

INFLUÊNCIA DA IDADE E GENÓTIPO DA PLANTA DOADORA NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES EM ANTERAS DE PIMENTÃO (*CAPSICUM ANNUUM* L.)*

Effect of donor plant age and genotype on embryogenesis induction in sweet pepper anthers (Capsicum annuum L.)

JOSÉ MAGNO QUEIROZ LUZ**
JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO***
POLYANA APARECIDA DIAS EHLERT****
ESTÉR SOLANGE CERQUEIRA*****

RESUMO

Avaliou-se a influência da idade da planta doadora de pimentão na androgênese de anteras da cv. Agrônômico 8, da Linhagem 004 e do híbrido F₁ (PIX22C#31 × 004). As plantas doadoras foram cultivadas em casa de vegetação. Os botões florais foram coletados quando sépalos e pétalas tinham tamanhos iguais, correspondendo a anteras com micrósporos uninucleados. Foram desinfetados com álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos. As anteras foram retiradas e inoculadas em placas de Petri contendo o meio C (SIBI et al., 1979), suplementado com, em μM , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D. Logo após as placas foram colocadas a 35°C no escuro, por 8 dias, e após este período, a 26°C com 16 h de luz, até o 12º dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para o meio R (SIBI et al., 1979), suplementado com 0,5 μM de cinetina. As inoculações ocorreram semanalmente a partir da 6ª até a 12ª semana pós-transplante das plantas doadoras. A partir dos 30 dias após a inoculação verificou-se a presença de embriões, sendo a linhagem 004 a mais responsiva, seguida do híbrido F₁. Não houve diferença significativa para as semanas.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura de anteras, *Capsicum annuum* L.

SUMMARY

Three genotypes of sweet pepper, cv. Agrônômico 8, line 004, and the F₁ hybrid (PIX22C#31 × line 004), were tested for their ability to provide embryos through anther cultures according to the age of the donor plant. The donor plants were cultivated in greenhouse. Flower buds were collected when sepals and petals had the same size. This corresponds to the stage of uninucleate microspore. They were surface sterilized in 70% ethanol for 20 sec, then for 10 min in a 2% solution of NaClO, and rinsed 3 times in sterile distilled water. Separate anthers were inoculated in Petri dishes containing C medium (SIBI et al. 1979), supplemented with kinetin (0,05 μM) and 2,4-D (0,05 μM). They were incubated for 8 days at 35°C darkness, then at 26°C under 16 h daylength, until 12 days after the inoculation. At this time, the anthers were transferred to R medium (SIBI et al., 1979) supplemented only with kinetin (0,5 μM). Anther inoculation was carried out weekly from donor plants from the 6th to the 12th week after their transplantation. One month after the inoculation the efficiency of embryo induction was evaluated. The line 004 was the most responsive followed by the F₁ hybrid independently of the age of the plant.

KEY-WORDS: Anther culture, *Capsicum annuum* L.

* Parte da tese do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Lavras (UFLA) para obtenção do título de Doutor.

** Professor-Adjunto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

*** Professor Titular do Departamento de Agricultura da UFLA.

**** Engenheira-Agrônoma

***** Bióloga, aluna do Mestrado em Fisiologia Vegetal da UFLA.

INTRODUÇÃO

A resposta das anteras cultivadas *in vitro* é bastante dependente do genótipo da planta doadora, sendo a ação dos genótipos verificada quando os haplóides são formados em diferentes frequências. Não somente gênero e espécie, mas também as características parentais das sementes e do pólen devem ser consideradas na obtenção de haplóides. Em várias espécies verificou-se o efeito do genótipo na resposta para regeneração como em couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) na qual YANG *et al.*¹¹ verificaram entre outros fatores, forte efeito do genótipo. Em variedades comerciais, em um grupo de tetraplóides e também em dihaplóides de batata (*Solanum tuberosum* L.), ocorreu variação na resposta androgenética (TIAINEN¹⁰, CALLEBERG & JOHANSSON²).

No gênero *Capsicum* o primeiro sucesso em obtenção de plantas haplóides foi obtido por GEORGE & NARAYANASWAMY⁵, os quais trabalharam com *C. annuum* L. var. *grossum*. SIBI *et al.*⁸ cultivaram *in vitro* anteras de pimentão, sendo duas linhagens e seus híbridos recíprocos. As linhagens eram de alta taxa de haploidização por partenogênese e provavelmente por isto, houve pouca diferença entre as duas combinações quanto à resposta androgenética. No trabalho de DUMAS DE VAULX *et al.*³ os autores testaram o efeito do tratamento das anteras com elevada temperatura, não houve diferença entre estas mesmas linhagens e seu híbrido. O mesmo autor e colaboradores em outro trabalho verificaram diferença significativa entre vários híbridos testados, no que diz respeito à porcentagem do surgimento de plantas 2n, principalmente em anteras inoculadas a 35°C por 8 dias (DUMAS DE VAULX *et al.*⁴). Por outro lado, híbridos comerciais de pimentão quando testados sobre os efeitos da temperatura, fotoperíodo e idade da planta doadora, não interagiram significativamente com estes tratamentos, mas houve diferentes respostas de acordo com os genótipos (KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷). Esta última consideração também foi observada por NERVO *et al.*⁸ trabalhando com 12 híbridos experimentais.

A capacidade androgenética de uma planta também é influenciada pelo estado fisiológico desta durante o seu cultivo e no momento da retirada de suas

anteras. As variações ambientais também exercem uma grande influência, possivelmente afetando o estado endógeno da planta doadora. Geralmente, flores de plantas mais jovens e no início da estação de florescimento, produzem mais grãos de pólen embriogênicos do que flores mais velhas e no final do ciclo da planta (BAJAJ¹).

Com relação ao pimentão, segundo KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷ houve formação de embriões a partir de anteras de plantas cultivadas numa faixa de 18 a 27°C, sendo a máxima resposta a 26°C mas, no entanto, na faixa de 20 a 24°C, normalmente predominante em casas de vegetação, houve boa resposta à formação de embriões. Já o fotoperíodo testado na faixa de 11 a 19 h de luz, não influenciou. A idade da planta doadora teve influência, sendo a formação de embriões, inversamente proporcional à idade da planta, com melhores respostas entre 6 a 11 semanas após o transplântio do pimentão.

Estudos esclarecem que dentre as razões do insucesso na cultura de anteras, estão o fato de que muitos pesquisadores se restringem a apenas uma cultivar, sendo recomendada a utilização de várias cultivares, quando não se dispõe de suficiente informação para a espécie trabalhada; em conseqüência, maximiza-se a eficiência do processo, podendo-se escolher então os materiais mais responsivos, e o fato de nem sempre se conhecer perfeitamente a fisiologia da planta doadora, o que deve ser buscado no sentido de se otimizar a técnica.

O presente trabalho teve como objetivos verificar o comportamento de diferentes genótipos brasileiros de pimentão e a influência da idade da planta doadora no cultivo *in vitro* de anteras desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento foram utilizados: a cultivar comercial Agrônômico 8, a Linhagem 004 e o híbrido F₁ (PIX 22C#31 x Linhagem 004). Sementes dos três genótipos foram germinadas em bandejas de 128 células, com substrato comercial, e mantidas em casa de vegetação à temperatura mínima de 25°C, fotoperíodo de aproximadamente 12 horas e irrigação diária. Após 4 a 5 semanas foi feito o transplântio para vasos com capacidade para 6 litros de substrato previamente preparado. Esta data foi considerada

como início do experimento, sendo as plantas mantidas em casa de vegetação.

Os botões florais foram coletados quando o tamanho das pétalas era aproximadamente igual ao das sépalas. Foram desinfetados com álcool 70% por 20 segundos e hipoclorito de Na (2%) por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar foram lavados 3 vezes com água destilada e autoclavada a 120°C e 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. Sob luz de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, as anteras foram extraídas dos botões que foram cortados com uma incisão em um dos seus lados. Posteriormente removeram-se os estames com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados. Reuniram-se os estames numa placa de petri esterilizada e destes foram retirados os filamentos, tomando-se o cuidado de não ferir as anteras. As anteras danificadas foram descartadas.

Logo em seguida as anteras foram inoculadas em placas de Petri de poliestireno, 90 mm de diâmetro, contendo 25 ml de meio previamente esterilizado em autoclave, sendo anteras de 4 botões por placa, perfazendo um total de 20 a 24 anteras por placa. Utilizou-se o meio C, de SIBI *et al.*⁹ (TABELA 1), suplementado, em μM , 0,05 de cinetina + 0,05 de 2,4-D e com pH ajustado para 5,9. Logo após as placas foram seladas com filme plástico e colocadas em estufa incubadora tipo BOD, marca FANEM à 35°C, no escuro por 8 dias, e após este período foram mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e aproximadamente 1500 lux de luminosidade, até o 12º dia após a inoculação. Ao final dos 12 dias, as anteras foram transferidas para placas de Petri contendo 25 ml de meio R (SIBI *et al.*⁹), (TABELA 1) suplementado com 0,5 μM de cinetina.

As inoculações ocorreram semanalmente a partir da 6ª até a 12ª semana pós-transplante das plantas doadoras. A partir da 13ª semana as plantas apresentavam senescência e poucos botões florais.

A partir dos 30 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de anteras com presença de embriões adventícios e o número de embriões por 100 anteras. Esta avaliação foi feita com auxílio de um microscópio estereoscópio a uma magnitude de 80 vezes.

TABELA 1
COMPOSIÇÃO DOS MEIOS C E R (SIBI, DUMAS DE VAULX E CHAM BONNET, 1979).

	Meio C	Meio R
Macronutrientes (mg/L):		
KNO ₃	2150	2150
NH ₄ NO ₃	1238	1238
MgSO ₄ .7H ₂ O	412	412
CaCl ₂ .2H ₂ O	313	313
KH ₂ PO ₄	142	142
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	50	50
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	38	38
(NH ₄) ₂ SO ₄	34	34
KCl	7	
Micronutrientes (mg/L):		
MnSO ₄ .H ₂ O	22,130	20,130
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,625	3,225
H ₃ BO ₃	3,150	1,550
KI	0,330	0,695
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,188	0,138
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,016	0,011
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,016	0,011
Vitaminas e aminoácidos(mg/L)		
mio-inositol	50,300	50,300
piridoxina(HCl)	5,500	5,500
ácido nicotínico	0,700	0,700
tiamina (HCl)	0,600	0,600
pantotenato de Cálcio	0,500	0,500
vitamina B12	0,030	
biotina	0,005	0,005
glicina	0,100	0,100
Quelatos de Fe(mg/L)		
Na ₂ E.D.T.A.	18,65	18,65
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13,90	13,90
sacarose	30	30
agar	8	8
pH	5,9	5,9

TABELA 2

PERCENTAGEM DE ANTERAS COM EMBRIÕES DE ACORDO COM A IDADE DA PLANTA E O GENÓTIPO DE PIMENTÃO

IDADE PL. DOADORA (SEMANAS)	GENÓTIPOS									TOTAL		
	AG08			LINHA004			HÍBRIDO			A	A/E	%
	A	A/E	%	A	A/E	%	A	A/E	%			
6	140	6	4,3	102	42	41,6	96	27	28,1	338	75	22,2a
7	90	8	8,9	93	38	40,9	85	26	30,6	268	72	26,9a
8	110	20	18,2	118	45	38,1	86	22	25,6	314	87	27,7a
9	112	14	12,5	104	40	38,5	115	42	36,5	331	96	29,0a
10	117	18	15,4	117	49	41,2	126	40	31,7	360	107	29,7a
11	101	12	11,9	124	50	40,3	93	31	33,3	318	93	29,2a
12	83	11	13,3	80	32	39,8	118	40	33,9	281	83	29,5a
TOTAL	753	89	11,8	738	296	40,1	719	228	31,7	2210	613	27,7
Intervalo de Confiança	(10,7-15,9)			(36,6-43,6)			(28,3-35,1)					

Proporções seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste 't' ($p < 0,05$)

A = Número de anteras inoculadas

E = Número de anteras com embriões

% = Percentagem de anteras com embriões

() = Intervalo de confiança da % (nível de 0,05).

TABELA 3

NÚMERO DE EMBRIÕES POR 100 ANTERAS DE ACORDO COM A IDADE DA PLANTA E O GENÓTIPO DE PIMENTÃO

IDADE PL. DOADORA (SEMANAS)	GENÓTIPOS									TOTAL		
	AG08			LINHA004			HÍBRIDO			A	E	%
	A	E	%	A	E	%	A	E	%			
6	140	39	27,9	102	172	168,6	96	101	105,2	338	312	92,3a
7	90	21	23,3	93	150	161,3	85	81	95,3	268	252	94,0a
8	110	51	46,4	118	172	145,8	86	69	80,2	314	292	92,9a
9	112	38	33,9	104	166	159,6	115	110	95,7	331	314	94,9a
10	117	28	23,9	117	196	167,5	126	115	91,3	360	339	94,2a
11	101	29	28,7	124	185	149,2	93	91	92,8	318	305	95,9a
12	83	18	21,7	80	133	166,3	118	114	96,6	281	265	94,3a
TOTAL	753	224	29,7	738	1174	159,1	719	681	94,7	2210	2079	94,1
Intervalo de Confiança	(26,4 - 33,0)			(132,7 - 185,5)			(93,1 - 96,3)					

Proporções seguidas de mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste 't' ($p < 0,05$)

A = Número de anteras inoculadas

E = Número de embriões.

% = Percentagem de embriões

() = Intervalo de confiança da % (nível de 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na TABELA 2 observa-se a percentagem de anteras com embriões nos três genótipos e nas diferentes semanas de idade das plantas doadoras. Houve diferença para os genótipos, sendo a linha 004 a mais responsiva, com 40,1%, seguida do híbrido F₁ e da cultivar Agrônômico 8 com 31,7 e 11,8%, respectivamente. Mas mesmo este último valor foi superior ao encontrado por SIBI et al.⁹, que alcançaram no máximo 8,4% de anteras com embriões. Para o número de embriões por 100 anteras (Tabela 4), também ocorreu diferença entre genótipos, tendo a linha 004, o híbrido e o Agrônômico 8, 159,1, 96,7 e 26,3 embriões por 100 anteras, sendo também estes valores, de maneira geral, superiores ao trabalho citado e ao encontrado por KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷; no entanto, NERVO et al.⁸ encontraram até 552 embriões por 100 anteras no genótipo PM687 x Yolo Wonder, sendo inclusive usado como testemunha por ser um genótipo altamente responsivo.

As diferentes respostas entre genótipos de pimentão também ocorreram nos trabalhos de DUMAS DE VAULX et al.⁶ que verificaram diferença significativa entre vários híbridos testados, no que diz respeito a percentagem do surgimento de plantas 2n; KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷ e NERVO et al.⁸ que trabalharam com 12 híbridos experimentais.

Considerando dados dos genótipos em conjunto, não houve diferença da idade da planta doadora, seja para a percentagem de anteras com embriões, seja para o número de embriões por 100 anteras, o que concorda com o observado no trabalho de KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷ no qual a idade da planta doadora teve influência, sendo a formação de embriões, inversamente proporcional a idade da planta, com melhores respostas entre 6 a 11 semanas após o transplantio do pimentão. De maneira geral plantas mais jovens e no início da estação de florescimento, produzem mais grãos de pólen embriogênicos do que flores mais velhas e no final do ciclo da planta (BAJAJ¹).

No entanto, dentro de cada genótipo houve diferença de acordo com a semana de inoculação, principalmente para o Agrônômico 8, no qual as duas primeiras semanas foram as de menores percentagens de anteras com embriões (Tabela 3). Para o número de embriões por 100 anteras também

ocorreram diferenças entre as semanas, de maneira diferenciada para cada genótipo (Tabela 4), caracterizando novamente o efeito do genótipo para as variáveis avaliadas.

Verificou-se a presença de embriões na forma globular, após a transferência para o meio R, mas apesar das boas taxas de indução e os consideráveis números de embriões encontrados, não foi observado o amadurecimento desses embriões em regeneração em plântulas, em nenhum dos genótipos. Isto deve estar relacionado a algum fator nutricional que tornou o meio R ineficiente na regeneração dos embriões dos genótipos estudados, ao contrário que ocorreu em trabalhos com outros genótipos (DUMAS DE VAULX et al.⁶; KRISTIANSEN & ANDERSEN⁷; NERVO et al.⁸).

CONCLUSÕES

A indução de embriões ocorreu diferentemente entre os genótipos, sendo a linha 004 a mais responsiva, seguida do híbrido; mas com relação a idade da planta doadora, considerando os dados dos genótipos em conjunto, não houve diferença para o período entre a 6ª e 12ª semana pós-transplantio das plantas doadoras, mas ocorreram variações dentro de cada genótipo de acordo com a semana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJAJ, Y.P.S. In vitro production of haploides. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds). *Handbook of plant cell culture; Techniques for propagation and breeding*. New York: Macmillan, 1984. v. 1, p. 228-287.
- CALLEBERG, E.K.; JOHANSSON, L.B. The effect of starch and incubation temperature on anther culture of potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 32, p. 27-34, 1993.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. e SIBI, M. Stimulation of "in vitro" androgenesis in Pepper (*Capsicum annuum* L.) by elevated temperature treatments. C.R.N.S.F. - C.N.R.A. Meeting, Orsay, Juillet 1981, Dr. Earle (Ed.), (Souspresse).
- DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., POCHARD, E. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes

- par des traitements à + 35°C. *Agronomie, Versailles*, v. 1, n. 10, p. 859-864, 1981.
- GEORGE, L.; NARAYANASWAMY, S.; Haploid *Capsicum* through Experimental Androgenesis. *Protoplasma*, New York, v. 78, p. 467-470, 1973.
- KING, P.; SHIMAMOTO, K. Cereais-Maize. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (eds.). *Hand-book of plant cell culture: techniques for propagation and breeding*. New York: Macmillan, 1984. v. 2, p. 70-91.
- KRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, S. B. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, Wageningen, n. 67, p. 105-109, 1993.
- NERVO, G.; CARANNANTE, G.; AZZIMONTI, M.T.; ROTINO, G.L. Use of anther culture method in pepper breeding: factors affecting plantlets production. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1994. Firenze. *Anais...* Firenze: Iaptc, 1994. v. 8, p. 92.
- SIBI, M.; DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le Piment (*Capsicum annuum* L.). *Annales de l'Amélioration des Plantes*, Paris, v. 29, n. 5, p. 583-606, 1979.
- TIAINEN, T. The influence of culture conditions on anther culture response of commercial varieties of *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 30, p. 211-219, 1992.
- YANG, O.; CHAUVIN, J. E.; HERVE, Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 28, p. 229-296, 1992.