3-acético (AIA), quando utilizada no cultivo *in vitro* com uma concentração superior a da citocinina esta substância promove a formação de raízes, uma das auxinas muito utilizada é o 2,4-D que é muito utilizado como componente de herbicidas (CALDAS et al., 1998).

### 2.2.3 Explantes

A obtenção e tratamento dos explantes são de suma importância para que o cultivo *in vitro* se estabeleça. Quanto mais jovem o explante, for maior a chance de sucesso do experimento. Geralmente se utiliza a germinação *in vitro* para a obtenção dos explantes por se tratar de uma técnica que fornece plantas livres de contaminações. Um fator que muitas vezes dificulta este processo é a dormência das sementes, que embora algumas de suas causas sejam conhecidas, não existe uma definição que seja precisa. A dormência pode ser dividida em primária e secundária, onde a primária se estabelece durante o desenvolvimento e/ou maturação das sementes e se deve não só ao genótipo como também das condições de maturação como fotoperíodo, estresse hídrico e baixas temperaturas, por exemplo, além de fatores biológicos como idade da planta mãe durante a indução floral ou maturação das sementes, posição da flor na planta e posição da semente no fruto. A dormência secundária se desenvolve após a maturação devido a uma situação desfavorável ou estresse que dificulte a germinação como é o caso da falta ou excesso de água e falta de oxigênio (CARDOSO, 2004).

Existem várias formas de se quebrar a dormência das sementes dependendo da causa, dentre elas a estratificação, escarificação mecânica e química, lixiviação, utilização de agentes químicos (ácido sulfúrico, hipoclorito de sódio, ácido nítrico, etanol, nitrato de potássio, etc.) e utilização de reguladores de crescimento (geralmente ácido giberélico) (ZAIDAN e BARBEDO, 2004).

### 2.2.4 Organogênese

A organogênese trata-se do processo de diferenciação das células para a formação de órgãos (brotos, raízes, folhas, etc.) (ANDRADE, 2002) pode ser direta ou indireta, sendo a direta quando se utiliza de um órgão ou segmento de material vegetal para a formação de

brotos ou raízes. Por outro lado a organogênese indireta se trata da obtenção de brotos e/ou raízes após a indução da calogênese (QUISEN et al., 2008).

Muitos pesquisadores obtiveram sucesso na organogênese direta e indireta de *Capsicum* através de diversos explantes sob concentrações variadas de reguladores de crescimento. Há uma grande diferença de resposta quando se trabalha com diferentes explantes (EZURA et al., 1993; CHRISTOPHER & RAJAM, 1996), portanto há a necessidade de protocolos para explantes diferentes como já vem sendo estudado há algum tempo, os principais explantes utilizados são: cotilédones e hipocótilos, (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009; ARROYO e REVILLA, 1991; AGRAWAL et al., 1989 AROUS et al., 2001; MASIEIRO et al., 2012; BATISTA, 2012) ápice caulinar (HIDE e PHILLIPS, 1996) e embrião zigótico (AROUS et al., 2001; BINZEL et al., 1996).

### 2.2.5 Aclimação

Trata-se do processo de aclimação da planta às condições ambientais posteriormente ao cultivo *in vitro*, onde a planta é submetida a condições normais, ou seja, retirada da condição extremamente controlada e asséptica em que se encontra quando se trabalha com o cultivo *in vitro* (QUISEN et al., 2008).

A aclimação muitas vezes representa um fator limitante do processo de cultivo *in vitro*, pois a planta passa de um microambiente ao qual ela já está adaptada, com todos os nutrientes necessários disponíveis e reguladores de crescimento para um macroambiente, portanto é necessário que a umidade seja alta e que se trabalhe com temperaturas amenas (CARVALHO et al., 2006).

No processo de aclimação a planta tem as seguintes condições alteradas (GRATTAPAGLIA et al., 1998):

- Aumento na taxa de transpiração, ficando susceptível ao estresse hídrico,
- Passa a ter que realizar fotossíntese, pois antes retirava todos os nutrientes do meio,
- Passa para um meio com menos disponibilidade de nutrientes tendo que incrementar sua absorção dos mesmos e sais,
- Acaba a condição de assepsia, ou seja, a planta fica sujeita a microrganismos que podem ser patogênicos.

### 3 OBJETIVO GERAL

Testar protocolos para otimizar as condições de cultivo *in vitro* de *Capsicum baccatum*. var. *pendulum*, tipos dedo-de-moça e Cambuci.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparação da germinação de sementes comerciais com sementes *in natura*.
- Otimização do processo de germinação utilizando duas concentrações de GA<sub>3</sub>
- Padronização do processo de obtenção de explantes *in vitro*.
- Obtenção de calogênese em dois diferentes explantes utilizando diferentes concentrações de reguladores de crescimento.
- Obtenção, enraizamento e aclimação de plântulas formadas a partir de ápices de plantas germinadas *in vitro*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL E ATIVIDADES DO ESTÁGIO

As atividades relacionadas ao estágio supervisionado obrigatório ocorreram nas dependências da Universidade Federal de Pelotas. O período das atividades relativas ao estágio foi de três meses (de agosto a novembro de 2013) totalizando 360 horas de estágio obrigatório. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEC) da Universidade Federal de Pelotas.

As atividades foram organizadas conforme descrito na Figura 1.

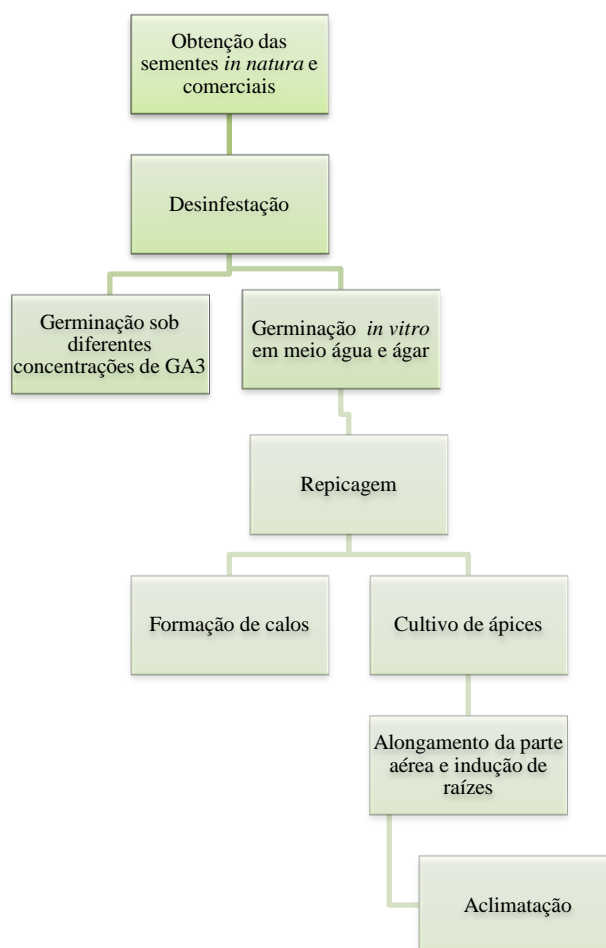


FIGURA 1 – Fluxograma das atividades para otimização das condições de cultivo *in vitro* de *Capsicum baccatum*.



## 4.2 PREPARO DAS SEMENTES

Nos ensaios realizados, foram utilizadas sementes *in natura* retiradas de frutos de pimentas cambuci e dedo-de-moça adquiridas no comércio local e sementes comerciais da marca TECNOSEED<sup>®</sup>.

### 4.2.1 Desinfestação das sementes de *C. baccatum* *in natura* e comerciais

Para obtenção das sementes *in natura*, os frutos foram previamente lavados e desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 0,5% por vinte minutos. Após este procedimento, foram lavados com água destilada, em seguida foram cortados com auxílio de um bisturi em capela de fluxo laminar (Figuras 2a e 2b).



FIGURA 2- Processo de abertura dos frutos e retirada das sementes das pimentas (a) cambuci e (b) dedo-de-moça.

Na cabine de segurança biológica, as sementes passaram pelo processo de desinfestação sendo colocadas em um béquer contendo álcool 70% por dois minutos, depois lavadas com água destilada autoclavada. Após a lavagem, adicionou-se hipoclorito de sódio a 1% e manteve-se durante 20 minutos. Por último, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por três vezes.

## 4.3 TRANSFERÊNCIA DAS SEMENTES DE *C. baccatum* PARA O MEIO DE GERMINAÇÃO

Tendo-se feito a desinfestação, as sementes comerciais e as sementes *in natura* foram inoculadas de maneira uniforme, com auxílio de uma pinça esterilizada, em frascos de vidro

contendo 25 mL de meio de cultivo água-ágar 0,6% previamente autoclavado (Figura 3), com a finalidade de se calcular o percentual de germinação bem como a média diária.

Para ambos os tipos de pimenta (cambuci e dedo-de-moça) foram inoculadas 25 sementes em cada frasco com seis repetições. Os frascos foram mantidos em presença de luz e a germinação das sementes foi avaliada, com exceção de sábados, domingos e feriados, durante um mês.



FIGURA 3. Frascos contendo água-ágar e as sementes de *Capsicum baccatum* dispostas para germinação.

#### 4.4 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Capsicum baccatum* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GA<sub>3</sub>

Buscando-se verificar a uniformidade da germinação de ambos os tipos de pimenta, realizou-se um ensaio utilizando diferentes concentrações de ácido giberélico. Neste ensaio foram testados três tratamentos diferentes: água-ágar 0,6% e água-ágar 0,6% contendo 1,88; 3,76 mg/L de GA<sub>3</sub> com seis repetições cada.

As sementes foram inoculadas nos frascos conforme descrito anteriormente (Figura 4).



FIGURA 4. Frascos contendo sementes de *Capsicum baccatum* no meio de cultura água-ágar 6% e GA<sub>3</sub>.

A germinação bem como características morfológicas das sementes foram monitoradas por 15 dias, após este período as partes das plântulas foram medidas com auxílio

de uma régua para avaliar os efeitos do GA<sub>3</sub> no crescimento das plantas (Figura 5). Esta medição foi feita utilizando três repetições de dez plantas aleatórias de cada tipo de sementes e tratamento.



FIGURA 5. Plântulas de *Capsicum baccatum* mensuradas medidas com auxílio de uma régua.

#### 4.5 INDUÇÃO DE CALOS de *C. baccatum*

Foram utilizados como explantes hipocótilos e cotilédones das plântulas com 15 dias. Eles foram retirados das plântulas em fluxo laminar com auxílio de um bisturi e uma pinça esterilizados em chama e transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultivo previamente autoclavado, MS com 3% de sacarose, 0,7% de ágar e pH 5.8.

Foram utilizados três tratamentos: 5 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIB; 5 mg/L de BAP e 0,2 mg/L de ANA e 2 mg/L de 2,4-D

A unidade experimental consistiu de uma placa de Petri contendo oito explantes com seis repetições para cada tipo de explante.

#### 4.6 CULTIVO DE ÁPICES CAULINARES

Os ápices caulinares foram retirados de plantas com 27 dias de cultivo em meio água-ágar 6% este procedimento foi feito em fluxo laminar com o auxílio de pinça e bisturi esterilizados em chama, estes ápices foram inoculados em dois diferentes meios de cultura com seis repetições:

- 1) Meio de cultivo MS com 3% de sacarose e 0,7% de ágar, suplementado com 4,5 mg/L de BAP e 0,1mg/L de AIB e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem,
- 2) Meio MS com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, 2g de carvão ativo, suplementado com 10mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AIB e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem

Posteriormente estes ensaios foram mantidos em estufa B.O.D no escuro sob uma temperatura de 28°C por dez dias, sendo avaliados diariamente quanto à presença de contaminação.

Após dez dias foi feito o repique dos ápices dos dois tratamentos anteriores para meio MS com 3% de sacarose, 0,7% de ágar enriquecido com 1,7 mg/L de AIA e 0,5mg/L de BAP para induzir a formação de raízes. Destes, três repetições de cada tratamento foram transferidas diretamente para a luz logo após o repique. Outras três repetições foram mantidas no escuro por uma semana para o processo de adaptação ao novo meio e depois transferido para a luz.

Após a formação de raízes deu-se início ao processo de aclimação que foi feito de maneira gradativa, uma vez que as plantas se encontravam em um microambiente com nível de umidade alto tanto do meio quanto do ar.

Foram retiradas as tampas dos frascos, coberto com papel filme onde foram feito furos para permitir a entrada gradual de ar. Estes frascos foram mantidos em presença de luz por três dias. Após este período, as plantas foram retiradas dos vidros, lavadas com água corrente para retirar o meio de cultivo e depois transferidas para vasos de plástico contendo substrato umedecido ascendentemente com água. Estes vasos plásticos foram colocados dentro de um saco plástico com uma pequena abertura para a entrada de ar por quatro dias, e após este período foram retiradas do saco plástico e expostas ao ambiente externo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPARAÇÃO DA GERMINAÇÃO DAS SEMENTES COMERCIAIS COM AS SEMENTES *IN NATURA*

A média da germinação diária das sementes durante 30 dias está ilustrada na Figura 6.

Após 30 dias de cultivo, a pimenta dedo-de-moça *in natura* foi a que apresentou maior percentual de germinação com 98%, a pimenta dedo-de-moça comercial apresentou um percentual de 77,32%, enquanto a cambuci *in natura* apresentou um percentual de germinação de 2,64% e a cambuci comercial 57,32%

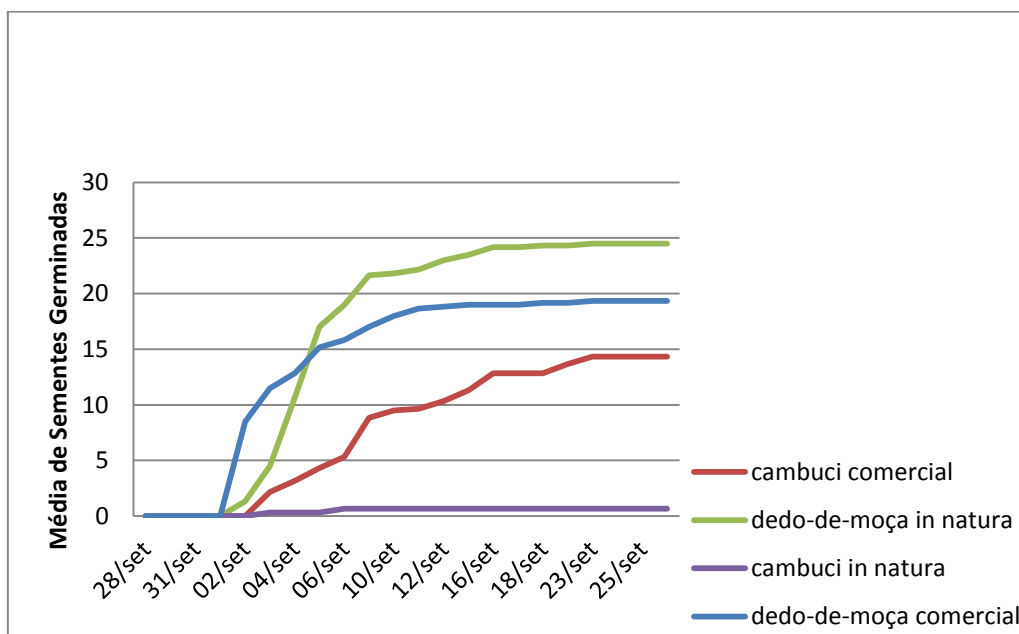


FIGURA 6. Comparação da média de germinação diária das sementes de pimenta Dedo-de-moça (*in natura* e comercial) e Cambuci (*in natura* e comercial).

A diferença de germinação dos dois tipos de pimenta pode ser explicado ou pelo alto nível de dormência das sementes do tipo cambuci (LIMA et al., 2012) Já baixo percentual de germinação da cambuci *in natura* se deve provavelmente ao excesso de umidade nas mesmas, uma vez que as sementes não passaram por nenhum processo de secagem antes da semeadura.

### 5.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *C. baccatum* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GA<sub>3</sub>

As sementes de pimenta dos tipos cambuci e dedo-de-moça, adquiridas comercialmente ou *in natura*, foram germinadas em água-ágar contendo diferentes

concentrações de ácido giberélico e após 15 dias de semeadura, foi avaliado o percentual de germinação e os dados obtidos constam na tabela abaixo.

TABELA 1. Percentual de germinação de sementes de cambuci e dedo-de-moça sob duas concentrações de ácido giberélico.

	Concentração de ácido giberélico		
	0	1,88 mg/L	3,76 mg/L
<b>Cambuci <i>in natura</i></b>	0	1,32%	0
<b>Cambuci Comercial</b>	22,64%	19,32%	19,32%
<b>Dedo-de-moça <i>in natura</i></b>	70,64%	90,64%	81,32%
<b>Dedo-de-moça Comercial</b>	85,32%	92%	90,64%

Observa-se que a pimenta Cambuci apresentou uma média de germinação inferior a pimenta Dedo-de-Moça, isso se deve ao fato que esta variedade apresentar uma dormência mais severa em suas sementes (LIMA et al., 2012;) e a utilização do ácido giberélico não foi suficiente para quebrar essa dormência, outro método que poderia ser utilizado para este processo seria a imersão em água quente (CARNEIRO et al., 2010). Outro fator que pode ter influenciado é a falta de um processo de secagem das sementes uma vez que foram inoculadas logo após terem sido retiradas dos frutos.

Analisando a velocidade de germinação, pode-se observar que a pimenta dedo-de-moça pode-se observar que utilizando 1,88 mg/L de ácido giberélico apresentou uma maior média de germinação em menor tempo, bem como uma uniformidade de germinação (Figura 7).

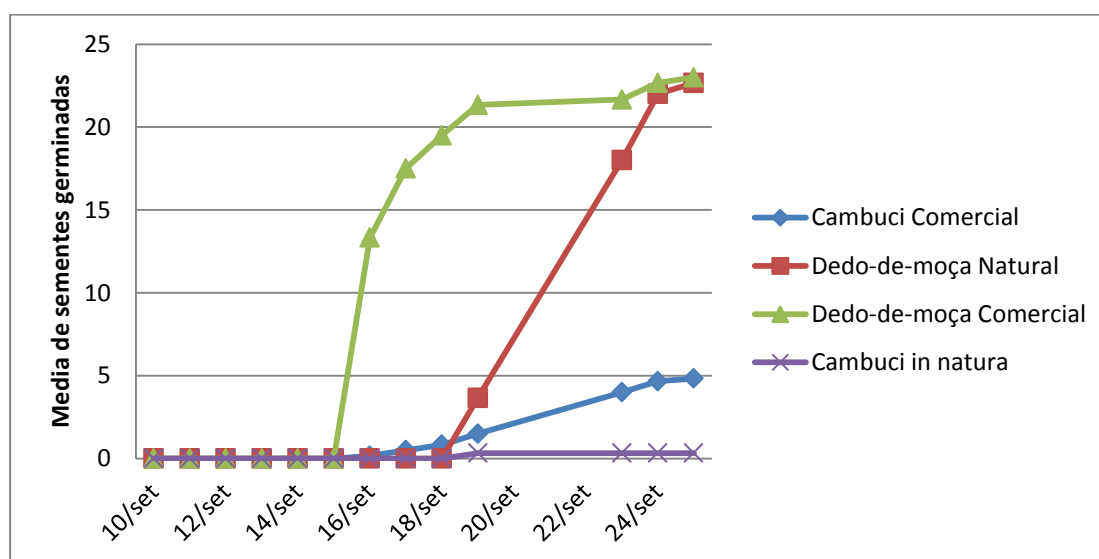


FIGURA 7. Germinação média de sementes de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* em água-água contendo 1,88 mg/L de GA<sub>3</sub>.

Pode-se perceber que o GA<sub>3</sub> também influencia no crescimento das plantas de pimenta (Figura 8). Na pimenta dedo-de-moça observou-se que o GA<sub>3</sub> promoveu maior crescimento da parte aérea (TORRES e BORGES, 2013) enquanto a ausência dele provocou maior crescimento de raiz. Percebe-se também que a concentração de 1,88 mg/L é a que tem mais influência neste processo.

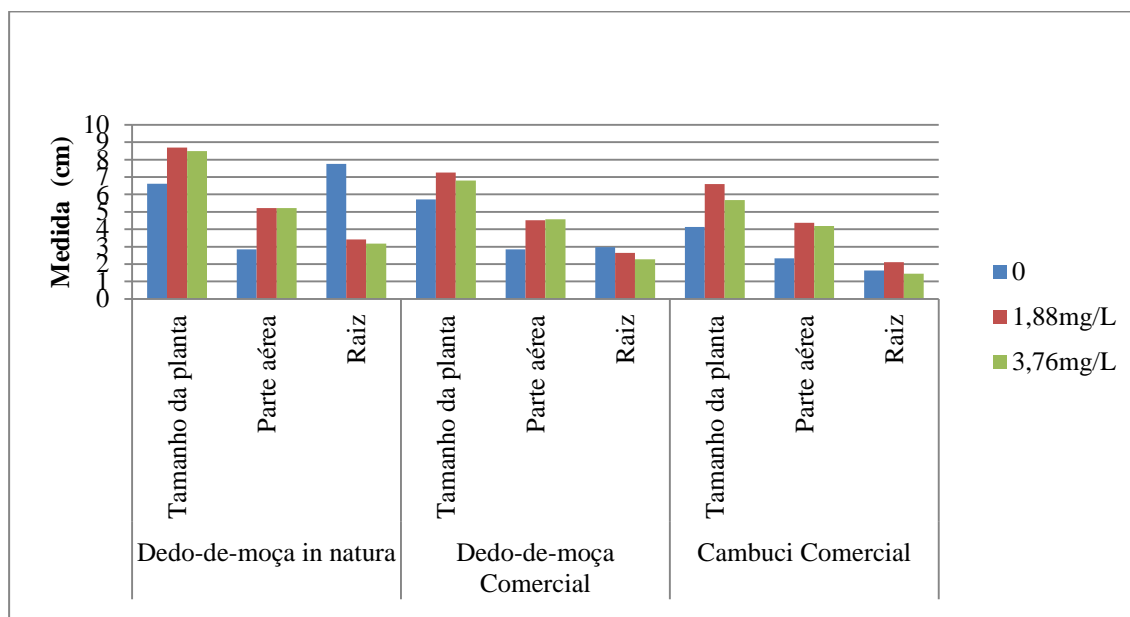


FIGURA 8. Influência da concentração de GA<sub>3</sub> no desenvolvimento das plantas de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

Para a pimenta cambuci não se observa a mesma variação de tamanho de parte aérea e raiz. Pode-se perceber que a concentração de 1,88 mg/L influenciou no crescimento das plantas tanto em parte aérea quanto em raiz.

### 5.3 INDUÇÃO DE CALOS

Um mês após a transferência, os explantes incubados em meio contendo 5 mg/L de BAP e 0,2 mg/L de ANA bem como os que continham 5 mg/L de BAP e 0,1 mg/L de AIB apresentaram formação de calos pequenos e oxidados tanto para os hipocótilos quanto para cotilédones o que comprova a dependência de genótipo uma vez que Silva, (2010) trabalhando com explantes de *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* obteve ótimos resultados quanto a formação de calos utilizando diferentes concentrações de ANA (Figura 9a e 9b).

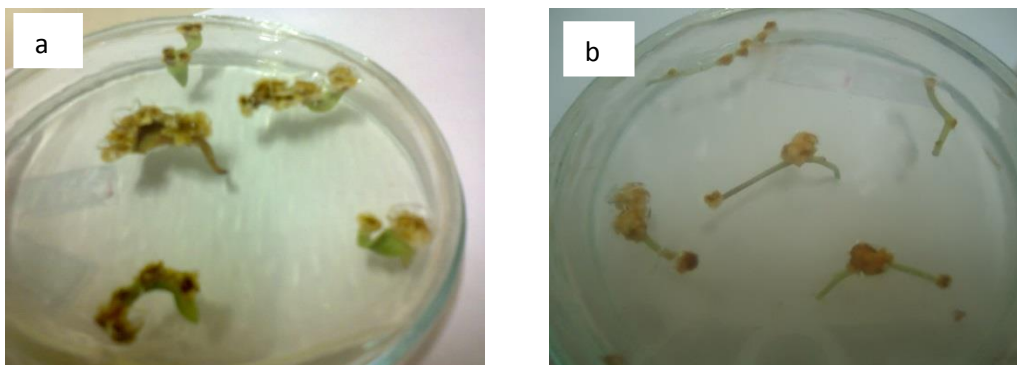


FIGURA 9. Calos induzidos a partir de (a) cotilédones e (b) hipocótilos com 5mg/ L de BAP e 0,2 mg/ L de ANA após 30 dias de cultivo.

Por outro lado, os cotilédones incubados com meio contendo 2 mg/ L de 2,4-D com 10 dias de cultivo já apresentavam calos bem formados e sem presença de oxidação (Figura 10a) e por isso, foram os melhores explantes. Ao contrário, os hipocótilos durante este mesmo período de cultivo não apresentaram a formação de calos(Figura 10b). Santana-Buzzy (2009) trabalhando com *Capsicum chinense* jacq. Observou uma melhor resposta trabalhando com hipocótilos.

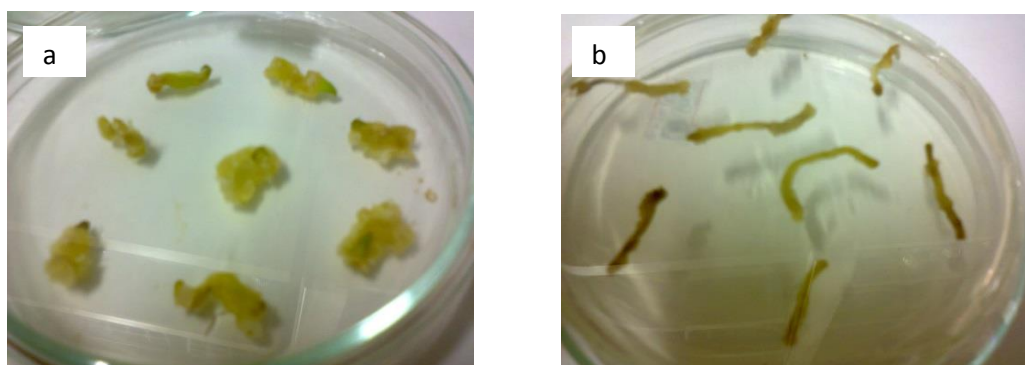


FIGURA 10. Calos induzidos a partir de (a) cotilédones e (b) hipocótilos com 2 mg/L de 2,4-D após 10 dias de cultivo.

#### 5.4 CULTIVO DE ÁPICES

Observou-se que durante o processo onde os ápices repicados para o meio de formação de raízes foram transferidos diretamente para a luz sofreram hiperhidricidade (Figura 11), isso pode ser consequência da falta do período de adaptação ao novo meio, pois os ápices que permaneceram no escuro durante o tempo de adaptação não sofreram este problema. Os ápices que apresentaram hiperhidricidade sucumbiram.





FIGURA 11. Ápices que apresentaram hiperhidricidade à esquerda.

Pode-se observar também que os ápices inoculados previamente em meio contendo carvão ativo apresentaram formação de raízes em maior quantidade e em menor tempo, 12 dias após a repicagem para o meio de formação de raízes enquanto os demais levaram em média de 15-20 dias (Figuras 12a e 12b). Costa et al. Em 2006 verificou também a influência do carvão ativo no desenvolvimento de raízes em cultivo in vitro de bananeira.

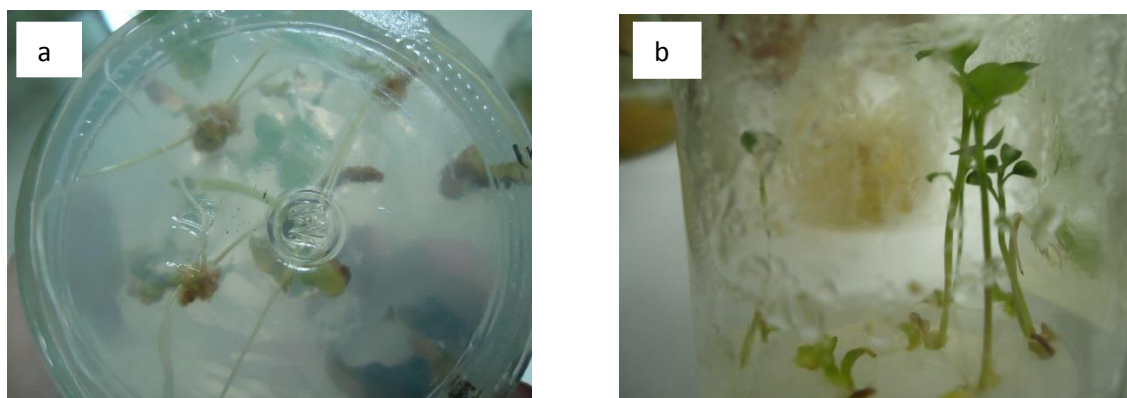


FIGURA 12. Plântulas regeneradas através de ápices de *C. baccatum* em meio pulse contendo carvão ativo. (a) Formação de raízes (b) Parte aérea.

No processo de aclimação obteve-se êxito com todos os ápices (Figura 13).



FIGURA 13. Plântulas antes de serem transferidos para ambiente externo

## 6 CONCLUSÕES

A germinação das sementes da pimenta dedo-de-moça *in natura* foi superior à germinação das sementes da dedo-de-moça comercial. Por outro lado a pimenta cambuci comercial apresentou um percentual de germinação superior ao da cambuci *in natura*. Este fato sugere que há a necessidade de um processo de secagem e de um método eficiente para a quebra da dormência.

A utilização do ácido giberélico nas concentrações testadas não foi eficiente para quebrar a dormência da pimenta cambuci, porém a concentração de 1,88mg/L promoveu uma maior velocidade na germinação da semente tipo dedo-de-moça comercial e apresentou um efeito de alongamento das plântulas de pimenta.

O melhor meio para indução de calos foi MS com 3% de sacarose enriquecido com 2 mg/L de 2,4-D. Os cotilédones foram os explantes que melhor responderam a indução.

No processo de cultivo *in vitro* dos ápices, observou-se que o melhor meio de cultivo foi o MS com 3% de sacarose e 2 g de carvão ativo, sendo enriquecido com 10 mg/L de BAP e 0,5 mg/L de AIB mantidos no escuro à 28°C. A formação de raízes utilizando MS com 3% de sacarose enriquecido com 0,5 mg/L de BAP e 1,7 mg/L de AIA se mostrou eficiente, porém é necessário um período de adaptação antes de serem transferidas para a luz.

A aclimação das plântulas originadas a partir dos ápices ocorreu com sucesso uma vez que não houve perda, confirmando a eficiência do processo.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; CHANDRA, N.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania). **Plant Cell Tissue Organ Cult** . n 16. p. 47-55. . 1989.
- ANDRADE, S. R. M. **Principio de cultura de tecidos vegetais**. Planaltina. Embrapa Cerrados 2002. 16p.
- ARROYO, R. REVILLA, M.A. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant Cell Rep**. n.10. p.414-416. 1991.]
- AROUS, S.; BOUSSAÏD, M.; MARRAKCHI, M. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chilli (*Capsicum annuum* L.). **J. Appl. Hort.**n.3, p. 17-22. 2001.
- ASCHRAFUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. M.; ISMAIL, M.R.; HAQUE, M. S.; SHARIDULLAH, S. M.; SHAHIN-UZ-ZAMAN. Regeneration potential of seedling explants od chilli (*Capsicum annuum*). **African Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 591-596. 2009.
- BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV imprensa Universitária, v. 3, p. 62-73. 1991.
- BATISTA, D. S.; **Influência de Trocas Gasosas do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenta ornamental (*Capsicum annuum* L.)**. 2012, Dissertação (Pós-graduação em fisiologia vegetal) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.
- BINZEL, M. L.; SANKHLA, N.; JOSHI, S. SANKHLA, D. Induction of direct embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Cell Rep**. n.15. p.287-293. 1996.
- BLAT, S. F. **Herança da reação de *Capsicum* spp. ao oídio (*Leveillula taurica* (lev.)arn.)**. Tese (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) Universidade de São Paulo. Piracicaba 2004.
- BUYUKALACA, S. MAVITUNA, F. Somatic embryogenesis and plant regeneration o f pepper in liquid media. **Plant Cell Tissue Organ Cult**.n.46. p.227-235. 1996.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa Produção de informação/Embrapa Hortaliças. Brasília DF p.87-132. 1998.
- CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In. FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação, do básico ao aplicado**, Porto Alegre, RS, Artmed. p.95-108. 2004
- CARNEIRO, G. G.; BARBOSA, J. A.; SILVA, E. O.; GOIS, G. C.; LUCENA, H. H.; ALVES, E. U. Germinação de pimentas cambuci submetidas à superação de dormência em água quente. **Biosci. J.** v. 26, n. 6, p. 882-885, 2010.

CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W. AIRES, P. S. R.; PIMENTEL, L. W. **Considerações gerais sobre organogênese**. Embrapa Algodão. Campina Grande, PB. 2006. 28 p.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. De B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2003. 49 p.

CARVALHO, S. I. C.; RIBEIRO, C. S. C.; HENZ, G. P. REIFSCHNEIDER, F. J. B. BRS Mari': nova cultivar de pimenta dedo-de-moça para processamento. **Hortic. Bras.** V. 27. n. 4 p. 571-573. 2009.

CHRISTOPHER, T.; RAJAM, M. V. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** n.46. p.245-250. 1996.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e n6-benzilaminopurina na Propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand naine (aaa). **Rev. Bras. Frutic.** v.28. n.2. p. 280-283. 2006.

EZURA, H.; NISHIMIYA, S.; KASUMI, M. Efficient regeneration of plant independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Cell Rep.** n. 12.p. 676-680. 1993.

GIACOMIN, L. L. **Estudos Taxonômicos e Filogenéticos em *Solanum Sect Gonatotrichum Bitter* (Solanoideae, Solanaceae) no Brasil**. 2010. 132 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Vegetal) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 2010.

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

HUSAIN, S.; JAIN, A.; KOTHARI, S.L. Phenilacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. **Plant Cell Rep.** n.19. p. 64-68. 1999.

HYDE, C.; PHILLIPS, G. C. Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration on chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. **In vitro Cell Dev. Biol. Plant.** n. 32. p. 72-80. 19996.

JOSHI, A.; KOTHARI, S. L. High copper levels in the medium improves differentiation and elongation from cultures cotyledons of *Capsicum annuum* L. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 88: 127-33. 2007

LIMA, M. L. S.; ALVES, E. U.; ARAÚJO, L. R.; ARAÚJO, F.S.; FILHA, M. D. S. L.; CAVALCANTI, M. I. P. **Efeito da pré-embebição sobre o crescimento inicial de plântulas de pimenta cambuci (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*)**. V Jornada Nacional da Agroindústria. Bananeiras, 2012

LINS. T. C. L.; LOURENÇO, R. T.; TAVARES, H. M. F; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; FERREIRA, M.; BUSO, G. S. C. Caracterização e análise da diversidade genética de acessos

de *Capsicum* utilizando marcadores moleculares. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS**, 1, 2001, Goiânia, *Anais...* Goiânia: SBMP. p. 1-3 , 2001.

LOPES, C. A.; RIBEIRO, C. S. C.; CRUZ, D. M. R.; FRANÇA, F. H.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENS, G. P.; SILVA, H. R.; PESSOA, H. S.; BIANCHETTI, L. B.; JUNQUEIRA, N. V.; MAKISHIMA, N.; FONTES, R. R.; CARVALHO, S. I. C.; MAROUELLI, W. A.; PEREIRA, W. **Pimenta (*Capsicum* spp.)**. Embrapa Hortaliças. Sistema de produção 2. Versão eletrônica, nov. 2007. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/botanica.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/botanica.html). Acesso em: 05 de out. 2013

MAPELI, A.M.; MOREIRA, M.A.; FINGER, F.L. Fisiologia e conservação pós-colheita das pimentas. In. RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.)**. Paraíba, Areia, P. 71-85. 2011.

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

MARGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop. Science**, v1, p. 176-177. 1962.

MASIEIRO, D. M.; AMARAL, M. N.; CASARIN, T.; GARCIA, C. S.; DODE, L. B. Organogênese em Hipocótilos de dois acessos de *Capsicum baccatum* L. In: **Salão Internacional de Pesquisa e Extensão**, 2012 , *Anais...*, v. 4 nº 2, 2012.

OCHOA-ALEJO, N.; IRETA-MORENO, L. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. **Sci. Hortic-Amsterdam** n.42.p.21-28. 1990.

PENALVA, L. A.; FIGUEIREDO, C. R. F.; ALMEIDA, C. V.; ALMEIDA, M. **Estabelecimento da cultura *in vitro* de pimenta cumari (*Capsicum baccatum* var. *praetermissum*)** 20º Simpósio de Iniciação Científica. USP, 2009.

PEREIRA, M. J. Z.; JUNIOR, N. S. M.; BUSSEL, A. A. B.; SALA, F. C.; COSTA, C. P. BOITEUX, L. S. Reação de acessos de *Capsicum* e de progênies de cruzamentos interespecíficos a isolados de *Colletotrichum acutatum*. **Hortic. Bras.** v.29 n.4 Brasília 2011.

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, 2008 48 p.

RAMIREZ-MALAGÓN, R.; OCHOA-ALEJO, N. Na improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. **Plant Cell Rep.** n.16. p.226-231. 1996.

RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; FARIAS, L. P.; BATISTA, D. S. Cultura de tecido de pimentas *Capsicum* spp. In. RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp)**. Paraíba, Areia, p. 165-204. 2011.

REIFSCHNEIDER, F.J.B (Org). **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA comunicação para transferência de tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças, 2000. 113p.

SANTANA-BUZZY, N.; LÓPES-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; BARREDO-POOL, F.; BALAN-UC, E.; AVILÉS-VIÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍM, D.; LECONA-GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J. J.; GOMES-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O. Ontogênese of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). Hort Science. n.44 p.113-118, 2009.

SILVA, T. L. Micropropagação, indução da calogênese e estratégias de conservação *ex situ* de *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C.DC. portécnicas de crescimento mínimo e temperaturas subzero ecriogênicas. Dissertação. Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas.2010. 153p.

SOUZA, S. A. M.; MARTINS, K. C. PEREIRA, T. N. S. Polimorfismo cromossômico em *Capsicum chinense* Jacq. Cienc. Rural v.41 n.10 Santa Maria, 2011.

TORRES, R. C.; BORGES, K. C. A. S. Ação da giberelina no crescimento de pimenta (*Capsicum frutescens*) **Cadernos UniFOA**. n. 1, 2013

VALADEZ-BUSTOS, M. G.; AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; CARRILHO-CASTAÑEDA, G.; AGUILAR-NRINCÓN, V. H.; ESPITIA-RANGEL, E.; MONTES-HERNÁNDES, S.; ROBLEDO-PAZ, A. *In vitro* propagation and agronomic performance of regenerated chilli pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. **In Vitro Cell. Dev. Biology-Plant** p. 650-658. 2009.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. Quebra de dormência em sementes. In. FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação, do básico ao aplicado**, Porto Alegre, RS, Artmed., p.135-146. 2004.