

## Ação do etileno em combinação com thidiazuron, nitrato de prata e ácido acetilsalicílico na cultura de anteras de pimentão.

José Magno Q. Luz<sup>1</sup>; José Eduardo B. P. Pinto<sup>2</sup>; Polyana Aparecida D. Ehlert<sup>2</sup>; Estér Solange Cerqueira<sup>2</sup>; Ivan Bedin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UFU – Dep<sup>la</sup>. Agronomia, Campus Umuarama, C. Postal: 593, , 38.400-902 Uberlândia - MG; <sup>2</sup>UFLA – Dep<sup>la</sup>. Agricultura, C. Postal :37, 37.200-000 Lavras – MG.

### RESUMO

Verificou-se o efeito do etileno em combinação com o thidiazuron (TDZ), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) e ácido acetilsalicílico (AAS), na indução e regeneração de embriões em anteras de pimentão, genótipos  $F_1$  (PIX21C12#35 x Agronômico 08), (PIX21C04#4 x Linha 004), (PIX22C#31 x Linha 004), (PIX21C15#45 x Ikeda) e (PIX22C#21 x Ikeda). Os botões foram coletados quando sépalas e pétalas tinham tamanhos aproximadamente iguais, correspondendo ao estágio de anteras com micrósporos uninucleados. As anteras foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura C adicionado de 4,5 mM de TDZ; meio C acrescido de 0,05 mM de 2,4-D, 0,05 mM de cinetina e 88,8 mM de AAS; meio C acrescido de 0,05 mM de 2,4-D, 0,05 mM de cinetina e 5,0 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ . Em seguida, foram colocadas em ambiente escuro a 35°C durante oito dias e enriquecido com ethephon, por 0; 2; 4; 6 ou 8 dias num esquema fatorial com quatro repetições, sendo cada placa considerada uma parcela contendo 20 a 24 anteras. O período de permanência de quatro dias, em ambiente enriquecido com ethephon, e os meios com TDZ e  $\text{AgNO}_3$ , foram os mais favoráveis à indução de anteras. O TDZ também promoveu maior indução de calos embriogênicos. As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS. Só ocorreu regeneração direta em plântulas no meio C acrescido de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , sendo oito dias o melhor período. Os genótipos mais responsivos foram PIX22C#31 x linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda. Observou-se a formação de plântulas haplóides e diplóides mediante análise da ponta de raiz. Considerando-se que a regeneração foi direta, sem passar por calos, supõe-se que as plântulas diplóides obtidas sejam provenientes dos micrósporos, devendo portanto ter ocorrido uma diploidização *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Capsicum annuum* L., melhoramento, biotecnologia, cultura de tecidos.

### ABSTRACT

**Ethylene action in combination with Thidiazuron (TDZ), silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) and acetylsalicylic acid on sweet pepper anther culture.**

The influence of ethylene used in combination with Thidiazuron (TDZ), silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) and acetylsalicylic acid (ASA) was evaluated on sweet pepper androgenesis of  $F_1$  genotypes (PIX21C12#35 x Agronômico 08, PIX21C04#4 x Line 004, PIX22C#31 x Line 004, PIX21C15#45 x Ikeda and PIX22C#21 x Ikeda). Floral buds were collected when sepals and petals were approximately of equal size, corresponding to the uninucleated stage of microspores. Anthers were placed in Petri dishes containing three mediums: C medium supplemented with TDZ (4.5mM); C medium plus 2,4-D (0,05mM), Kinetin (0.5mM) and ASA (88,8mM) or  $\text{AgNO}_3$  (5.0 mg/L). After inoculation, the anthers were kept in the environment with ethephon for 0, 2, 4, 6 or 8 days at 35°C for eight days in the dark. The experiment was conducted in a factorial design with four replications. Each replicate consisted of one Petri dish containing 20-24 anthers. TDZ and  $\text{AgNO}_3$  were most effective for inducing somatic embryos after four days with Ethrel. The greatest rates of necrosis took place on the medium with AAS. Direct regeneration of plantlets occurred only on medium supplemented with 5 mg/L of  $\text{AgNO}_3$  after an eight-day treatment with Ethrel. The most responsive genotypes were PIX22C#31 x Line 004 and PIX22C#21 x Ikeda. Chromosome number of the seedlings was verified through the root tip analysis which indicated the presence of haploid and diploid chromosome number. Since regeneration was direct, ie without going through callus phase, it is hypothesized that the diploid seedlings came from *in vitro* diploidization.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L., breeding, biotechnology, tissue culture.

(Aceito para publicação em 14 de setembro de 1999)

Na área de estudos sobre o cultivo *in vitro* de vegetais, uma das linhas de pesquisa mais explorada atualmente é a composição e a influência de gases nos recipientes de cultivo, bem como a adição de componentes que influenciam na formação e ação destes gases. Sabe-se que estes gases afetam diretamente a resposta do explante, principalmente no que diz respeito à embriogênese. Entre eles, o etileno é o principal gás envolvido, ocasionando diferentes influências conforme a espécie (Auboiron *et al.*, Adkins *et al.*, 1993, 1990; Nissen, 1994).

Diversos trabalhos mostraram o efeito do etileno sobre as plantas doadoras (Argarwal & Bhojwani, 1993), o seu efeito e dos seus antagonistas adicionados ao meio de cultura, bem como a relação destes com outros componentes do meio, principalmente auxinas. Uma vez que seu efeito geralmente é negativo na embriogênese, são utilizadas em baixas concentrações ou omitidas na fase de regeneração dos calos devido à maior biossíntese de etileno (Ockendon & McClenaghan, 1993; Evans & Batty, 1994). O tratamento inicial de anteras com altas temperaturas é essencial para a embriogênese, pois afeta a ação de compostos adicionados, além de influenciar a biossíntese de etileno (Biddington & Robinson, 1991).

Em pimentão, verificou-se que a presença de 5 mg/L de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) no meio de indução C (Sibi *et al.*, 1979) teve efeito favorável na androgênese, provavelmente devido ao fato do  $\text{AgNO}_3$  bloquear a ação inibitória do etileno endógeno dos embriões, permitindo assim o maior desenvolvimento dos mesmos (Nervo *et al.*, 1994). Em suspensão de células de cenoura, tanto o ácido salicílico (AS) quanto o ácido acetilsalicílico (AAS), em forma de aspirina, estimularam a embriogênese, numa faixa de concentração de 10 à 100  $\mu\text{M}$ , e não causaram qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células (Herman, 1991).

Devido à interação de diversas substâncias com a produção ou inibição *in vitro* do etileno, sabe-se que para várias espécies estudadas em técnicas de cultura de tecidos, os resultados devem ser interpretados com cuidado, principalmente no que diz respeito ao real papel do etileno no

controle da embriogênese. O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito das combinações de ethephon com o thidiazuron (TDZ), o  $\text{AgNO}_3$  e o AAS na indução e regeneração de embriões em anteras de pimentão.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os genótipos utilizados foram os híbridos  $F_1$  (PIX21C12#35 x Agrônomico 8), (PIX21C04#04 x Linha 004), (PIX22C#31 x Linha 004), (PIX21C15#45 x Ikeda) e (PIX22C#21 x Ikeda) sendo PIX21C12#35, PIX21C04#04 e PIX21C15#45 resistentes aos nematóides das galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Peixoto, 1995).

As plantas doadoras dos botões florais foram cultivadas em casa de vegetação sob condições controladas e temperatura média de 27°C. Os botões florais foram coletados no estágio de pétalas e sépalas de mesmo tamanho, correspondendo a anteras contendo micrósporos uninucleados. Foram desinfestados com álcool a 70% por 20 segundos e hipoclorito de sódio a 2%, por 10 minutos e, em fluxo laminar, foram lavados 3 vezes com água destilada e autoclavada. As anteras foram retiradas com o auxílio de um microscópio estereoscópio em aumento de 40 vezes, descartando-se as danificadas.

As anteras foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura C (Sibi *et al.*, 1979) adicionado de 4,5 mM de TDZ; meio C acrescido de 0,05 mM de 2,4-D, 0,05 mM de cinetina e 88,8 mM de AAS; meio C acrescido de 0,05 mM de 2,4-D, 0,05 mM de cinetina e 5,0 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ . Após a inoculação, as placas, somente tampadas e não lacradas, foram colocadas em um recipiente com volume de dois litros e capacidade para doze placas empilhadas. Neste mesmo recipiente foi colocado um becker contendo 10 ml do produto comercial ETHRELÂ (Ethephon = ácido 2-cloro etilfosfônico - 240g/L), como fonte de etileno. O pH foi ajustado em 4 (em solução aquosa com pH abaixo de 4, o ethephon é estável, ao passo que é quebrado liberando etileno, em valores de pH acima de 4). Posteriormente o recipiente foi hermeticamente fechado

e colocado em BOD a 35°C, no escuro por 0, 2, 4, 6 e 8 dias, totalizando quinze tratamentos para cada genótipo. Após estes períodos, as placas foram retiradas do recipiente, vedadas com filme plástico e recolocadas na BOD até completarem oito dias. Posteriormente, foram colocadas em sala de crescimento a 26°C com 16 h de luz, onde permaneceram até o 12º dia após a inoculação. A seguir, as anteras foram transferidas para o meio R (Sibi *et al.*, 1979), suplementado com 0,5 mM de cinetina.

O delineamento utilizado foi um split-plot com parcelas divididas no tempo de permanência com o ETHRELÂ, com 4 repetições, sendo cada placa de Petri uma parcela contendo anteras de 4 botões, totalizando de 20 a 24 anteras por placa. Trinta dias após a inoculação no meio C, avaliou-se a porcentagem de anteras que continham embriões, o número de embriões por 100 anteras inoculadas, a porcentagem de calos embriogênicos e de anteras necrosadas e o número de plantas regeneradas. Os embriões foram retirados das anteras e transferidos para placa de Petri contendo meio R adicionado de 9,3 mM de cinetina. Os dados foram submetidos quanto à normalidade e homogeneidade através dos testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente e para todas as características foram realizadas análises de variância e teste de média.

As plântulas obtidas nas placas foram transferidas para tubos de ensaio (150 x 25mm) contendo 20 ml de meio R, sem a presença de regulador de crescimento. As primeiras plântulas obtidas tiveram suas pontas de raízes retiradas para contagem cromossômica. Após alcançarem, *in vitro*, tamanho pouco maior que 3 cm, as plantas regeneradas foram aclimatadas em casa de vegetação com temperatura média de 27°C e sob sombrite 50%. As plantas periodicamente eram irrigadas com solução nutritiva até o transplantio definitivo em vasos com solo e adubo químico.

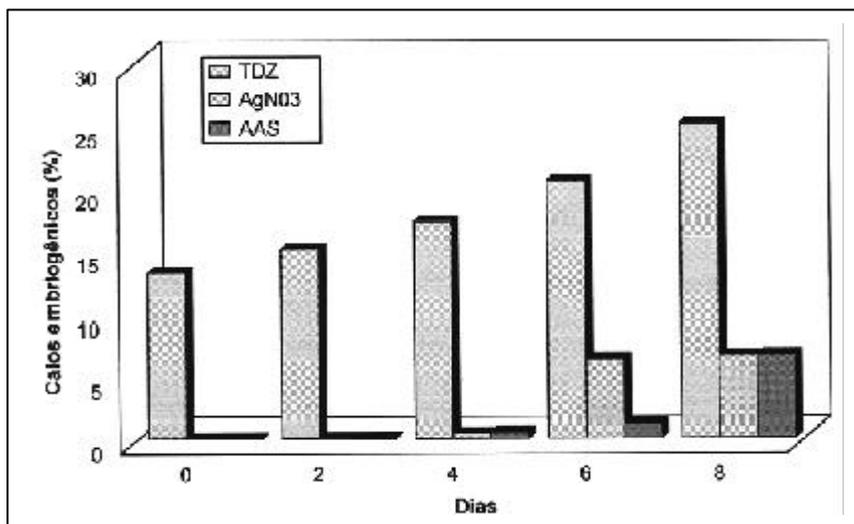
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de anteras com embriões e o número de embriões por 100 anteras foram influenciados, significativamente, pelos tratamentos

**Tabela 1.** Porcentagem de anteras com embriões, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ethephon, considerando dados dos genótipos em conjunto. Lavras (MG), UFLA, 1996<sup>1</sup>.

Meios de Indução	Tempo em exposição ao ethephon (dias)				
	0	2	4	6	8
TDZ	23,0 Ab	38,8 Aa	30,3 Aab	22,0 Ab	21,6 Ab
AgNO <sub>3</sub>	14,6 ABb	33,7 Aa	25,4 Aab	15,0 ABb	24,6 Ab
AAS	11,9 Bb	10,9 Bb	23,9 Aa	16,9 Bb	17,6 Ab

1 - As médias seguidas de mesma letra (Maiúsculas para meios e minúsculas para o tempo com ethephon) não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).



**Figura 1.** Porcentagem de calos embriogênicos em função de diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ethephon, considerando dados dos genótipos em conjunto. Lavras (MG), UFLA, 1996.

com diferentes componentes (TDZ, AgNO<sub>3</sub> e AAS) e pelo tempo de permanência das anteras nestes meios junto com ethephon. No entanto, só houve interação entre o tempo e o meio para a primeira característica. Não ocorreu efeito significativo dos genótipos para as características avaliadas, o que pode estar relacionado com a exposição dos meios ao ethephon, que aproximou as respostas dos diferentes genótipos. Em alguns experimentos com cultura de anteras de pimentão também não ocorreram diferenças entre genótipos (Sibi *et al.*, 1979; Dumas de Vaulx *et al.*, 1981).

Com relação à porcentagem de anteras com embriões, na interação entre a composição do meio de cultura e o tempo de exposição ao ethephon (Tabela 1), verificou-se que, de maneira geral, o tempo de quatro dias foi o mais favorável para o meio contendo AAS, enquanto para os meios com TDZ

ou AgNO<sub>3</sub>, o melhor tempo foi o de dois dias. As maiores induções de anteras com embriões ocorreram nos meios com TDZ e AgNO<sub>3</sub>; o AAS apresentou as menores porcentagens de anteras com embriões. O fato dos períodos de dois e quatro dias terem sido os melhores na indução da embriogênese, de certa forma, concorda com o verificado por Nissen (1994) que, trabalhando com suspensão de células de cenoura, verificou que altas concentrações do ethephon foram prejudiciais à embriogênese. No presente experimento empregando recipiente hermeticamente fechado, os maiores tempos de exposição (6 e 8 dias) das anteras ao ethephon, tendenciaram ao aumento da concentração de etileno no ambiente que continha as anteras e conseqüentemente levaram a menores porcentagens de anteras com embriões.

O TDZ também induziu maior produção de calos, que foi crescente com a

maior exposição das anteras ao ethephon, variando de 13,1 a 25,1%, em zero e oito dias de exposição, respectivamente (Figura 1). Este efeito pode estar relacionado ao aumento da atividade citocinínica do TDZ pela presença do etileno. Por outro lado, o TDZ pode levar à produção de etileno, pois isto é característico das citocininas, portanto mais etileno estaria sendo produzido, e maior estímulo à ação do TDZ estaria ocorrendo, levando à formação dos calos (Mok & Mok, 1985). O aumento do período de exposição ao ethephon, resultou em maior porcentagem de anteras necrosadas no meio TDZ, o que reforça a consideração anterior. A respiração e a atividade mitótica, durante o desenvolvimento dos calos, resulta em liberação de etileno, levando à degeneração que também gera etileno que, somado ao liberado no recipiente pelo ethephon, teria aumentado a taxa de necrose das anteras, o que concorda com Auboiron *et al.* (1990).

As maiores taxas de necrose ocorreram no meio com AAS e também foram crescentes com o incremento do período em ethephon, principalmente por seis e oito dias (Figura 2). Pode-se inferir que o AAS na concentração de 88,9 mM, não foi suficiente para inibir o efeito do etileno, aumentando a necrose à medida em que aumentou o tempo de exposição ao ethephon. Por outro lado, Herman (1991), verificou que tanto o AS, quanto o AAS, em forma de aspirina, estimularam a embriogênese em suspensão de células de cenoura numa faixa de 10 a 100 mM, sem qualquer prejuízo no crescimento e sobrevivência das células, e ainda, houve uma direta relação entre a concentração de AS e AAS e o estímulo à embriogênese, com a inibição do etileno.

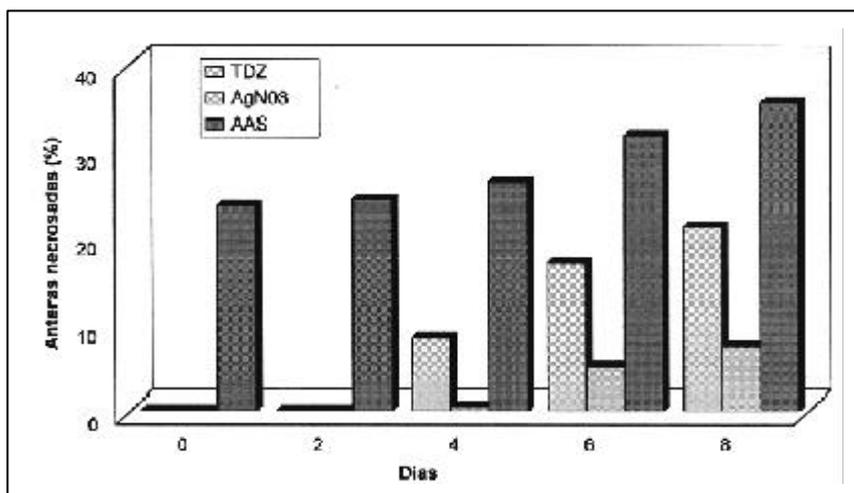
Com relação ao número de embriões por 100 anteras, verificou-se que o TDZ também se destacou com 170,7 embriões, mas não diferiu significativamente do meio acrescido de AgNO<sub>3</sub> (155,5 embriões), considerando os genótipos e os tempos de exposição ao ethephon em conjunto. Estes valores são próximos aos encontrados por Nervo *et al.* (1994) em anteras do genótipo PM 687 x Yolo Wonder, também inoculadas em meio C adicionado

de  $\text{AgNO}_3$ . O genótipo PM 687 x Yolo Wonder é considerado altamente responsivo, tendo sido usado como controle neste trabalho citado. Considerando dados em conjunto dos meios e genótipos, quatro dias de exposição ao ethephon foi significativamente favorável, obtendo-se em média 271,8 embriões por 100 anteras (Figura 3).

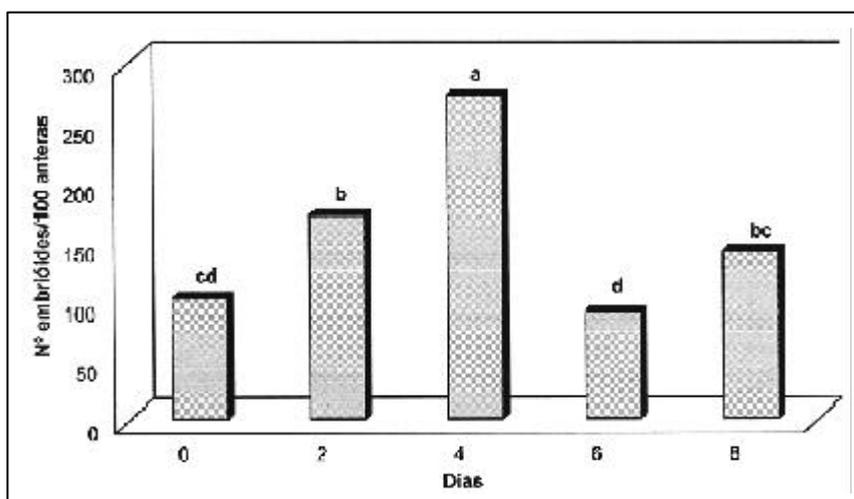
Apesar de dois e quatro dias terem sido os melhores tempos para a indução de embriões nas anteras e terem promovido os maiores números de embriões, o período de oito dias foi o mais eficiente na regeneração dos embriões em plântulas (Tabela 2). Somente anteras provenientes do meio de indução C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$  regeneraram plântulas, sendo PIX22C#31 x Linha 004 e PIX22C#21 x Ikeda, os genótipos mais responsivos (Tabela 2). PIX21C12#35 x Agrônômico 8 não regenerou qualquer plântula, permanecendo os embriões nos estádios globular e torpedo, até a completa necrose ao longo de 60 dias, mesmo quando transferidos para o meio R acrescido de 9,3 mM de cinetina. Os embriões dos outros genótipos, quando transferidos para o meio R + 9,3 mM de cinetina, também não regeneraram em plântulas.

As primeiras estruturas de desenvolvimento dos embriões em plântulas começaram a surgir a partir de 50 dias após a inoculação no meio de indução C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$  e, aproximadamente aos 70 dias, foram transferidas para o meio R sem reguladores de crescimento. Ocorreu o desenvolvimento de mais de uma plântula em alguns tubos, sendo estas individualizadas. As plântulas atingiram o ponto de aclimação por volta de 100 dias pós-inoculação das anteras.

Algumas plântulas não completaram o desenvolvimento *in vitro*, morrendo antes de estarem aptas para aclimação, enquanto outras morreram ainda na aclimação. Foram constatadas plântulas haplóides e diplóides. Considerando que a regeneração foi direta, sem passar por calos, supõe-se que as plântulas diplóides obtidas sejam provenientes dos micrósporos, devendo ter ocorrido uma diploidização *in vitro*. Do ponto de vista prático este fato é desejável, pois o emprego da colchicina tende a ser uma etapa longa sendo possível o surgimento de diplóides. Após as análises citológicas



**Figura 2.** Porcentagem de anteras necrosadas, em diferentes meios de indução combinados com tempo de permanência com ethephon, considerando dados dos genótipos em conjunto. Lavras (MG), UFLA, 1996.



**Figura 3.** Número de embriões por 100 anteras, em diferentes tempos de permanência com ethephon, considerando dados de genótipos e meio de indução em conjunto. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). Lavras (MG), UFLA, 1996.

**Tabela 2.** Frequência de plantas regeneradas dos genótipos cultivados em meio C adicionado de 5 mg/L de  $\text{AgNO}_3$ , em diferentes tempos de permanência com ethephon Lavras (MG), UFLA, 1996.

Genótipo	Tempo/ ethephon (dias)	Nº total de anteras inoculadas	Nº de plântulas	% de plântulas
PIX21C0#04 x 004	4	90	1	1.1
	6	84	2	2.4
	8	81	82	2.5
PIX22C#31 x 004	4	89	3	3.4
	6	85	1	1.2
	8	92	12	12.9
PIX21C15#45 x Ikeda	8	83	2	2.4
PIX22C#21 x Ikeda	4	86	3	3.5
	6	88	1	1.1
	8	85	4	4.7
Total		864	31	3.6

constataram-se três plântulas haplóides e uma diplóide a partir do genótipo PIX22C#31 x Linha 004, uma plântula haplóide a partir PIX21C15#45 x Ikeda e uma haplóide e uma diplóide a partir de PIX22C#21 x Ikeda.

As taxas de regeneração foram em geral superiores às alcançadas por George & Narayanaswamy (1973) e Sibi *et al.* (1979); foram semelhantes às obtidas por Dumas de Vault *et al.* (1981) e inferiores às dos trabalhos de Dumas de Vault *et al.* (1981) e Nervo *et al.* (1994).

Os resultados assemelham-se aos obtidos por Nervo *et al.* (1994), que alcançaram altas frequências de embriões, mas baixas taxas de conversão em relação ao número de embriões. Os autores afirmam que este é o ponto de estrangulamento da técnica, e sugerem maiores estudos de fatores que possam estar relacionados com tal situação. Com base nesta consideração e de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a taxa de conversão em plantas está diretamente ligada à produção e/ou inibição do etileno, tornando-se cada vez mais importante elucidar o real papel deste gás no controle, não só da embriogênese, mas principalmente na fase de maturação dos embriões obtidos.

## LITERATURA CITADA

- ADKINS, S.W.; KUNANUVATCHAIDACH, R.; GRAY, S.J.; ADKINS, A.L. Effect of ethylene and culture environment on rice callus proliferation. *Journal of Experimental Botany*, v. 44, n. 269, p. 1829-1835, Dec.1993.
- AUBOIRON, E.; CARRON, M.P.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 21, p. 31-37, 1990.
- AGARWAL, P.K.; BHOJWANI, S.S. Enhanced pollen grain embryogenesis and plant regeneration in anther cultures of *Brassica juncea* cv. PR-45. *Euphytica*, v. 70, p. 191-196, 1993.
- BIDDINGTON, N.L.; ROBINSON, H.T. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 25, p. 169-177, 1991.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; POCHARD, E. Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35°C. *Agronomie*, v. 1, n. 10, p. 859-864, 1981.
- EVANS, J.M.; BATTY, N.P. Ethylene precursors and antagonists increase embryogenesis of *Hordeum vulgare* L. anther culture. *Plant Cell Reports*, v. 13, p. 676-678, 1994.
- GEORGE, L.; NARAYANASWAMY, S.; Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, v. 78, p. 467-470, 1973.
- HERMAN, E. B. *Recent advances in plant tissue culture: regeneration, micropropagation and media 1988-1991*. New York: Agritech Consultants, Inc., Shrub Oak, 1991. 94 p.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S. The metabolism of [<sup>14</sup>C]-thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. *Physiologia Plantarum*, v. 65, p. 427-432, 1985.
- 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.
- NISSEN, P. Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiologia Plantarum*, v. 92, p. 397-403, 1994.
- OCKENDON, D.J.; McCLENAGHAN, R. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 32, p. 41-46, 1993.
- SIBI, M., DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D. Obtention de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le piment (*Capsicum annum* L.). *Annales de l'Amélioration des Plantes*, v. 29, n. 5, p. 583-606, 1979.
- PEIXOTO, J.R. *Melhoramento do pimentão (Capsicum annum L.) visando resistência aos nematóides do gênero Meloidogyne spp.* Lavras: ESAL, 1995. 103 p. (Tese doutorado).