

CULTIVO *IN VITRO* DE PIMENTA MALAGUETA EM FRASCOS COM
VENTILAÇÃO NATURAL: RESPOSTAS MIXOTRÓFICAS E
FOTOAUTOTRÓFICAS

ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO BARBOSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO - 2016

CULTIVO *IN VITRO* DE PIMENTA MALAGUETA EM FRASCOS COM
VENTILAÇÃO NATURAL: RESPOSTAS MIXOTRÓFICAS E
FOTOAUTOTRÓFICAS

ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO BARBOSA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF

159/2016

Barbosa, Roberto Rivelino do Nascimento

Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas / Roberto Rivelino do Nascimento
Barbosa. – Campos dos Goytacazes, 2016.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Fitotecnia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Virginia Silva Carvalho.

Área de concentração: Produção vegetal.

1. *Capsicum frutescens* 2. DIÓXIDO DE CARBONO 3. MEMBRANAS PERMEÁVEIS A GASES 4. SACAROSE 5. VEDAÇÃO I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Fitotecnia II. Título

CDD

633.84

CULTIVO *IN VITRO* DE PIMENTA MALAGUETA EM FRASCOS COM
VENTILAÇÃO NATURAL: RESPOSTAS MIXOTRÓFICAS E
FOTOAUTOTRÓFICAS

ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO BARBOSA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 19 de julho de 2016.

Comissão Examinadora

Prof^a. Renata Vianna Lima (D.Sc., Produção Vegetal) – IFES

Prof^a. Claudete Santa Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF

Prof. Eliemar Campostrini (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Prof^a. Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) – UENF
(Orientadora)

A Deus, pela minha existência;

“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam,
Deus é a minha força. “Ele é tudo o que eu sempre preciso.”
(Salmos 73.26).

Aos meus queridos pais, minha irmã e a todos os meus
familiares.

À minha esposa Aurilena de Aviz, pelo amor, carinho e
companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor incondicional, refúgio e fortaleza, que me guiou e concedeu força para concluir mais uma etapa importante da minha vida. Toda glória, louvor e honra seja dada ao Senhor Jesus Cristo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, por me proporcionarem a oportunidade de participar de um curso de altíssimo nível, que contribuíram demasiadamente para a minha qualificação profissional e pela concessão da bolsa.

À minha orientadora e amiga professora Virginia Silva Carvalho, por me aceitar e me orientar no curso de Mestrado, por acreditar em mim, por ter me guiado pelo caminho da ciência, pelos preciosos ensinamentos e conselhos que contribuíram grandemente para a minha vida profissional e pessoal, pelos momentos de alegria no laboratório, tornando o ambiente de trabalho muito saudável; pela paciência, compreensão e encorajamento nos momentos difíceis do curso. Sinto-me privilegiado por ser seu orientando, minha eterna gratidão.

Ao professor Eliemar Campostrini e ao laboratório de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos, amizade e pela ajuda nas análises fisiológicas;

Aos professores Claudete Santa Catarina e Rogério Figueiredo pelo apoio e pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório, pelo ensino, auxílios, disposição, conselhos e por todos os momentos de alegria vividos no laboratório e fora dele.

À minha amada esposa Aurilena, pelo amor, pelo companheirismo, por estar sempre ao meu lado nos momentos alegres e tristes, por ter me mostrado sempre o caminho correto a prosseguir e pela felicidade que é em minha vida.

Aos meus pais Rivelino e Nete, por serem minha inspiração, por todo amor, educação e conselhos, sou eternamente grato por ser seu filho; a felicidade é imensurável quando estamos reunidos, se não fosse por vocês não teria chegado até onde cheguei.

À minha irmã Letícia, pelo seu amor, por sua companhia e pelos momentos divertidos que passamos juntos. Agradeço aos meus avós paternos, Graça e Evaldo por todo o apoio e conselhos, minha avó materna Bernaldina, pelo apoio e conselhos, agradeço a todos da minha família, pelo amor e carinho.

Aos professores da UENF e da UFRA, que contribuíram ricamente para o meu aprendizado, pela dedicação ao ministrarem suas aulas e pela amizade.

A todas as Igrejas “Assembleia de Deus”: à do Parque Califórnia, à Matriz e à da cidade de Capitão Poço, pelas orações, pelos ensinamentos, pela excelente e prazerosa convivência.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta pela execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plântulas de *C. frutescens* com 10 dias, prontas para a transferência para os frascos de cultivo.....20
- Figura 2.** Modelo da confecção de membranas nas tampas dos frascos de cultivo. Membranas M2 e N2 com duas camadas de fita microporosa e uma de PTFE (A); membranas M3 e N3 com três camadas de fita microporosa e uma de PTFE (B). Adaptado de Saldanha et al., (2012).....21
- Figura 3.** Diferentes tipos de vedação nas tampas dos frascos de cultivo. Tampa rígida (TR) de polipropileno (A); TR perfurada com orifícios (B); TR com membranas de filtros vista superior (C); TR com membranas com vista inferior(D).....22
- Figura 4.** Gráficos das variáveis temperatura (A), umidade relativa (B) e déficit de pressão de vapor (DPV) (C), obtidos por meio dos dados coletados na sala de crescimento.....23
- Figura 5.** Massa da matéria fresca de raiz em diferentes tipos de vedação (A) e concentração de sacarose (B) TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa

rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare; M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com vedação utilizando duas camadas de fita microporosa Missner®. Letras minúsculas comparam os fatores entre si e diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....33

Figura 1 A. Sementes fisiologicamente maduras de *Capsicum frutescens*. (A) Semente intacta; (B) Semente sem tegumento; (C.D) Embrião isolado.....62

Figura 2 A. Embriões de *Capsicum frutescens* após excisão, colocados em placas de Petri, com meio MS para germinação.....62

Figura 3 A. Embriões *Capsicum frutescens* germinados com 10 dias de idade.....63

Figura 4 A. Transferência dos embriões de *Capsicum frutescens* para os frascos com diferentes tipos de vedação.....63

Figura 5 A. Transferência dos embriões *Capsicum frutescens* para os frascos com diferentes tipos de vedação.....64

Figura 6 A. Plantas de *Capsicum frutescens* cultivadas *in vitro* com 57 dias de idade. (A) frasco com vedação TR com 20 g L⁻¹ de sacarose; (B) frasco com vedação M3 sem sacarose; (C) frasco com vedação M3 com 5 g L⁻¹ de sacarose; (D) frasco com vedação M3 com 10 g L⁻¹ de sacarose; (E) frasco com vedação M3 com 15 g L⁻¹ de sacarose; (F) frasco com vedação M3 com 20 g L⁻¹ de sacarose.....64

Figura 7 A. Plantas de *Capsicum frutescens* *in vitro* com 57 dias de idade. (A) frasco com vedação TR sem sacarose; (B) frasco com vedação TR com 5 g L⁻¹ de sacarose; (C) frasco com vedação TR com 10 g L⁻¹ de sacarose; (D) frasco com vedação TR com 15 g L⁻¹ de sacarose; (E) frasco com vedação TR com 20 g L⁻¹ de sacarose.....65

Figura 8 A. Avaliação das taxas fotossintéticas de <i>Capsicum frutescens</i> in vitro com 57 dias de idade.....	65
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas em função dos fatores vedação e concentração de sacarose em plantas de *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*.....26
- Tabela 2.** Área foliar de plantas de *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....28
- Tabela 3.** Altura das plantas de *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....30
- Tabela 4.** Número de folhas de *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....31

Tabela 5. Massa da matéria fresca da parte aérea de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	32
Tabela 6. Massa da matéria seca da parte aérea de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	33
Tabela 7. Massa da matéria seca da raiz de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	34
Tabela 8. Massa da matéria fresca total de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	35
Tabela 9. Massa da matéria seca total de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	35
Tabela 10. Volume radicular de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	36
Tabela 11. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas em função dos fatores de vedação e sacarose em plantas de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i>	38
Tabela 12. Taxa fotossintética líquida de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	39
Tabela 13. Relação Fv/Fm de <i>Capsicum frutescens</i> , com 57 dias após a germinação <i>in vitro</i> , em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....	42

Tabela 14. Índice Fotossintético de *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....43

Tabela 15. Índice de SPAD em *Capsicum frutescens*, com 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.....44

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Aspectos gerais e econômicos de pimentas do <i>gênero Capsicum</i>	4
3.2. Cultivo convencional <i>in vitro</i>	6
3.3. Cultivo fotoautotrófico <i>in vitro</i>	8
3.4. Fonte de carbono.....	10
3.5. Intensidade Luminosa.....	12
3.6. Trocas gasosas.....	13
3.7. Membranas permeáveis a gases	15

4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Material Vegetal	18
4.2. Delineamento experimental.....	18
4.3. Desinfestação das sementes e germinação dos embriões	19
4.4. Transferência das plântulas do meio de germinação para os frascos de cultivo.....	20
4.5. Ambiente da sala de cultivo	22
4.6. Análise do crescimento.....	24
4.7. Capacidade fotossintética.....	24
4.8. Intensidade de verde	25
4.9. Análise estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
8. APÊNDICE.....	61

RESUMO

BARBOSA, ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO; Eng. Agrônomo, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2016. Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas. Orientadora: Prof^a. Virginia Silva Carvalho.

Plantas cultivadas *in vitro* apresentam respostas heterotróficas e, ou mixotróficas, devido ao incremento de uma fonte de carbono no meio de cultura, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF) e baixa difusão de dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera para o interior dos frascos de cultivo. O objetivo deste trabalho foi comparar o crescimento *in vitro* de plantas de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) em ambiente de cultivo convencional com frascos vedados e alta concentração de sacarose e em frascos com membranas permeáveis a gases em diferentes concentrações de sacarose. Foram usados como explantes embriões excisados de sementes maduras de *C. frutescens* (UENF 1636). O delineamento experimental utilizado foi o DBC, em esquema fatorial 5x5, com cinco tipos de vedação: TR (Tampa rígida), M2 (Duas camadas de fita microporosa Misnner[®]), M3 (Três camadas de fita microporosa Misnner[®]),

N2 (Duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]) e N3 (Três camadas de fita microporosa Nexcare[®]) e cinco concentrações de sacarose (0,5,10,15 e 20 g L⁻¹). Ao final de 57 dias de cultivo *in vitro* foram feitas avaliações biométricas e fisiológicas. Os frascos com membranas permeáveis a gases apresentaram aumento na troca gasosa, nesta sequência: TR<N3<M3<N2<M2. A entrada de ar através das membranas para o interior dos frascos possibilitou aumento da taxa fotossintética e, conseqüentemente, maior crescimento do vegetal. Os frascos com membranas e meio de cultura sem ou com baixas concentrações de sacarose proporcionaram aumento nas taxas fotossintéticas nas plantas de pimenta malagueta cultivadas *in vitro*. O maior crescimento das plantas foi observado em frascos com as membranas M2 e N2 devido à sua maior porosidade, permitindo assim maior troca gasosa. As plantas de *C. frutescens* apresentaram maior crescimento e resposta fotossintética em frascos com membranas permeáveis a gases em baixas concentrações de sacarose quando comparadas ao ambiente de cultivo convencional com frascos vedados e alta concentração de sacarose.

Palavras - chave: *Capsicum frutescens*, dióxido de carbono, membranas permeáveis a gases, sacarose, vedação.

ABSTRACT

BARBOSA, ROBERTO RIVELINO DO NASCIMENTO; Agronomist Engineer, M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July 2016. *In vitro* culture of chilli pepper in vessels with natural ventilation: mixotrophic and photoautotrophic responses. Advisor: Professor Virginia Silva Carvalho.

Plants grown *in vitro* present heterotrophic or mixotrophic responses, due to the increment of a carbon source in the culture medium, low photosynthetic photon flux density (PPF) and low carbon dioxide diffusion (CO₂) from the atmosphere to the interior of culture vessels. This study aims to compare the *in vitro* growth of chilli pepper plants (*Capsicum frutescens*) in conventional cultivation environment with sealed vessels and high concentration of sucrose and vessels with membranes permeable to gases in different concentrations of sucrose. Embryos were used as explants excised from mature seeds of *C. frutescens* (UENF 1636). The experiment was conducted in a randomized complete block design, in 5x5 factorial system with five types of seal: TR (hard cover), M2 (Two layers of microporous tape Misnner[®]), M3 (three layers of microporous tape Misnner[®]), N2

(Two microporous tape layers Nexcare[®]) and N3 (three layers microporous tape Nexcare[®]) and five concentrations of sucrose (0,5,10,15 and 20 g L⁻¹). At the end of 57 days of *in vitro* culture biometrics and physiological assessments were made. The vessels with membranes permeable to gases showed increase in gas exchange, in this sequence: TR <N3 <M3 <N2 <M2. The air inlet through the membranes into the interior of the vessels had made it possible the increasing of photosynthetic rate and consequently increased the plant growth. The vessels with membranes and culture medium without or with low concentrations of sucrose provided an increasing in photosynthetic rates of chilli pepper plants cultured *in vitro*. The greatest plant growth was observed in vessels with membranes M2 and N2 due to their greater porosity, thereby allowing greater gas exchange. Plants of *C. frutescens* showed higher growth and photosynthetic answer in vessels with gas permeable membranes in lower sucrose concentrations when compared to conventional culture in sealed vessels with high concentration of sucrose.

Key - words: *Capsicum frutescens*, carbon dioxide, gas permeable membranes, sucrose, seal.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil as pimentas do gênero *Capsicum* são cultivadas em toda a sua extensão territorial, em regiões que apresentam clima tropical e subtropical. As espécies do gênero *Capsicum* apresentam grande relevância econômica, contribuindo para a ampliação do setor agroindustrial, assumindo assim uma posição relevante no cenário nacional, devido à elevada demanda do mercado consumidor. Há várias formas de utilização do produto como molhos, conservas, geleias e pápricas (Nascimento et al., 2012).

A regeneração de plantas a partir da cultura de tecidos é um processo fundamental na biotecnologia vegetal principalmente na propagação de plantas e no melhoramento genético. Para as espécies do gênero *Capsicum* o principal método de propagação é por via seminífera, não sendo utilizadas técnicas de culturas de tecidos na propagação de pimentas (Alejo e Malagón, 2001).

Walter (2015), cultivando embriões isolados de pimentas (*Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense* L. e *Capsicum frutescens* L.), demonstrou que as plantas cresceram em condições fotoautotróficas *in vitro*, ou seja, em meio de cultura sem sacarose, porém com baixa troca gasosa e com

baixa intensidade luminosa. Na fase de aclimatização estas plantas apresentaram baixa sobrevivência. Segundo o autor, o aumento nas trocas gasosas, nestas quatro espécies cultivadas sem sacarose, poderia propiciar maior crescimento *in vitro* e redução nos problemas de adaptação dessas mudas durante a fase de aclimatização (Walter, 2015).

O ambiente de cultivo *in vitro* convencional em frascos tampados apresenta baixa troca gasosa e baixa iluminação. Além disso, os explantes geralmente não possuem o aparato fotossintético funcional capaz de realizar fotossíntese, o que inviabilizaria o seu crescimento e não fosse adicionada uma fonte de carboidrato (Skrebsky et al., 2004).

Assim sendo, no cultivo *in vitro* convencional os explantes crescem em condições heterotróficas e, ou mixotróficas, o que pode gerar estresses que irão refletir no padrão anatômico e morfofisiológico em algumas plantas, quando forem aclimatizadas. Já o cultivo fotoautotrófico *in vitro*, pela redução da sacarose, aumento da iluminação e das trocas gasosas, pode contribuir na redução do estresse causado nesta passagem da fase *in vitro* para a *ex vitro* (Costa, 2012).

No cultivo fotoautotrófico *in vitro*, uma forma de melhorar as trocas gasosas é o uso de membranas permeáveis a gases. Dessa forma, com o uso das membranas pode-se reduzir a umidade relativa do ar e aumentar a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta (Xiao et al., 2011).

Portanto, o emprego de membranas permeáveis a gases é uma alternativa que pode melhorar as condições ambientais *in vitro*, proporcionando aumento nas trocas gasosas do ambiente com o interior dos frascos. Além disso, a eliminação ou redução da sacarose do meio de cultura também pode contribuir para a ativação e funcionamento do aparato fotossintético da planta. O cultivo fotoautotrófico possibilita resolver um dos problemas do cultivo *in vitro* convencional que é a transição brusca das plantas de uma condição heterotrófica ou mixotrófica *in vitro* para uma condição autotrófica durante a aclimatização.

2. OBJETIVO

2.1. Geral

Comparar o crescimento *in vitro* de plantas de pimenta malagueta (*C. frutescens*) em ambiente de cultivo convencional com frascos vedados e alta concentração de sacarose (mixotrófico) e em frascos com membranas permeáveis a gases em diferentes concentrações de sacarose.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar diferentes tipos de vedação nas tampas dos frascos e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *C. frutescens*.
- Avaliar as taxas fotossintéticas de plantas cultivadas em frascos com membrana e em frascos com tampa rígida.
- Avaliar o crescimento *in vitro* de plantas de *C. frutescens* em frascos com membranas e em frascos com tampa rígida.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais e econômicos de pimentas do gênero *Capsicum*

As pimentas do gênero *Capsicum* se destacam por serem de grande importância econômica mundial como alimentos, especiarias, produtos medicinais e também participam do mercado ornamental (Moscone et al., 2007). Devido a essa grande importância, as pimentas são cultivadas nos mais diferentes locais do Brasil e no mundo. No Brasil as pimentas são conhecidas por diversos nomes regionais como pimenta malagueta, dedo de moça, chapéu-de-bispo, americana, pimenta de cheiro, cambuci, habanero, tabasco, biquinho e murupi (Ribeiro et al., 2008).

As espécies de *Capsicum* são consideradas importantes componentes do mercado de hortaliças frescas no Brasil, além de ser a base para o desenvolvimento de condimentos, medicamentos, temperos e conservas em nível caseiro e industrial (Reifschneider, 2000).

O gênero *Capsicum* pertence à Divisão Spermatophyta, Filo Angiospermae, Classe Magnoliopsida, Ordem Solanales e Família Solanaceae como o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a batata (*Solanum tuberosum* L.), a

berinjela (*Solanum melongena* L.) e o jiló (*Solanum gilo* Raddi) e compreende um grupo de diversas pimentas que são originárias da América do Sul (Bolívia) e América Central (México) (Moscone, 2007). Segundo Carvalho e Bianchetti (2008) as pimentas foram “descobertas” por Cristóvão Colombo no período das Grandes Navegações (1492). Quando Colombo explorou a América Central encontrou-as e levou-as para a Europa, passando a serem cultivadas nesse continente e, posteriormente, se difundiram pela África e Ásia.

Dentre as espécies deste gênero, cinco são domesticadas e largamente cultivadas e utilizadas pelo homem: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*; *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*. Destas, apenas a *C. pubescens* não é cultivada no Brasil. O centro de diversidade da espécie *C. annuum* var. *annuum*, a forma mais variável e cultivada é o México e a América Central; de *C. frutescens*, inclui as terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas, no Caribe; de *C. baccatum* var. *pendulum*, a Bolívia (maior diversidade) e o sudeste brasileiro; e de *C. chinense*, a mais conhecida das espécies domesticadas no Brasil, é a Bacia Amazônica (Lopes et al., 2007).

Na América pré-colombiana as pimentas faziam parte da dieta populacional, os índios cultivavam pimenteiros por todo o seu território, pois as pimentas salientavam um sabor e aroma específico enriquecendo a culinária indígena. Além disso, as pimentas preservavam os indígenas contra as contaminações bacterianas e fúngicas, favorecendo a conservação da saúde, acrescentando longevidade aos ameríndios (Reifschneider, 2008).

Hoje toda a América e os demais continentes mantêm o costume de cultivar pimenta, pois é notório que o fruto possui ampla utilidade nas indústrias, por exemplo, na culinária que há inúmeros pratos gastronômicos, molhos conservas, geleias; na medicina em fabricações de remédios para artrites com pomadas à base de capsaicina, remédios para dores dentárias, dores musculares como o emplastro, dor de cabeça, gastrite e má digestão. Além disso, as pimentas são aplicadas como arsenal defensivo não letal pelos militares, na fabricação de “sprays” e pistolas de pimenta (Reifschneider, 2008).

As pimentas são cultivadas em várias regiões do mundo, onde os principais países produtores são a Índia, Coréia do Sul e Norte, Tailândia, China,

Vietnã, Sri-Lanka e Indonésia e os maiores consumidores são os italianos e os coreanos. No Brasil, são cultivadas em todo o território, sendo que os principais produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino e Penteado, 2006). A produção mundial é de 30 milhões de toneladas em uma área plantada de 4.000.000 ha (FAOSTAT, 2011).

As pimentas se caracterizam pela diversidade de formas e tamanhos, são bastante valorizadas por suas variações de cores, pungência, tamanho e sabor (López et al., 2012). No Brasil, as pimentas fazem parte da riqueza cultural, sendo de extrema importância ao patrimônio genético de nossa biodiversidade, são ricas em carotenoides, flavonoides, fenóis, capsaicina e ácido ascórbico (Buso et al., 2008). A capsaicina é uma substância que é aplicada externamente no corpo e promove internamente endorfinas que acarretam em percepção de bem-estar e ativam o potencial imunológico (Lee et al., 2005; Reifschneider, 2008).

3.2. Cultivo convencional *in vitro*

A cultura de tecidos é a técnica de cultivar células, tecidos, órgãos ou parte de órgãos de uma planta (explantes), em um meio de cultura nutritivo e ambiente asséptico, com controle de temperatura, fotoperíodo, umidade e irradiância, em um determinado local de cultivo denominado de sala de cultivo ou sala de crescimento (Carvalho et al., 2011). No meio de cultura são utilizados sais minerais para a nutrição da planta. Existem diversos tipos de meios de cultura, sendo o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) o mais utilizado no cultivo *in vitro*.

A propagação de plantas usando as técnicas de cultura de tecidos é dividida em micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, ou seja, na produção de clones *in vitro*; e a propagação seminífera *in vitro*, que é a utilização de sementes na produção de mudas *in vitro*. Essas técnicas permitem a obtenção de elevadas quantidades de mudas livres de agentes patogênicos, usando um pequeno número de explantes. Em comparação com as técnicas de propagação tradicional, a propagação *in vitro* apresenta significativas vantagens, como produção de mudas saudáveis e em larga escala e possibilita propagar espécies de difícil propagação (Carvalho et al., 2011).

Para as espécies do gênero *Capsicum* o principal método de propagação comercial é o seminífero, não sendo utilizadas técnicas de culturas de tecidos na propagação de pimentas (Alejo e Malagón, 2001).

As técnicas de cultura de tecidos em pimentas são usadas principalmente nos programas de melhoramento genético e para estudos sobre as respostas fisiológicas *in vitro*, contribuindo para transferências de genes, eliminação de patógenos e seleção de genótipos melhorados, beneficiando a qualidade da cultura da pimenta (Kothari et al., 2010). Estudos dessas respostas nas plantas *in vitro* são de grande importância para poder melhorar as condições de cultivo.

A transferência das plantas *in vitro* para condições *ex vitro* pode resultar na baixa taxa de sobrevivência durante a aclimatização, acarretando estresses fisiológicos (Kodym e Zapata-Aria, 1999; Kozai e Kubota, 2001), como por exemplo, estresse por alto fluxo de fótons fotossintéticos (FFF). Pois as plantas na sala de cultivo, dependendo da fonte luminosa, recebem geralmente entre 30 a 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e quando transferidas para o ambiente protegido, dependendo das condições ambientais, podem receber até 1000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Walter, 2015; Sousa, 2016).

Do mesmo modo, o estresse hídrico, causado pela saída da planta da condição *in vitro* para *ex vitro*, pode resultar em desequilíbrio, reduzindo o potencial hídrico (Ψ_w) e o potencial de pressão (Ψ_p) levando a perda da turgescência das células (Taiz e Zeiger, 2013).

O baixo FFF e a alta umidade do cultivo *in vitro* são fatores que podem estar relacionados à desestruturação dos tecidos vegetais, como o retardamento do funcionamento da abertura estomática e a formação de uma camada delgada de cera epicuticular ou ausência dessa cera, que podem levar à redução do controle hídrico da planta, aumentando as taxas de transpiração dessas plantas, que em algumas delas sucede a desidratação e, em seguida, a morte quando levadas para a etapa de aclimatização (Silva, et al., 2008).

A temperatura do ar e a umidade relativa do ar são variáveis durante a aclimatização. Dependendo da época do ano, se a temperatura do ar estiver muito alta e a umidade relativa muito baixa, o déficit de pressão de vapor do ar

(DPV) será alto e os estômatos certamente serão fechados impedindo a entrada de CO₂ atmosférico para o mesofilo foliar (Couto, 2012).

Outro estresse fisiológico que pode ocorrer durante a aclimatização é o fenômeno da foto-oxidação da molécula de clorofila, originando folhas amareladas reduzindo então o potencial fotossintético em plantas superiores (Bhattacharjee, 2010). Essa foto-oxidação é causada pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são subprodutos das reações redox, que ocorrem principalmente nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Kovalchuk, 2010; Karuppanapandian et al., 2011).

O ambiente de cultivo *in vitro* convencional é caracterizado pela elevada umidade relativa do ar, concentrações de etileno prejudiciais para a planta e baixa concentração de CO₂ no interior do frasco durante o período de crescimento do explante (Fujiwara e Kozai, 1995; Xiao et al., 2011).

Nestes frascos fechados, os explantes crescem em meio solidificado com ágar ou outros agentes geleificantes, ou em meio líquido, suplementados com uma fonte de carbono. A fonte de carbono mais utilizada na preparação do meio de cultura é a sacarose. Assim sendo, uma alternativa que pode superar os problemas durante a aclimatização é o cultivo fotoautotrófico *in vitro* (Kozai 1991, Xiao et al., 2011).

A perda de algumas plantas nas etapas de aclimatização é um dos principais entraves no cultivo *in vitro*, ou seja, durante a fase *in vitro*, as mudas estão submetidas à condição heterotrófica e, ou mixotrófica, pelo fato do meio de cultura ser suplementado com uma fonte de carbono fazendo com que as plantas na etapa de aclimatização tenham dificuldade em recuperar suas características autotróficas (Kozai,1991; Xiao e Kozai, 2006).

3.3. Cultivo fotoautotrófico *in vitro*

O cultivo fotoautotrófico *in vitro* é definido como o cultivo *in vitro*, sem o uso de fontes de carbono (sacarose) no meio de cultura, em que o crescimento dos explantes estabelecidos *in vitro* é obtido por meio da capacidade fotossintética e da absorção dos nutrientes inorgânicos presentes no meio de

cultura pelo próprio explante. Esta forma de cultivo pode ser chamada também de cultivo fotossintético *in vitro*, cultivo inorgânico ou cultivo isento de açúcar (Kozai, 1991; Kozai, et al., 2005).

O cultivo fotoautotrófico *in vitro* foi desenvolvido na década de 80, desde então vários estudos têm sido realizados para investigar os efeitos do microambiente dos recipientes de cultivo no crescimento e desenvolvimento das plantas para elaborar estratégias para melhorar estas condições *in vitro* (Zobayed et al., 2001;. Yoon et al 2009;. Kozai, 2010).

Muitos explantes ou plantas *in vitro* possuem a habilidade de crescer de forma fotoautotrófica, isto é, sem sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese (Kozai, 1991). O cultivo fotoautotrófico *in vitro*, além de poder aumentar o crescimento dos explantes, também possibilita a redução dos riscos de contaminação microbiana e pode melhorar as características fisiológicas da planta e facilitar a sua aclimatização (Afreen et al., 2002; Kozai e Nguyen, 2003).

A utilização desse método de cultivo na cultura de tecidos vegetais vem surgindo como possibilidade para aumentar a eficiência da propagação *in vitro* sem o uso de sacarose no meio de cultura, com condições similares ao *ex vitro* favorecendo a fotossíntese, podendo resultar em maior número de plantas sobreviventes na etapa de aclimatização e plantas com características fisiológicas superiores (Kubota e Tadokoro, 2001).

A maioria das plantas estabelecidas *in vitro* pode ser capaz de crescer fotoautotroficamente. As oscilações na taxa fotossintética líquida dos explantes *in vitro* não são atribuídas à baixa fotossíntese, mas sim à baixa concentração de gás carbônico (CO₂) dentro do recipiente de cultivo, devido à reduzida troca gasosa com a atmosfera. O crescimento fotoautotrófico *in vitro* de muitas espécies de plantas pode ser bem sucedido com o aumento das concentrações de CO₂(enriquecimento de CO₂ nos recipientes de cultivo ou filtros colocados nos recipientes para as trocas gasosas), do aumento da intensidade de luz no recipiente e na redução de sacarose no meio de cultura (Xiao et al., 2011).

As principais vantagens do sistema fotoautotrófico são: aumento do crescimento das plantas, redução dos riscos de contaminação por patógenos

devido à eliminação da sacarose no meio de cultura, melhoria das características morfológicas e na capacidade fotossintética, aumento da porcentagem de sobrevivência e redução do estresse da planta durante a aclimatização, eliminação dos custos com iluminação e com fontes de carbono (Kodym e Zapata – Arias, 1999; Afreen et al., 2002; Kozai e Nguyen, 2003; Zobayed , 2006).

Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos sobre o cultivo fotoautotrófico foi o de Kozai et al., (1988) cultivando batatas (*Solanum tuberosum* L.) em meio de cultura isento de açúcar, com o intuito de desenvolver um sistema de propagação em massa, automatizado para produzir batata-semente livre de doenças. Kozai e Iwanami (1988) e Pospisilova et al., (1988) alcançaram sucesso no cultivo de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) em cultivo fotoautotrófico. A baixa concentração de CO₂ no interior dos recipientes de cultivo *in vitro* é a principal causa da oscilação da fotossíntese líquida de plantas cultivadas *in vitro* (Kozai, 1991).

Uma forma para fornecer a entrada de CO₂ no interior dos frascos de cultivo é a aplicação de tampas e, ou frascos que possam permitir trocas gasosas (Erig e Schuch, 2005). Permitindo as trocas gasosas, o CO₂ entra frequentemente no frasco e há redução significativa nas concentrações de etileno e da umidade relativa no interior dos frascos de cultivo (Kozai e Nguyen, 2003).

Trabalhos de Shin et al. (2013) com *Doritaenopsis* 'New Candy' revelam que fornecendo condições fotoautotróficas para essas plantas, como o aumento da concentração de CO₂, aumento da intensidade luminosa e a eliminação total da sacarose no meio de cultura, podem promover o crescimento da fotossíntese e maior acúmulo de biomassa vegetal possibilitando maior sobrevivência na etapa de aclimatização.

3.4. Fonte de carbono

A utilização de sacarose no meio de cultura fornece energia para o metabolismo vegetal *in vitro*. Diversas plantas lenhosas cultivadas *in vitro* com

sacarose têm apresentado maior ganho de biomassa durante a aclimatização (Hazarika, 2003).

A quantidade de sacarose no meio de cultura tem efeito na multiplicação e no crescimento das culturas estabelecidas *in vitro*. Na propagação de plantas *in vitro* são utilizadas concentrações de 10 a 40 g L⁻¹. Concentrações mais elevadas podem gerar um acúmulo de açúcares solúveis na folha, ocasionando a inibição da síntese da ribulose 1,5 - bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e da clorofila, dificultando também a regeneração da ribulose 1,5 – bifosfato (RuBP) pela deficiência do fósforo inorgânico (Pi) no estroma do cloroplasto, diminuindo as taxas fotossintéticas das plantas (Adelberg et al., 1999). Isso afeta o crescimento da planta na aclimatização durante a conversão de uma condição heterotrófica *in vitro* para autotrófica *ex vitro*. Algumas plantas não conseguem sobreviver na etapa de aclimatização (Park et al., 2011). Rodríguez et al. (2003) observaram que plantas de cana-de-açúcar micropropagadas convencionalmente apresentaram baixo rendimento fotossintético, apresentando baixo crescimento e amarelecimento das folhas, provavelmente devido à baixa eficiência da Rubisco.

Alta concentração de sacarose pode reduzir o potencial osmótico (Ψ_s) do meio de cultura, fazendo com que o potencial hídrico (Ψ_w) da planta caia drasticamente, podendo impedir o sucesso da transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (Kozai et al., 2005; Park et al., 2011; Taiz e Zeiger, 2013).

A sacarose pode trazer aumento no custo de produção do cultivo *in vitro*, não pelo preço de mercado, pois a sacarose tem um custo muito baixo, mas sim pela probabilidade do risco de contaminação *in vitro*. A sacarose no meio de cultura pode favorecer o crescimento de fungos e bactérias, causando competição com a planta pelo meio de cultura, possibilitando a morte dos vegetais (Prakash et al., 2004).

Seria interessante que o método de cultivo *in vitro* se aproximasse das condições *ex vitro*, como por exemplo, fornecer para o explante condições em que seja eliminada a fonte de carbono do meio de cultivo e enriquecendo a atmosfera do recipiente com CO₂ e aumentar a densidade de FFF, assim as plantas poderiam passar a apresentar adequadas respostas fotoautotrófica *in vitro* (Xiao et al., 2011).

3. 5. Intensidade Luminosa

A intensidade e qualidade da luz são fatores importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro*. Condições de baixa intensidade de luz nos recipientes de cultivo *in vitro* são análogos às condições de uma planta à sombra. No cultivo *in vitro* convencional geralmente são utilizadas como fonte de luz, lâmpadas fluorescentes simulando a luz do dia (Macedo et al., 2011).

Geralmente, a densidade de FFF no ambiente *in vitro* é de 30 a 60 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Quando as plantas são transferidas para a aclimatização, elas podem sofrer estresse por luz, pois a densidade de FFF na casa de vegetação é muito maior que no ambiente *in vitro*. Portanto, normalmente, quando as plantas oriundas do cultivo *in vitro* são transferidas para o ambiente protegido, são utilizadas telas para reduzir a densidade de FFF (Sombrite®) para a proteção das plantas contra altos FFF que podem ocasionar a morte das plantas (Silva et al., 2008).

Mas plantas colocadas em condições de alta densidade de FFF estarão predispostas a foto-oxidação, podendo ocorrer a morte do vegetal. O resultado destes danos pode reduzir a assimilação de CO_2 após a transferência da condição *in vitro* para condições *ex vitro* de alta luz, possivelmente, para toda a vida da folha (Van Huylbroeck 1994; Van Huylbroeck et al. 2000).

Uma solução para resolver esses entraves é tentar imitar as condições ambientais *ex vitro*, aumentando a densidade de FFF no cultivo *in vitro* ou substituindoas lâmpadas fluorescentes por LED'S (Light Emitting Diode) (Erig e Schuch, 2005; López et al., 2015). Plantas cultivadas *in vitro* com alta densidade de FFF entre 100 e 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com frascos que permitam trocas gasosas podem apresentar aumento significativo na taxa fotossintética líquida, transpiração, aumento na condutância estomática, incremento na matéria fresca e seca, aumento na área foliar e comprimento de raízes em pimentas do gênero *Capsicum* (Dewir et al., 2005; López et al., 2015).

Melhorias foram obtidas no crescimento e sobrevivência de plantas de coco (*Cocos nucifera*) na transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*, por

meio do aumento da densidade FFF durante a fase *in vitro* (Fuentes et al., 2005). Resultados significativos também foram notórios em batatas cultivadas *in vitro*, com densidade de FFF de 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Essas plantas apresentaram estômatos mais funcionais, densidade estomática dobrada quando comparada com o FFF convencional e cera epicuticular mais espessa (Zobayed et al., 1999; Dewir et al., 2006; Ivanova e Van Staden, 2010).

Em eucalipto (*Eucalyptus tereticornis* Smith) cultivado *in vitro* sem sacarose e com FFF de 125 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o número de brotações na etapa de multiplicação foi superior quando comparadas às condições ambientais convencionais *in vitro* (Khan et al., 2003).

Para apresentar bons resultados de crescimento e desenvolvimento, não basta apenas aumentar a densidade de FFF, mas sim permitir que os recipientes de cultivo *in vitro* permitam maior troca gasosa. Como a troca gasosa do ambiente para o interior do frasco é bastante reduzida no cultivo convencional, a oscilação na taxa fotossintética é devida ao CO_2 (Park et al., 2011).

Densidade de FFF de 251 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com frascos que não permitem alta troca gasosa não foi eficiente em plantas de pimentas (*Capsicum chinense* Jacq. cv. Naranja). As plantas apresentaram baixos teores de clorofila *a*, *b* e total, crescimento reduzido de raízes e menor taxa de sobrevivência na aclimatização, comparados com pimentas cultivadas *in vitro* com 81 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de FFF. Além de aumentar a densidade de FFF é preciso permitir que haja maior entrada de CO_2 no interior do recipiente de cultivo (López et al., 2015).

3.6. Trocas gasosas

Os explantes são normalmente cultivados *in vitro* em recipientes (frascos) fechados, que influenciam significativamente, tanto a umidade relativa como as concentrações de CO_2 do microambiente (Smith e Spomer 1995). Esse ambiente convencional *in vitro* é caracterizado pela alta umidade relativa do ar, baixa

concentração de CO₂ e acúmulo de etileno (Kozai et al., 1996; Hazarika, 2006; Xiao et al., 2011).

O cultivo *in vitro* requer a vedação do frasco para evitar a contaminação do explante, ou seja, a entrada de micro-organismos nos recipientes. Na cultura de tecidos são utilizadas tampas rígidas de polipropileno, filmes de PVC, tampas metálicas, dentre outros materiais. Esta vedação do frasco limita as trocas gasosas com o ambiente, que causam problemas em algumas espécies durante o cultivo *in vitro* e durante a aclimatização (Nguyen e Kozai, 2005; Alvarez et al., 2012).

Um dos problemas mais recorrentes na cultura de tecidos de modo geral está relacionado com a alta umidade relativa no espaço livre do frasco de cultivo (*headspace*). A alta umidade faz com que os tecidos foliares sejam excessivamente constituídos de água e o surgimento da inibição da síntese de celulose e lignina, contendo muito mais água em seus tecidos do que folhas de plantas cultivadas fora do ambiente *in vitro* (Chakrabarty et al., 2006; Carvalho et al., 2011).

Existem diversos métodos para solucionar o problema com a alta umidade relativa no *headspace*: aumentar a força do meio de cultura, modificando o potencial osmótico (Ψ_s) do meio (Debergh 1983; Makunga et al., 2006); usando soluções saturadas de sais (Tanaka et al., 1992); e aumentar a ventilação dos frascos de cultivo (Majada et al., 1997; Zobayed et al., 1999).

A ventilação natural dos recipientes de cultura pode reduzir a umidade relativa no cultivo *in vitro* e também aumentar a taxa de transpiração, o que favorece um microambiente adequado para a formação de cera epicuticular. O cultivo fotoautotrófico pode solucionar esses problemas (Zobayed et al., 1999; Xiao et al., 2011).

Ivanova e Staden (2010), trabalhando com plantas de *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans conseguiram eliminar completamente a ocorrência de hiperhidricidade. Também conseguiu aumentar o teor de clorofila nas folhas, e construir mecanismos que controlassem a perda de água dos explantes aumentando a deposição de cera epicuticular.

Quando as trocas gasosas ocorrem em ambientes com concentração de CO₂ da atmosfera são chamadas de ventilação natural. Quando a atmosfera é enriquecida com CO₂, o processo é chamado de ventilação forçada (Kaneshi et al., 1998; Cui et al., 2000; Khan et al., 2003).

Uma alternativa para aumentar a troca gasosa é o uso de tampas com membranas permeáveis a gases, com algodão e outros materiais (Kanechi et al., 1998; Kodym e Zapata-Arias, 1999; Kozai e Kubota, 2001, Kozai e Nguen, 2003).

Foi observado que a utilização de membranas permeáveis a gases, no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas aumentou a concentração de CO₂ dentro do recipiente, o que resultou no aumento da capacidade fotossintética dos explantes (Nguyen e Kozai, 1998, Rodrigues et al., 2012).

Numerosos estudos mostraram os benefícios de se usar membranas permeáveis a gases, aumentando o crescimento de mudas: Kozai et al. (1988) em batata (*Solanum tuberosum*), Kozai e Iwanami (1988) em cravo (*Syzygium aromaticum*), Nguyen e Kozai (1998) em bananeira (*Musa* spp.), Xiao et al. (2003) em cana de açúcar (*Saccharum* spp.), Lucchesini et al. (2006) em murta (*Myrtus communis* L.), Liao et al. (2007) em gérbera (*Gerbera jamesonii* L.), Xiao e Kozai (2006) em *Limonium latifolium* L., e Zhang et al. (2009) em *Momordica grosvenori* L., Iarema et al. (2012) e Saldanha et al. (2012) em ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen], Pinheiro et al. (2013) em oliveira (*Olea europaea* L.), Batista (2012) em pimentão ornamental (*Capsicum annuum*).

A tampa mais utilizada para aumentar as trocas gasosas são as que possuem membranas microporosas. Essas membranas microporosas são materiais permeáveis a gases que facilitam as trocas gasosas e a difusão do CO₂ para o interior do frasco de cultivo. Além disso, a umidade relativa no interior do recipiente de cultura é reduzida, o que estimula o aumento da transpiração e a absorção de água e nutrientes pelo explante (Kozai e Kubota, 2001).

3.7. Membranas permeáveis a gases

O cultivo *in vitro* usando membranas microporosas permeáveis a gases pode melhorar a difusão de ar e a ventilação natural do recipiente de cultura e

aumentar as concentrações de CO₂ no interior do recipiente de cultivo, podendo resultar em maior atividade fotossintética, maior taxa de crescimento e maior sobrevivência na etapa de aclimatização. Essas membranas podem ser colocadas tanto na superfície das tampas como nas laterais dos frascos. São constituídas de um material poroso que permite a circulação do ar e não entrada para os micro-organismos. Essas membranas são resistentes a autoclavagem (Fujiwara e Kozai, 1995; Xiao et al., 2011; Saldanha et al., 2012).

Existem empresas que comercializam esses tipos de membranas e a mais utilizada mundialmente é a membrana MilliSeal[®]. Usando essas membranas permeáveis a gases, a difusão do ar e ventilação natural do frasco de cultura podem ser melhoradas, resultando no aumento da concentração de CO₂ no *headspace*, aumentando significativamente a taxa fotossintética dos vegetais cultivados *in vitro* (Cui et al., 2000; Kitaya et al., 2005).

As membranas porosas podem favorecer o crescimento dos explantes *in vitro* e controlar as concentrações de etileno diminuindo a abscisão foliar das plantas *in vitro*. Além das vantagens das membranas na fase *in vitro*, favorecem também o aumento da taxa de sobrevivência e o crescimento e desenvolvimento durante a etapa de aclimatização (Zobayed et al., 2000; Shim et al., 2003; Pinheiro et al., 2013).

A eficiência da membrana microporosa MilliSeal[®] foi verificada em experimentos com plantas de ginseng brasileiro *P. glomerata*. As plantas dos tratamentos com as membranas apresentaram maior crescimento, maior área foliar e sistema radicular mais vigoroso e 100% de sobrevivência durante a aclimatização. A utilização dessas membranas permitiu um aumento das trocas gasosas, proporcionando maior atividade fotossintética e maior crescimento vegetal (Iarema et al., 2012). Nestas plantas, o crescimento dos explantes foi maior em condições fotoautotróficas quando comparado com condições heterotróficas e mixotróficas.

As membranas MilliSeal[®] são difíceis de se encontrar no Brasil e têm um custo elevado. Membranas microporosas preparadas artesanalmente podem ser usadas como alternativa para melhorar as trocas gasosas (Saldanha et al., 2012). Estas membranas são compostas por duas ou mais camadas de fita microporosa

sendo que entre as camadas há uma camada da fita veda rosca de politetrafluoretileno (PTFE). Em um trabalho com ginseng brasileiro não houve diferença entre os tratamentos com membranas MilliSeal[®] e com membranas caseiras. Os autores concluem que as membranas caseiras podem ser uma alternativa viável de baixo custo para o sistema fotoautotrófico (Saldanha et al., 2012).

O custo das membranas caseiras é de aproximadamente US\$ 0,082 nos EUA, enquanto a membrana comercial MilliSeal[®] custa US\$ 0,860, possibilitando a redução de custos. Além disso, as membranas caseiras são facilmente preparadas e utilizadas, o que evita problemas relacionados ao tempo de envio dos EUA ao Brasil (Saldanha et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia – LFIT, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF localizado no município de Campos dos Goytacazes (Latitude = 21°19'23", Longitude = 41°10'40"; Altitude = 14 m).

Foram utilizados como explantes embriões excisados de sementes fisiologicamente maduras de pimenta malagueta *C.frutescens* (UENF 1636) pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.2. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 5x5, com cinco tipos de vedação nas tampas rígidas dos frascos

e cinco concentrações de sacarose, totalizando 25 tratamentos com três repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco com quatro explantes, totalizando 300 embriões nos três blocos.

4.3. Desinfestação das sementes e germinação dos embriões

O processo de desinfestação das sementes foi conduzido em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar, com imersão das sementes por um minuto em álcool 70% (v/v), posteriormente imersas em 80 mL de solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,7%, com adição de duas gotas de Tween 20 por 15 minutos e lavadas por três vezes em água desionizada e autoclavada nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente, e deixadas de molho na quarta água por 12 horas antes do isolamento dos embriões maduros, segundo metodologia de Walter (2015).

Com auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival[®]), pinça e bisturi, os embriões maduros foram isolados e colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) com 25 mL de meio de cultura, contendo metade da concentração dos sais minerais do MS e complexo vitamínico de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, solidificado com 8 g L⁻¹ ágar bacteriológico Vetec[®], com pH ajustado para 5,7± 0,1 e autoclavado por 15 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão.

Cada placa de Petri recebeu 25 embriões e, em seguida, foram colocadas em sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C, permanecendo cinco dias (isolados em um pano escuro) no escuro e outros cinco dias em ambiente luminoso (Fotoperíodo de 16:8 h luz: escuro e intensidade luminosa de 50 µmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM[®] luz do dia). Após 10 dias, os embriões que germinaram foram transferidos para os frascos de cultura com seus devidos tratamentos (Walter, 2015).



Figura 1. Plântulas de *C. frutescens* com 10 dias, prontos para a transferência para os frascos de cultivo.

4.4. Transferência das plântulas do meio de germinação para os frascos de cultivo

As plântulas foram transferidas para frascos de cultura (65 x 125 mm), com 40 mL de meio sólido composto pela metade da concentração dos sais minerais do MS e as vitaminas de White 100 mg L⁻¹ mio-inositol, em pH 5,7 ± 0,1 e solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Vetec[®]. A esterilização do meio foi feita em autoclave por 20 minutos a 1,0 atm de pressão a 121 °C. Foram transferidas quatro plântulas por frasco. Foram testados cinco tipos de vedação e cinco concentrações de sacarose.

Assim os tratamentos foram:

- (TR) tampa rígida de polipropileno;
- (M2) tampa rígida com vedação utilizando filtros de membranas microporosas, composta por duas camadas de fita microporosa Missner[®], sendo que entre as duas camadas foi colocada uma camada da fita vedadora de PTFE (politetrafluoretileno) Amanco[®] (Saldanha et al., 2012);

- (M3) tampa rígida com vedação utilizando três camadas de fita microporosa Missner[®] e uma camada de fita veda rosca de PTFE Amanco[®] (Saldanha et al., 2012);
- (N2) tampa rígida com vedação utilizando duas camadas de fita microporosa Nexcare[®] e uma camada de fita veda rosca de PTFE Amanco[®];
- (N3) tampa rígida com vedação utilizando três camadas de fita microporosa Nexcare[®] e uma camada de fita veda rosca de PTFE Amanco[®].

Nas tampas de todos os tratamentos, exceto a TR, foram perfurados dois orifícios de 10 mm de diâmetro onde foram colocadas as membranas.

Foram utilizadas cinco concentrações de sacarose: 0, 5, 10, 15 e 20g L⁻¹.

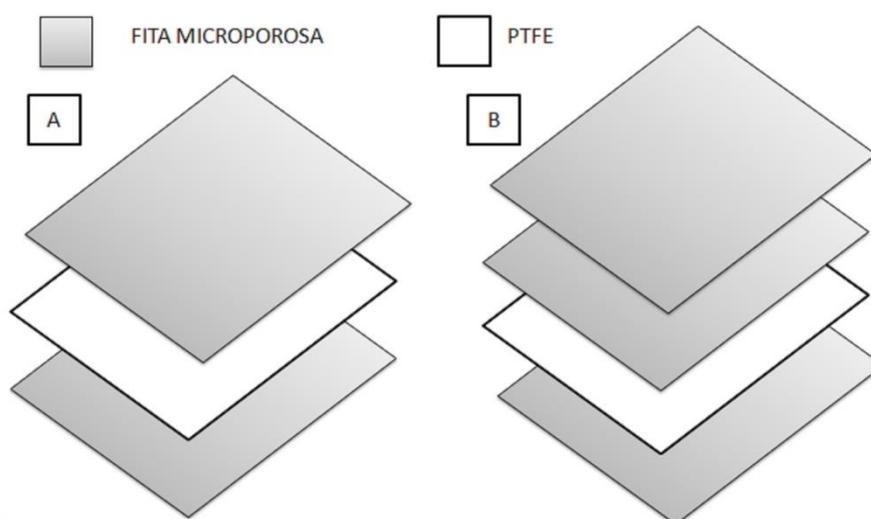


Figura 2. Modelo da confecção de membranas nas tampas dos frascos de cultivo. Membranas M2 e N2 com duas camadas de fita microporosa e uma de PTFE (A); membranas M3 e N3 com três camadas de fita microporosa e uma de PTFE (B). Adaptado de Saldanha et al., (2012).

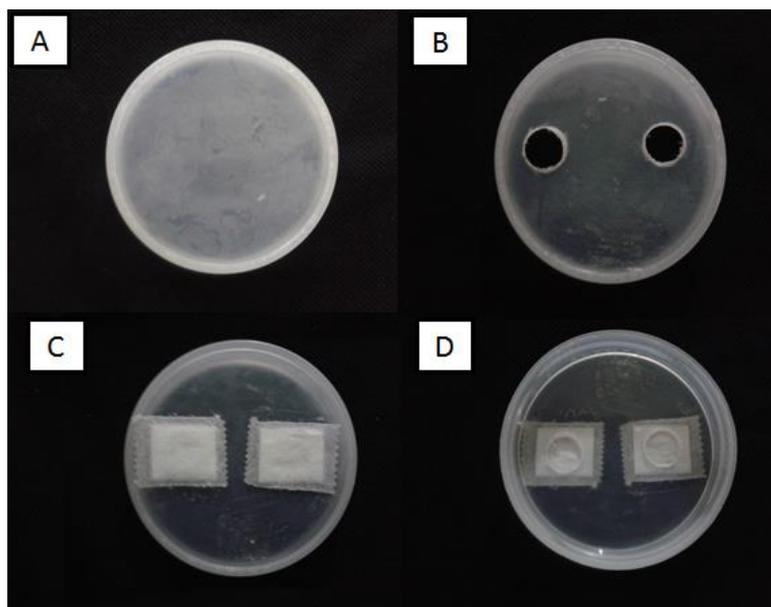


Figura 3. Diferentes tipos de vedação nas tampas dos frascos de cultivo. Tampa rígida (TR) de polipropileno (A); TR perfurada com orifícios (B); TR com membranas de filtros vista superior (C); TR com membranas com vista inferior (D).

Para saber qual membrana é a mais porosa, ou seja, que permite maior troca gasosa, inicialmente foi feito um experimento. Foram colocadas tampas com os cinco tipos de membranas em frascos com meio de cultura na ausência de explantes. Em intervalos de sete dias foi medido a massa dos frascos em balança até os 90 dias. A membrana que apresentou a menor massa foi a membrana mais porosa. Se há maior porosidade, há maior troca gasosa e a água do meio de cultura sai do frasco para a atmosfera reduzindo o volume do meio de cultura e conseqüentemente a massa do frasco. Os frascos com membranas permeáveis a gases apresentaram aumento na troca gasosa, nesta seqüência: TR<N3<M3<N2<M2 (dados não publicados).

4.5. Ambiente da sala de cultivo

Após a transferência das plântulas, os frascos foram levados para a sala de cultivo com temperatura de 27 ± 2 °C. O fotoperíodo foi de 16h de luz e 8h no escuro. A densidade de FFF foi aumentada. Foram utilizadas oito lâmpadas fluorescentes OSRAM® que simula a luz do dia, com FFF de $176 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fora

do frasco e $144 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dentro do frasco. Foi utilizado um radiômetro para essa medição. A concentração de CO_2 na sala de cultivo foi em média de $620 \mu\text{mol m}^{-2}$, medido pelo analisador de gás.

Na sala de crescimento a temperatura e a umidade relativa foram medidas pelo datalogger Kimo – Kistock KM 110[®] (Figura 4 A e B). A partir dos dados coletados, foi obtido o déficit de pressão de vapor do ar (DPV_{ar}) (Figura 4 C), por meio da equação proposta por Jones (1992).

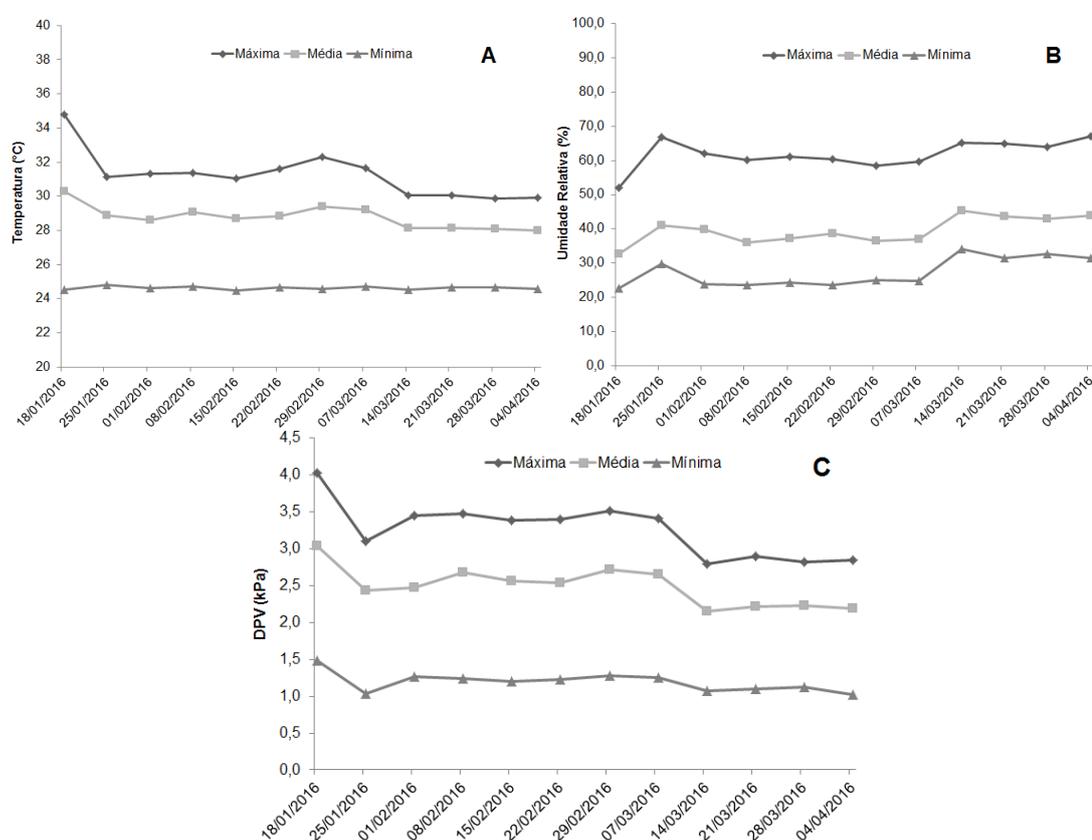


Figura 4. Gráficos das variáveis temperatura (A), umidade relativa (B) e déficit de pressão de vapor (DPV) (C) obtidos por meio dos dados coletados na sala de crescimento.

4.6. Análise do crescimento

Após 57 dias de cultivo *in vitro* foram feitas medições de área foliar; altura da planta por meio de um paquímetro digital; número de folhas; massa da matéria fresca e da matéria seca por meio de uma balança analítica. Após a determinação da área foliar tanto a parte aérea como as raízes foram colocadas em envelopes de papel para secar em estufa de ventilação forçada a 70 °C. Após 72 h, tanto a parte aérea como as raízes foram mensuradas em balança analítica.

A área foliar foi medida por meio do aparelho LI – 3100 (LICOR, Lincoln, NE, USA). O volume radicular foi medido pelo deslocamento da água em uma proveta, quando a raiz foi colocada na proveta.

4.7. Capacidade fotossintética

A capacidade fotossintética das plantas foi avaliada após 57 dias de cultivo *in vitro*. Foram feitas avaliações relacionadas à eficiência fotoquímica e as trocas gasosas.

A. Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) e Índice Fotossintético — Photosynthetic IndexII (PI)

Para a avaliação da eficiência fotoquímica, o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m) e o Índice Fotossintético (PI) ($PI = RC/ABS \times F_v/F_0 \times ET / (TR-ET)$), foram determinados na folha mais desenvolvida por meio de um fluorímetro não-modulado, modelo *Pocket PEA* Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk).

Os frascos de cultivo nessa avaliação foram colocados 20 minutos no escuro, para a adaptação dos cloroplastos no escuro, com finalidade de maior precisão dos centros de reações do fotossistema II (PSII). Para a leitura o equipamento incidiu um feixe de luz de 3500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com assistência de três diodos emissores de luz com comprimento de 650 nm.

B. Trocas Gasosas

Aos 57 dias foi medida a fotossíntese de todas as plantas dentro do frasco, ou seja, fotossíntese da planta completa.

Foi utilizado o analisador de gás infravermelho (IRGA) LI 6400 (LI – COR, Lincoln, NE, USA). Para a medição da fotossíntese foi utilizada luz artificial por meio de LED's vermelhos com uma intensidade luminosa de 500 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na altura do meio de cultura no frasco, medido por um radiômetro. O fluxo de ar foi de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de 25 °C e umidade relativa de 60%.

4.8. Intensidade de verde

A estimativa de intensidade de cor verde foi avaliada nas plantas aos 57 dias por meio do medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter (Minolta, Japão). Foram feitas três leituras em cada folha amostrada. As maiores folhas foram escolhidas para a realização das medições.

4.9. Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos às pressuposições de normalidade e de homogeneidade de variâncias dos tratamentos para que os dados fossem submetidos à análise de variância, e as médias referentes às interações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Estas análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GENES versão Windows/2004.2.1 (Cruz, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 10 dias em meio MS com ausência de sacarose, todos os embriões de *C. frutescens* germinaram e foram transferidos para os frascos com os tratamentos. Segundo a análise de variância para as variáveis de crescimento, não houve efeito do bloco. Para todas as variáveis de crescimento houve interação significativa, exceto para a matéria fresca da raiz (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para as variáveis biométricas em função dos fatores vedação e concentração de sacarose em plantas de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*.

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado médio		
		AF (cm ²)	ALT(cm)	NF
Blocos	2	5,18 ^{ns}	0,0057 ^{ns}	0,40 ^{ns}
Vedação (Ved)	4	340,72**	13,28**	18,49**
Sacarose (Sac)	4	66,76**	2,24**	4,50**
Ved x Sac	16	37,71**	2,00**	1,79*
Resíduo	48	2,46	0,072	0,77
Média Geral		13,04	4,56	7,68
CV (%)		12,03	5,89	11,46

^{ns} – Não significativo; * - significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de variação; AF – Área Foliar; ALT – Altura da Planta; NF – Número de folhas.

Tabela 1, Cont.

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		VR (cm ³)	MFPA (mg)	MFR(mg)
Blocos	2	0,005 ^{ns}	3394,73 ^{ns}	1241,95 ^{ns}
Vedação (Ved)	4	0,002 ^{ns}	113122,35 ^{**}	13218,50 ^{**}
Sacarose (Sac)	4	0,013 ^{**}	5367,41 ^{ns}	2225,65 [*]
Ved x Sac	16	0,007 ^{**}	24976,41 ^{**}	1163,88 ^{ns}
Resíduo	48	0,001	3407,23	650,15
Média Geral		0,1575	363,45	80,12
CV (%)		24,39	16,06	31,82

^{ns} – Não significativo; * - significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de variação; VR – Volume Radicular; MFPA – Massa da Matéria Fresca da Parte Aérea; MFR – Massa da Matéria Fresca da Raiz.

Tabela 1, Cont.

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio			
		MSPA(mg)	MSR(mg)	MFT(mg)	MST(mg)
Blocos	2	57,06 ^{ns}	29,74 ^{ns}	8243,89 ^{ns}	103,26 ^{ns}
Vedação (Ved)	4	2536,96 ^{**}	202,18 ^{**}	196931,95 ^{**}	3920,09 ^{**}
Sacarose (Sac)	4	81,21 ^{ns}	23,25 ^{**}	4813,87 ^{ns}	177,55 [*]
Ved x Sac	16	183,63 ^{**}	27,69 ^{**}	31912,55 ^{**}	219,5 ^{**}
Resíduo	48	57,95	2,99	4278,96	61,79
Média Geral		33,33	7,48	443,57	40,81
CV (%)		22,83	23,12	14,74	19,25

^{ns} – Não significativo; * - significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de variação; MSPA – Massa da Matéria Seca da Parte Aérea; MSR – Massa da Matéria Seca da Raiz; MFT – Massa da Matéria Fresca Total; MST – Massa da Matéria Seca Total.

Os frascos com membranas permeáveis a gases apresentaram aumento na troca gasosa, nesta sequência: TR<N3<M3<N2<M2 (dados não publicados).

A área foliar foi influenciada tanto pelo fator vedação como pelo fator sacarose, havendo significância na interação. Maior área foliar foi encontrada na vedação N2 na ausência de sacarose, não diferindo da vedação M2. Também não houve diferença entre as concentrações de sacarose de 0 e 5 g L⁻¹ com membranas N2 e M2. Na ausência de sacarose, a vedação N3 e M3 apresentaram resultados intermediários e plantas cultivadas em frascos sem membranas e sem sacarose apresentaram resultados inferiores (Tabela 2).

Tabela 2. Área foliar de plantas de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Área foliar (cm ²)					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					Médias
	0	5	10	15	20	
TR	1,7 dC	4,1cBC	1,71 cC	10,7 cA	6,7 Cb	5,0C
N3	17,5 bAB	20,4 Aa	11,9 bC	17,1 aAB	14,2 aBC	16,3A
M3	11,9 cAB	14,3 bA	13,0 abAB	11,9 bcAB	10,0 bcB	12,3B
N2	21,9 aA	21,6 aA	16,1 aB	8,6 cC	11,8 abC	16,0A
M2	19,1 abA	18,9 aA	13,3 abB	14,5 abB	12,1 abB	15,6A
Médias	14,5 ab	15,9 ^a	11,2 b	12,6 ab	11,0 b	
CV (%)	12,0					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Membranas com apenas duas camadas constituem um material mais poroso, permitindo maior frequência das trocas gasosas, enquanto membranas com três camadas (M3 e N3) de vedação são menos porosas e com isso a difusão de CO₂ para dentro do frasco é menor. A variável área foliar está relacionada com a fotossíntese da planta, quanto maior a área foliar mais CO₂ passará para o mesofilo foliar, através dos estômatos. Quanto maior a área foliar maior a taxa fotossintética. A área foliar está relacionada à fotossíntese da planta: quanto maior a área foliar maior o número de estômatos. Assim sendo, maior a difusão de CO₂ atmosférico para o mesofilo foliar e, conseqüentemente, maior a taxa fotossintética (Hazarika, 2006; Park et al., 2011).

Resultados semelhantes de área foliar foram encontrados nos estudos de Mohamed e Alsadon (2011), cultivando plantas de *Capsicum annum in vitro* em frascos com ventilação forçada de CO₂. A ventilação proporcionou aumento da área foliar quando comparada a frascos sem ventilação. As plantas dos frascos com ventilação e sem sacarose no meio de cultura apresentaram maior área foliar, semelhante ao encontrado neste trabalho.

Resultados semelhantes foram obtidos por Saldanha et al. (2012) e Iarema et al. (2012), trabalhando com membranas microporosas em plantas de ginseng *in vitro*. Estes autores observaram que plantas em frascos com membranas apresentaram maior área foliar quando comparadas com plantas em frascos sem membranas.

Frascos com tampa rígida sem membrana apresentaram os menores valores de área foliar. As concentrações de 0; 5; 10 e 20 g L⁻¹ desprovidos de membranas obtiveram as menores médias. Na concentração de 15 g L⁻¹ obteve-se o maior resultado, média muito baixa comparada aos tratamentos com membranas e sem sacarose. Semelhante aos trabalhos de Saldanha et al. (2012) e Iarema et al. (2012), plantas de ginseng cultivadas em frascos sem membranas apresentaram as menores médias comparadas com plantas em frascos com membranas. As tampas rígidas não permitem que o CO₂ atmosférico entre frequentemente para o interior dos frascos, causando oscilação nas taxas fotossintéticas e reduzida área foliar. O uso de membranas nos frascos sem ou com pouca sacarose no meio de cultivo, aumenta significativamente a área foliar de plantas de pimenta malagueta.

Aos 57 dias, plantas de pimentas em frascos com membranas eram visualmente maiores do que as plantas cultivadas em frascos sem membranas. Plantas cultivadas *in vitro* com vedação TR apresentaram crescimento reduzido. Frascos com membranas na ausência de sacarose apresentaram plantas maiores, enquanto que frasco apenas com TR sem sacarose apresentou menor altura de plântula. A maior média da altura da plântula foi encontrada no frasco com vedação M2 não diferindo das vedações N2, M3 e N3 (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Iarema et al. (2012) e Saldanha et al. (2012). O uso de membranas proporcionou maior altura em plantas de ginseng comparadas com plantas cultivadas em frasco sem membranas.

Tabela 3. Altura das plantas de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Altura (cm)					Médias
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	
TR	1,9 bC	2,5 cB	2,9 bB	3,5 bA	3,7 cA	2,9 C
N3	5,7 aA	4,6 bC	5,0 aBC	4,9 aC	5,6 aAB	5,2 A
M3	6,2 aA	5,1 abB	4,8 aB	3,9 bC	4,0 cC	4,8 B
N2	5,9 aA	5,4 aA	4,5 aB	4,7 aB	4,8 bB	5,1 A
M2	6,3 aA	5,2 abB	4,5 aC	5,3 aB	3,0 dD	4,9 B
Médias	5,2 a	4,5 b	4,3 b	4,4 b	4,2 b	
CV (%)	5,89					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Resultados semelhantes de altura das plantas foram encontrados por Shin et al. (2013), cultivando plantas de *Doritaenopsis in vitro*. O tratamento com enriquecimento de CO₂ no interior dos frascos e sem sacarose proporcionou plantas maiores comparadas com as cultivadas sem enriquecimento. O cultivo fotoautotrófico *in vitro* beneficia o crescimento do vegetal, uma vez que este é proporcionado principalmente pelas concentrações de CO₂. Yoon et al. (2009) e Xiao et al. (2011) indicam que o crescimento de plantas cultivadas *in vitro* pode ser promovido pelo aumento das concentrações de CO₂ e pelo aumento da densidade de FFF. Plantas de pimenta cultivada *in vitro* sob condições fotoautotróficas apresentam maior crescimento em altura quando comparadas com plantas em condições mixotróficas.

As plantas em concentrações de sacarose de 0 e 5 g L⁻¹ com vedação N2 apresentaram aproximadamente a mesma altura. Baixas concentrações de sacarose com membranas microporosas proporcionaram plantas mais altas comparadas com plantas em frascos com tampa rígida em altas concentrações de sacarose. As membranas ventiladas proporcionaram maior altura, aumentando a qualidade das plantas. Esse fato pode ser devido a maior troca gasosa, aumento

das concentrações de CO₂ e redução no acúmulo de etileno no interior dos frascos. Frascos com tampa rígida podem apresentar maior acúmulo de etileno e baixas concentrações de CO₂ no interior dos frascos (Rodrigues et al., 2012).

O número de folhas também foi influenciado pelos tipos de vedação e pelas concentrações de sacarose (Tabela 4). Plantas crescidas em frascos com membranas independente das concentrações de sacarose apresentaram as maiores médias. Plantas de pimentas cultivadas em frascos com tampa rígida apresentaram número reduzido de folhas em baixas concentrações de sacarose, mas essas folhas consistiam de área foliar diminuta e folhas bastante cloróticas. As folhas ficaram amareladas devido a pouca concentração de CO₂ e acúmulo de etileno no interior do frasco, mesmo com boa disponibilidade de luz.

Tabela 4. Número de folhas de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Número de folhas					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	Médias
TR	4,6 bB	6,2 bAB	5,2 bAB	6,7 aA	6,6 bAB	5,9C
N3	9,2 aA	9,2 aA	8,4 aA	7,6 aA	9,5 aA	8,8A
M3	8,1 aAB	9,3 aA	6,6 abB	7,2 aB	6,6 bB	7,6B
N2	8,3 aAB	9,0 aA	7,8 aAB	6,6 aB	7,7 abAB	7,9AB
M2	8,5 aA	9,1 aA	8,5 aA	7,4 aA	7,7 bA	8,2AB
Médias	7,7 a	8,6 a	7,3 a	7,1 a	7,6 a	
CV (%)	11,46					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare® M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner®; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner®.

O uso de vedação com membranas proporcionaram maior crescimento do vegetal em se tratando de matéria fresca da parte aérea. Maiores valores foram encontrados em plantas em frascos com membranas (Tabela 5).

Tabela 5. Massa da matéria fresca da parte aérea de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro* em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Massa da matéria fresca da parte aérea (mg)					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	Médias
TR	58,0 cB	149,0 bB	187,5 bB	348,0 abcA	354,6abA	219,5 C
N3	460,5 aA	446,9 aA	412,9 aA	468,5 aA	447,1aA	447,2 A
M3	312,6 bA	433,1 aA	378,5 aA	312,9 bcA	348,3 abA	357,1 B
N2	474,5 aA	473,6 aA	408,2 aAB	253,5 cC	327,4 abBC	387 AB
M2	424,2 abA	466,3 aA	440,6 aA	429,5 abA	268,9 bB	406 AB
Médias	346,0 a	393,8 a	365,5 a	362,5 a	349,3 a	
CV (%)	16,06					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Não houve interação entre os fatores vedação e sacarose para a variável massa da matéria fresca de raiz. Foi verificado o efeito isolado para a vedação (Figura 8 A), pois não houve efeito no fator sacarose em relação à massa da matéria fresca (Figura 8 B). As vedações N2, N3 e M2 apresentaram as maiores médias de matéria fresca de raiz: Plantas em frasco com tampa rígida apresentaram a menor média de matéria fresca de raiz.

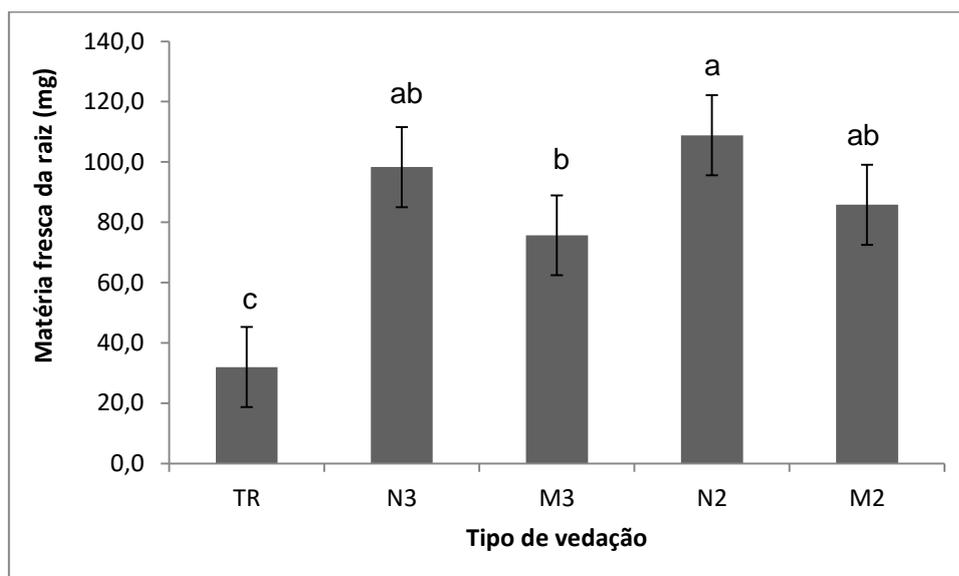


Figura 5. Massa da matéria fresca de raiz em diferentes tipos de vedação: TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare; M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com vedação utilizando duas camadas de fita microporosa Missner[®]. Letras minúsculas comparam os fatores entre si e diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os maiores valores de matéria seca da parte aérea foram encontrados em plantas em frascos com membranas microporosas independente da concentração de sacarose (Tabela 6).

Tabela 6. Massa da matéria seca da parte aérea de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Massa da matéria seca da parte aérea (mg)					Médias
	Concentrações de sacarose (g L^{-1})					
	0	5	10	15	20	
TR	5,8 cA	10,5 cA	8,4 bA	18,9 bA	13,6 cA	11,4 C
N3	28,3 bC	37,5 abABC	32,8 aBC	50,1 aAB	53,9 aA	40,5 A
M3	32,4 bA	24,2 bcA	30,3 aA	30,0 bA	38,7 abA	31,1 B
N2	38,0 abA	47,6 aA	43,8 aA	34,7 abA	43,0 abA	41,4 A
M2	50,1 aAB	50,6 aA	41,8 aAB	32,7 abB	34,5 bAB	41,9 A
Médias	30,9 a	34,1 a	31,4 a	33,0 a	36,7 a	
CV (%)	22,83					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três

camadas de fita microporosa Nexcare® M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner®; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner®.

As plantas dos frascos com tampa rígida apresentaram valores menores de matéria seca nas raízes, independente das concentrações de sacarose. As maiores médias foram encontradas em frascos com membranas, independente das concentrações de sacarose (Tabela 7). Os menores valores foram encontrados em plantas cultivadas em frascos sem membranas nos frascos, e sem ou com baixas concentrações de sacarose. Faz-se necessário a adição de sacarose no meio de cultura de frascos desprovidos de membranas para o acúmulo de matéria seca nas raízes. Quando a concentração de sacarose foi aumentada, os valores de matéria seca de raiz também aumentaram.

Tabela 7. Massa da matéria seca da raiz de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Massa da matéria seca da raiz (mg)					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					Médias
	0	5	10	15	20	
TR	1,5 cAB	0,8 dB	2,5 cAB	3,8 bAB	4,8 cA	2,7 D
N3	4,2 cB	3,5 cdB	8,6 bA	10,1 aA	9,8 bA	7,3 BC
M3	9,0 abA	5,9 bcAB	6,1 bcAB	5,9 bAB	3,5 cB	6,1 C
N2	10,3 aA	12,9 aA	13,5 aA	13,6 aA	13,6 abA	12,8 A
M2	5,1 bcC	9,2 abB	8,0 bBC	4,0 bC	15,9 aA	8,5 B
Médias	6,0 a	6,4 a	7,7 a	7,5 a	9,5 a	
CV (%)	23,12					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare® M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner®; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner®.

Os valores mais elevados, em se tratando de massa da matéria fresca total, foram encontrados em plantas cultivadas em frascos com membranas, independente da concentração de sacarose. Frascos desprovidos de membranas microporosas apresentaram os menores valores de matéria fresca total (Tabela 8).

Tabela 8. Massa da matéria fresca total de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Massa da matéria fresca total (mg)					Médias
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	
TR	67,3 cB	161,6 bB	206,2 bB	419,7 abA	402,3 bA	51,4 c
N3	562,1 aA	523,1 aA	524,4 aA	559,9 aA	558,0 aA	545,5 a
M3	365,7 bA	509,1 aA	441,1 aA	402,3 aA	445,5 abA	432,7 b
N2	583,6 aAB	599,6 aA	517,7 aAB	335,4 bC	445,0 abBC	496 ab
M2	500,83 abAB	522,5 aA	512,2 aAB	556,1 abA	366,8 bB	491 ab
Médias	415,9 a	463,2 a	440,3 a	454,7 a	443,5 a	
CV (%)	14,75					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Para a variável massa da matéria seca total, os maiores valores foram encontrados em plantas em frascos com membranas, independente das concentrações de sacarose (Tabela 9).

Tabela 9. Massa da matéria seca total de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Massa da matéria seca total (mg)					Médias
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	
TR	7,3 cA	11,3 cA	10,9 cA	22,7 cA	18,4 cA	14,1 C
N3	32,5 bB	41 bB	41,4 abB	60,2 aA	63,8 aA	47,8 A
M3	41,4 abA	30,1 bA	36,4 bA	36 bcA	42,2 bA	37,2 B
N2	48,4 abA	60,6 aA	57,4 aA	48,3 abA	56,6 abA	54,3 A
M2	55,3 aA	59,9 aA	49,8 abAB	36,8 bcB	50,4 abAB	50,4 A
Médias	37,0 b	40,6 ab	39,2 ab	40,8 ab	46,3 a	
CV (%)	19,26					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

O volume radicular das plantas em frascos com tampa rígida foi maior com o aumento nas concentrações de sacarose (Tabela 10). Plantas com vedação TR nas concentrações de 15 e 20 g L⁻¹ apresentaram as maiores médias. As plantas em frascos com vedação M2 sem sacarose apresentaram média superior às demais concentrações de sacarose.

Tabela 10. Volume radicular de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Volume radicular (cm ³)					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					Médias
	0	5	10	15	20	
TR	0,07 bB	0,09 aB	0,10 bB	0,24 aA	0,24 aA	0,15 a
N3	0,16 bAB	0,11 aB	0,19 aAB	0,18 abAB	0,23 abA	0,17 a
M3	0,15 bAB	0,12 aAB	0,11 abB	0,21 abA	0,15 abAB	0,15 a
N2	0,11 bA	0,16 aA	0,15 abA	0,12 bA	0,15 abA	0,14 a
M2	0,25 aA	0,10 aB	0,13 abB	0,18 abAB	0,15 bB	0,16 a
Médias	0,15 a	0,12 a	0,14 a	0,19 a	0,18 a	
CV (%)	24,39					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Frascos com membranas não necessitam de altas concentrações de sacarose para o aumento da matéria fresca. Concentrações de 15 e 20 g L⁻¹ com TR apresentaram os maiores resultados de matéria fresca. A ausência ou baixas concentrações de sacarose reduzem significativamente o crescimento do vegetal. Plantas em frascos sem membranas necessitam da sacarose no meio de cultura para incremento na massa da matéria fresca em pimentas.

O acúmulo de matéria seca na parte aérea está relacionado com o aumento das taxas fotossintéticas. Frascos ventilados permitem aumento das trocas gasosas e, conseqüentemente, aumento das taxas fotossintéticas e maior produção de fotoassimilados, contribuindo para o acúmulo de biomassa vegetal. O acúmulo da biomassa vegetal em pimentas cultivadas *in vitro* está relacionado com a presença de membranas permeáveis a gases, independente das

concentrações de sacarose (Kozai (1991); Xiao et al., 2011).

As plantas em frascos com membrana, que permitem maior troca gasosa, apresentaram maiores acúmulos de matéria seca nas raízes independente da concentração de sacarose. Provavelmente está relacionado com o aumento da atividade fotossintética, que resulta em maior produção de fotoassimilados (Kozai, 2010). O aumento das trocas gasosas possibilita maior crescimento *in vitro* (Couceiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2009).

O crescimento radicular foi reduzido em tratamentos sem sacarose, o que foi possivelmente um resultado de maior investimento da planta no aparato fotossintético, pois a fotossíntese se tornou o principal caminho para a absorção de carbono e produção de energia.

A matéria seca total foi menor em plantas sem sacarose em frascos com vedação TR e aumentou gradativamente com o incremento de sacarose. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Walter (2015). O uso de concentrações de sacarose de até 20 g L⁻¹ no meio de cultura proporciona aumento na matéria seca total de pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em frascos com TR.

Quando se aumenta as concentrações de sacarose independente do tipo de vedação há maior acúmulo de biomassa vegetal, mas o uso de membranas permeáveis a gases permitiram um maior incremento na biomassa vegetal das plantas de pimenta. O aumento da biomassa vegetal no cultivo *in vitro* está relacionado à incorporação de sacarose no meio de cultura e também ao aumento das trocas gasosas (Xiao et al., 2011).

Segundo a análise de variância para as variáveis fisiológicas, não houve efeito do bloco. As seguintes variáveis fisiológicas apresentaram interação significativa: taxa fotossintética líquida, relação Fv/Fm, índice fotossintético (PI) e índice de verde (Tabela 11).

Tabela 11. Resumo da análise de variância para as variáveis fisiológicas em função dos fatores de vedação e sacarose em plantas de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*.

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado médio			
		FOTO	Fv/Fm	PI	SPAD
Blocos	2	1,90107 ^{ns}	0,00278 ^{ns}	0,02195 ^{ns}	8,762 ^{ns}
Vedação (Ved)	4	1733,1448 ^{**}	0,00475 ^{**}	0,52222 ^{**}	650,35 ^{**}
Sacarose (Sac)	4	643,66892 ^{**}	0,02955 [*]	0,06259 ^{ns}	9,79 ^{ns}
Ved x Sac	16	383,02949 ^{**}	0,00091 [*]	0,05035 [*]	37,12 ^{**}
Resíduo	48	778,217	0,02937	0,02937	4,35
Média Geral		28,49	0,72	0,71	21,92
CV (%)		9,79	5,17	24,07	9,51

^{ns} – Não significativo; * - significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; ** significativo pelo teste F a 1% de probabilidade; CV (%) – Coeficiente de variação; FOTO – Taxas fotossintéticas PI – Índice Fotossintético.Fv/Fm (Rendimento Quântico Máximo do PSII) e SPAD (Índice de Verde)

Frascos com membranas que permitem trocas gasosas apresentaram as maiores taxas fotossintéticas, como esperado. A vedação M2 sem sacarose apresentou a maior taxa fotossintética para o cultivo *in vitro* de pimenta malagueta (Tabela 12), não diferindo estatisticamente das demais membranas com 5 e 10 g L⁻¹ de sacarose. Na vedação M2 com concentrações de até 15 g L⁻¹ de sacarose não houve diferença na fotossíntese. Independente das concentrações de sacarose, plantas em frascos com membranas apresentaram as maiores taxas fotossintéticas, exceto M2 com 20 g L⁻¹ de sacarose. Plantas em frascos desprovidos de membranas, as taxas fotossintéticas foram bem menores. As membranas M3 e N2 apresentaram as maiores médias nas concentrações de 5 ou 10 g L⁻¹ de sacarose.

Tabela 12. Taxa fotossintética líquida de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)					
	Concentrações de sacarose (g L^{-1})					Médias
	0	5	10	15	20	
TR	4,2 cB	6,0 bB	6,0 bB	9,7 cA	-1,8 bC	9,7C
N3	19,0 abAB	19,4 aAB	20,4 aA	11,3 cC	16,4 aB	34,7A
M3	11,6 bB	21,0 aA	17,5 aB	17,0 bB	18,3 aAB	36,1A
N2	16,3 bB	17,9 aAB	20,0 aA	5,9 dC	16,4 aB	30,7B
M2	21,5 aA	19,2 aA	20,6 aA	20,3 aA	- 3,6 bB	31,3B
Médias	30,9 ab	33,4 a	33,9 a	25,8 b	18,3 c	
CV (%)	9,89					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare® M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner®; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner®.

Tratamentos com TR, independente das concentrações de sacarose, apresentaram as menores médias. O uso de membranas que permitem as trocas gasosas no cultivo *in vitro* aumentou as taxas fotossintéticas em pimenta malagueta. Esse aumento pode ser comprovado pelo maior acúmulo de biomassa e obtenção de plantas mais vigorosas. Com o aumento das trocas gasosas há maior acúmulo de biomassa nas plantas *in vitro* (Zobayed, 2000; Kozai, 2010, Xiao et al., 2011,).

A eficiência da ventilação nos frascos de cultivo foi verificada também por Mohamed e Alsadon (2011). Plantas de pimentão cultivadas *in vitro* em frascos com ventilação de CO_2 apresentaram aumento no crescimento, maior acúmulo de matéria seca, maior taxa fotossintética, maiores concentrações de clorofila e carotenoides. Batista (2012), cultivando plantas de pimenta ornamental (*Capsicum annum* L.) em frascos com membranas ventiladas obteve resultados semelhantes: maior número de folhas e maior acúmulo de biomassa.

As plantas em frascos com vedação M2 com 20 g L^{-1} de sacarose apresentaram valores negativos, ou seja, a taxa respiratória foi maior do que a taxa fotossintética. Schmildt et al. (2014), cultivando plantas de mamão *in vitro*

observaram que aumentando as concentrações de sacarose no meio de cultura ocorria redução nas taxas fotossintéticas. Isto pode ser devido à inibição da síntese da Rubisco e das clorofilas (Aldeberg et al., 1999). Altas concentrações de sacarose inibem a síntese de clorofila em plantas cultivadas *in vitro* (Deccti, 2004).

O uso de membranas permitiu maior ventilação, aumentando as concentrações de CO₂ no interior dos frascos, proporcionando aumento na área foliar e o aumento das taxas fotossintéticas (Iarema et al., 2012; Kitaya et al., 2005).

As plantas nos frascos com tampa rígida independente da concentração de sacarose apresentaram clorose nas folhas (Figura 7). Walter (2015), trabalhando com plantas de *C. frutescens* no mesmo meio de cultura e condições ambientais, exceto pela densidade de FFF, que foi de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não observou clorose nas folhas. Como o objetivo deste trabalho foi proporcionar um ambiente que favorecesse a fotossíntese, a densidade de FFF foi elevada para 176 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Com o aumento do FFF e as tampas rígidas reduzindo as trocas gasosas e, conseqüentemente, a entrada do CO₂ atmosférico para dentro do frasco, essas plantas podem ter sofrido o fenômeno da foto-oxidação.

Segundo Walter (2015), o ideal de FFF para o cultivo de embriões do gênero *Capsicum* em frascos com tampa rígida é 50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ usando a concentração de 20 g L⁻¹ de sacarose. A clorose observada nas plantas nos frascos com tampa rígida foi devido ao aumento do FFF.

O tratamento com 20 g L⁻¹ sem membrana mostrou visualmente pouco crescimento e folhas bastante amareladas. Plantas cultivadas *in vitro* com 50 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentam características de plantas de sombra quando cultivadas no campo. As folhas apresentam coloração verde mais escura devido ao aumento das concentrações de clorofila *b*. Mas quando o FFF foi aumentado para 176 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essas plantas sofreram estresse por luz e as moléculas de clorofila foram degradadas (Faisal e Anis, 2009).

Houve redução no volume do meio de cultura nos frascos com membranas. Isto, provavelmente, foi devido à maior troca gasosa nos frascos com membranas e, conseqüentemente, maior perda de água para a atmosfera.

Até o final da fase *in vitro*, houve pouca alteração na quantidade do meio de cultura nos frascos com tampa rígida. O fato das membranas permitirem maior troca gasosa diminuiu a umidade relativa no *headspace* dos frascos, aumentando a evapotranspiração.

Plantas cultivadas em frascos com membranas não apresentaram folhas cloróticas, ou seja, folhas mais verdes, provavelmente com maior concentração de clorofila e folhas fotossinteticamente ativas. Se aumentar o FFF, o ideal é que os frascos permitam a entrada do CO₂, pois não adianta a planta receber radiação favorável se não houver concentrações adequadas de CO₂ no interior dos frascos. O aumento de FFF influencia beneficemente na etapa fotoquímica da fotossíntese, sintetizando poder redutor (NADPH) e energia (ATP), que são combustíveis para a etapa bioquímica da fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2013). Na etapa bioquímica da fotossíntese o CO₂ precisa ser difundido da atmosfera para o mesófilo foliar. Tampas rígidas usadas no cultivo *in vitro* não permitem o fluxo de CO₂ para dentro dos frascos e a etapa bioquímica da fotossíntese pode ser alterada, comprometendo o crescimento do vegetal.

Para o sucesso do cultivo *in vitro* fotoautotrófico é preciso que haja otimização da entrada de CO₂ e aumento dos FFF, simultaneamente. Resultados semelhantes foram encontrados nos experimentos de López et al., (2015), trabalhando com duas intensidades luminosas de 28 e 255 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em tampas rígidas desprovidas de membranas, com plantas de *Capsicum chinens* e Jacq. As variáveis de crescimento: altura da planta, número de folhas, área foliar, massa da matéria fresca e seca de parte aérea e raiz e concentrações de clorofila foram maiores em plantas cultivadas *in vitro* com densidade de FFF de 28 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ do que em 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em maior densidade de FFF as plantas sofreram foto-oxidação. O aumento da densidade de FFF, sem o aumento na concentração do CO₂, não resultou em maior crescimento das plantas.

A variável Fv/Fm avalia a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (PSII). Plantas que apresentam valores menores que 0,75 demonstram que o PSII pode estar danificado. Plantas com valores maiores que 0,75 apresentam um bom funcionamento do PSII, mostrando a eficiência fotoquímica dos vegetais.

Todos os frascos com membranas em concentrações de 0 e 5 g L⁻¹ apresentaram valores maiores ou iguais a 0,75, exibindo, portanto, um bom funcionamento do PSII, mostrando a eficiência das membranas na etapa fotoquímica (Tabela 13). As plantas em frascos com vedação TR, independentemente das concentrações de sacarose, manifestaram um funcionamento inadequado do aparato fotossintético. Possivelmente, essas plantas em frascos sem membranas e em altas densidades de FFF mostraram estresses no PSII. Walter (2015), cultivando pimentas do gênero *Capsicum* observou um funcionamento adequado na etapa fotoquímica, independentemente das concentrações de sacarose, porém em densidade de FFF de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, comprovando que é necessário aumentar a densidade de FFF e, simultaneamente, a ventilação nos frascos.

Tabela 13. Relação Fv/Fm de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Relação Fv/Fm					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	Médias
TR	0,63 Bab	0,66 bAB	0,59 bB	0,70 aA	0,65 cAB	0,65B
N3	0,76 aA	0,77 aA	0,73 aA	0,71 aA	0,74 abA	0,74A
M3	0,78 aA	0,77 aA	0,73 aA	0,73 aA	0,69 abcA	0,74A
N2	0,76 aA	0,77 aA	0,76 aA	0,75 aA	0,77 aA	0,76A
M2	0,76 aA	0,76 aA	0,74 aA	0,75 aA	0,65 bcB	0,73A
Médias	0,73 a	0,75 a	0,71 a	0,73 a	0,70 a	
CV (%)	5,17					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

O índice fotossintético (PI) avalia a capacidade do fotossistema II (PSII) e do fotossistema I (PSI) (Strasser et., 2000). O PI demonstrou resultados parecidos com o Fv/Fm, frascos ventilados mostraram maiores médias comparado ao TR, independente das concentrações de sacarose (Tabela 14).

Tabela 14. Índice Fotossintético de *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	Índice fotossintético (PI)					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					Médias
	0	5	10	15	20	
TR	0,33 bA	0,27 bA	0,39 bA	0,56 aA	0,36 bA	0,38B
N3	0,76 aA	0,77 aA	0,81 aA	0,58 aA	0,89 aA	0,76 ^a
M3	0,90 aA	0,77 aA	0,84 aA	0,73 aA	0,64 abA	0,78 ^a
N2	0,82 aA	0,84 aA	0,91 aA	0,92 aA	0,69 abA	0,84 ^a
M2	0,93 aA	0,92 aA	0,84 aA	0,87 aA	0,43 bB	0,80 ^a
Médias	0,75 a	0,71 a	0,76 a	0,73 a	0,60 a	
CV (%)	24,07					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare[®] M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner[®]; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare[®]; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner[®].

Os valores SPAD avaliam a intensidade de verde nas folhas dos vegetais, relacionado com as concentrações de clorofila, e quanto maior o valor, maior a concentração deste pigmento. Os valores SPAD podem, também, estar relacionados com as concentrações de clorofila, com a disponibilidade de nitrogênio e com o estresse hídrico nas plantas (Buckland et al., 1991; Torres-Neto et al., 2002).

Os maiores valores de intensidade de verde foram encontrados na vedação M2(Tabela 15). A membrana M2 é a mais porosa comparada com as membranas M3, N2 e M2. Devido a maior troca gasosa, as plantas cultivadas com membrana M2 apresentaram as maiores médias. A otimização da entrada de CO₂ no interior dos frascos, estimulam o aumento das taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, aumenta a intensidade de verde nas folhas de pimenta que está relacionada com o aumento das concentrações de clorofila. O uso de frascos com membranas porosas diminui a ocorrência de clorose e senescência das folhas. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Rodrigues et al. (2012), cultivando plantas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) *in vitro* com membranas porosas. A clorose foi presenciada em plantas com frascos desprovidos de membranas. Já as plantas em frascos com membranas porosas apresentaram, nas folhas, coloração mais verde, plantas maiores e a senescência

foliar foi reduzida.

Tabela 15. Índice de SPAD em *Capsicum frutescens*, 57 dias após a germinação *in vitro*, em função dos tipos de vedação nos frascos de cultura e das concentrações de sacarose.

Tipos Vedação	SPAD					
	Concentrações de sacarose (g L ⁻¹)					
	0	5	10	15	20	Médias
TR	8,2 cB	6,5 cB	8,3 cB	15,8 dA	13,1 bA	10,4C
N3	23,0 bA	24,4 bA	27,2 aA	17,2 cdB	25,4 aA	23,5B
M3	25,7 abA	25,4 bA	21,7 bA	21,4 bcA	22,4 aA	23,4B
N2	25,0 abAB	28,8 abA	23,6 abB	27,9 aAB	26,1 aAB	26,3A
M2	29,3 aAB	30,4 aA	25,1 abBC	23,9 abC	21,4 aC	26,1A
Médias	22,2 a	23,1 a	21,2 a	21,2 a	21,2 a	
CV (%)	9,52					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). TR – Tampa rígida de polipropileno; N3 – tampa rígida com três camadas de fita microporosa Nexcare® M3 - tampa rígida com três camadas de fita microporosa Missner®; N2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Nexcare®; M2 - tampa rígida com duas camadas de fita microporosa Missner®.

As membranas influenciaram as concentrações de clorofila. A vedação TR independente das concentrações de sacarose exibiram as menores médias do índice SPAD. Plantas em frascos sem membranas apresentaram área foliar menor e folhas mais cloróticas. Esse fato está relacionado com a baixa troca gasosa e alta densidade de FFF. Mesmo com a sacarose no meio de cultivo, plantas em frascos sem membranas apresentavam folhas mais amareladas do que plantas cultivadas em frascos com membranas. Essas plantas podem ter sofrido o fenômeno da foto-oxidação. Alta densidade de FFF e baixa concentração de CO₂ no interior dos frascos proporcionaram a degradação das moléculas de clorofila e, conseqüentemente, aumento na clorose foliar. O aumento da densidade de FFF, sem o aumento na concentração do CO₂ resulta na desestruturação do aparato fotossintético do vegetal. Resultados semelhantes foi encontrado no trabalho de López et al., (2015), quando aumentou a densidade de FFF em frascos que não permitiam troca gasosa essas plantas se tornaram cloróticas e, conseqüentemente, menor crescimento devido ao estresse causado pela luz.

6. CONCLUSÕES

As plantas de pimenta malagueta (*C. frutescens*) apresentaram maior crescimento e resposta fotossintética em frascos com membranas permeáveis a gases em baixas concentrações de sacarose, quando comparadas ao ambiente de cultivo convencional com frascos vedados e alta concentração de sacarose (mixotrófico). As membranas M2 e N2 proporcionaram maior crescimento *in vitro* e maior taxa fotossintética na concentração de 5 g L⁻¹ e na ausência de sacarose. As membranas M2 são mais porosas que as N2. Para o cultivo fotoautotrófico de pimentas *in vitro* o recomendado é o uso de membranas M2 e sem sacarose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelberg, J., Fujiwara, K., Kirdmanee, C., Kozai, T. (1999) Photoautotrophic shoot and root development for triploid melon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 95-104.
- Afrenn, F., Zobayed, S. M. A., Kozai, T. (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany*. 90:11-19.
- Alejo, N. O., Malagón, R. R. (2001) *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*.37: 701- 729.
- Alvarez, C., Saez, P., Saez, K, Sanchez - Olate, M. Rios, D. (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 110: 93-101.

- Barbosa, M. R., Silva, M.M.A., Willadino, L., Ulisses, C., Camara, T. R. (2014) Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. *Ciência Rural*. Santa Maria – RS, 44:453 – 460.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 113-123.
- Batista, D. S. (2012) *Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese in vitro de pimenteira ornamental (Capsicum annuum L.)* Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 63 p.
- Bhattacharjee, S. (2010) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield, *Science Publishers*, 30.
- Buckland, S. M., Price, A. H., Hendry, G. A. F. (1991) The role of ascorbate in drought-treated *Cochlearia atlantica* Poved. And *Armeria maritime* (Mill.) Willd. *New Phytologist*, p:155 -160.
- Buso, G.S.C., Amaral, Z.P.S., Bianchetti L.B., Machado, F.R., Ferreira, M.E. (2003) Genetic variability and phylogenetic analysis of Brazilian species of *Capsicum*. *Capsicum Eggplant Newslett.* 22:13–16.
- Carvalho, A.C.P.P., Torres, A.C., Braga, E.A.B., Lemos, E.E.P., Souza, F.V.D., Peter, J.A., Willadino, L., Câmara, T. R. (2011) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant cell culture e micropropagation*. Lavras – MG, 7:30-60.
- Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B., Ribeiro (2008) Botânica e recursos genéticos (Ed.) *Pimentas Capsicum*. *Embrapa*, Brasília: 39-54.

- Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, K.S., Paek, K.Y. (2006) Hyperhydricity in apple: physiological and ultrastructural aspects. *Tree Physiology*, 26:377– 388.
- Costa, D. A. (2012) *Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo in vitro em diferentes microambientes*. Tese (Doutorado em Botânica) – Recife – PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 82 p.
- Couceiro, M.A., Afreen,.F, Zobayed, S.M.A., Kozai, T. (2006) Enhanced growth and quality of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*L.) under photoautotrophic in vitro conditions. *In vitro Cellular and Developmental Biology*.
- Couto, T. R. (2012) *Avaliação de genótipos de abacaxizeiro cultivados in vitro e ex vitro: eficiência fotossintética, crescimento e relações hídricas*. Tese (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 132p.
- Cruz, C.D. (2006) Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG).382p.
- Cui, Y.Y., Hanh, E. J., Kozai, T., Paek, K. Y. (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 62: 219-226.
- D'Autréaux, B., Toledano, M.B. (2007) ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8:813-824.
- Debergh, P.C. (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiology Plant*, 59:270–276.

- Decetti, S.F.C. (2004) *Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de Annona glabra L.* Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 93p.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J, Paek, K.Y (2005) Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. *Plant Growth Regulation*, 46: 241–25.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J., Park, K.Y. (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in *E. milii* hyper hydric shoots. *Environmental and Experimental Botany*, 58:93–99.
- Erig, A.C., Schuch, M. W. (2005) Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. *Ciência Rural*. Santa Maria – RS, 961-965.
- Faisal, M., Anis, M. (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during *ex vitro* establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Faostat (2011) *Agriculture Data*. FAO, Rome, Italy. Available at: <http://faostat.fao.org> em: 26.03.15.
- Fernandes, D. A. (2012) *Efeito de diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro e no enraizamento ex vitro de teca (Tectona grandis l.f.)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) –Cuiabá – MT, Faculdade de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, 78p.
- Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039 -1042.

- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaria, J.M. (2005) High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlet. *Biologia Plantarum* 49:7–15.
- Fujiwara, K., Kozai, T. (1995) Physical microenvironment and its effects. Automation and environmental control in plant tissue culture. *Kluwer Academic Publishers*. 319–369.
- Hazarika, B. N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*.85: 1704-1712.
- Hazarika, B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. - *Scientia Horticulturae*. 108: 105-120.
- Hill, T. A., Ashrafi, H., Wo, R.C.S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, J.M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Deynze, A.V. (2013) Characterization of *Capsicum annuum* Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper GeneChip. *Plos One*, 8:1-16.
- Iarema, L., Cruz, A. C. F., Saldanha, C. W., Dias, L. L. C., Vieira, R. F., Oliveira, E. J., Otoni, W. C. (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.110:227 – 238.
- Ivanova, M., Van Staden, J. (2010) Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. *Plant Growth Regulation*, 60:143 – 150.
- Jones, H. G. (1992). Plant and microclimate: *A quantitativ approach to environmental plant physiology*. 2 ed. 19-46.
- Kanechi, M., Ochi, M., Abe, M., Inagaki, N., Maekawa, S. (1998) The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth,

- photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 123:176-181.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 709-725.
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gille`s, M.F., Gaspar T (1984) Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiology Plant* 61:69–74.
- Khan, S. V., Kozai, T., Nguyen, O. T., Kubota, C., Dhawan, V. (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum*. 46:161-166.
- Kitaya, Y., Ohmura, Y., Kubota, C., Kozai, T. (2005) Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 83:251–257.
- Kodym, A., Zapata-Arias, F.J. (1999) Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55:141-145.
- Kothari, S.L., Joshi, A.A., Kachhwaha, A.S., Alejo, O.A.N. (2010) Chilli pepers - A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28:35 – 48.
- Kovalchuk, I. (2010) Multiple roles of radicals in plants. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield, *Science Publishers*, 31- 44.

- Kozai, T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P. C., Zimmerman, T. H. *Micropropagation technology and application*. Kluwer Academic Publishers, 447 – 469.
- Kozai T, Fujiwara K, Kitaya Y (1996) Modelling, measurement and control in plant tissue culture. *Acta Horticulturae*, 393:63 –73.
- Kozai, T. (2010) Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. *Propagation of Ornamental Plants*.10:188–204.
- Kozai, T., Afreen, F., Zobayed S. M. A. (2005) Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. *Dordrecht Springer*, 315.
- Kozai, T., Iwanami, Y. (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*. 57:279–288.
- Kozai, T., Koyama, Y., Watanabe, I. (1988) Multiplication and rooting of potato plantlets in vitro with sugar medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae*. 230:121–127.
- Kozai, T., Kubota, C. (2001) Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *Journal of Plant Research*. 114:525–537.
- Kozai, T., Nguyen, Q. T. (2003) Photoautotrophic micropropagation of Wood and tropical plants. *Micropropagation of Wood trees and fruits*. Kluwer Academic Publishers. 757-781.

- Kubota, C., Tadokoro, N. (1999) Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 35: 296-298.
- LEE, J.J.; CROSBY, K.M.; PIKE, L.M.; YOO, K.S.; LESKOVAR, D.I. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Scientia Horticulturae*, v.106, p.341-352, 2005.
- Lees, R. P., Evans, E. H., Nicholas, J. R. (1991) Photosynthesis in clematis, 'The President', during growth *in vitro* and subsequent *in vivo* acclimatization. *Journal of Experimental Botany*. 42:605-610.
- Liao, F., Wang, B., Zhang, M., Xu, F., Lian F (2007) Response to sucrose free culture and diffusive ventilation of plantlets in vitro of *Gerbera jamesonii* and photoautotrophic growth potential. *Acta Horticulturae* 764:257–264.
- Lopes, C. A., Ribeiro, C. S. C., Cruz, D. M. R., Reifschneider, F. J. B., França, F. H., Henz, G. P., Silva, H. R. – (2007) Pimenta (*Capsicum* spp.) Embrapa Hortaliças: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/autores.html em 27/12/14.
- López, A. B., Paz, A. R., Trejo, C., Rangel, E.E., De La O, J.L.R. (2015) Improved in vitro rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. Plantlets. *In vitro cellular e developmetal biology – Plant. England*, 51:274 – 283.
- López, P.G., Canto, F. A, Barredo, P.F., Zapata, C. P., Montalvo P.M.C., Barahona, P.F., Santana, B.N., Iglesias, A.L. (2006) Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience* 41:1645–1650.

- López, P., Gorzalczany, S., Acevedo, C., Alonso, R., Ferraro, G. (2012) Chemical study and anti-inflammatory activity of *Capsicum chacoense* and *C. baccatum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22:455 - 458.
- Lucchesini, M., Mensuali-Sodi, A., Massai, R., Gucci, R. (2006) Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured in vitro under different aeration. *Biology Plantarum*, 44:167–174.
- Macedo, A.F., Costa, M.V.L., Tavares, E.S., Lage, C.L.S., Esquibel, M.A. (2011) The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environmental and Experimental Botany*, 70:43–50.
- Majada, J.P., Fal, M.A., Sanchez-Tames, R. (1997) The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33:62–69.
- Makunga, N.P., Jager, A.K., Van, Staden. J. (2006) Improved in vitro rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsiagarganica* L. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 86:77– 86.
- Moscone, E. A., Scaldaferrro, M. A., Grabiele, M., Cecchini, N. M., García, Y. S., Jarret, R., Daviña, J. R., Ducasse, D. A., Barboza, G. E., Ehrendorfer, F. (2007) The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum* – *Solanaceae*): a Cytogenetic Perspective. VI *the International Solanaceae Conference*, Eds.: D.M. Spooner et al., *Acta Horticulturae*. 745: 137-169.
- Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A. (2011) Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annum*. *Biologia Plantarum*. 2: 370 -374.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-47.

- Nascimento, K. O., Vicente, J., Saldanha, T., Barbosa Júnior, J. L., Barbosa, M. I. M. J. (2012) Caracterização química e informação nutricional de geleia de pimenta Cambuci orgânica (*Capsicum baccatum* L.). *Revista Verde*. 7:283-288.
- Nguyen, Q. T., Kozai, T. (1998). Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environmental Control in Biology*.36: 59-75.
- Nguyen, Q. T., Kozai, T. (2005) Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai, T., Afreen, F., Zobayed, S. M. A. (eds) *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system*. Dodrecht: Springer, 123–146.
- Park, S.Y., Moon, H.K., Murthy, H.N., Kim, Y.W. (2011) Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biologia Plantarum*, 55:559–562.
- Pinheiro, M. V. M., Martins, F. B., Xavier, A., Otoni, W. C. (2013) Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*olea europaea* L.). *Revista Árvore*, Viçosa – MG, 19-29.
- Pospisilova, J., Solarova, J., Catsky, J., Ondrej, M., Opatrny, Z. (1988) The photosynthetic characteristics during the micropropagation of tobacco and potato plants. *Photosynthetica*, 22:205-213.
- Prakash, S., Hoque, M.I., Brinks, T. (2004) Culture media and containers. Low costs options for tissue culture technology in developing countries. Internacional Atomic Energy Agency. *Austria*, 29-40.
- Reifschneider, F. J. B. (2000) *Capsicum*: Pimentas e pimentões no Brasil. *Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia*. Embrapa, Brasília - DF. 113p.

- Rodríguez, R., Cid, M., Pina, D., Gonzalez - Olmedo, J. L., Desjardins, Y. (2003) Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39: 657– 662.
- Rodrigues, M., Costa, T. H. F., Festucci – Buselli, R. A., Silva, L. C., Otoni, W. C. (2012) Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 48:67-72.
- Ribeiro, A.P.O., Picoli, E.A.T., Lani, E.R.G., Vendrame, W.A., Otoni, W.C. (2009) The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology*.
- Ribeiro, C. S. C., Lopes, C. A., Carvalho, S. I. C., Henz, G. P., Reifschneider. (2008) *Pimentas Capsicum*. EMBRAPA, Brasília – DF. 10.
- 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. 55-69.
- Rufino, J. L. S., Penteado, D. C. S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário*, 27: 7-15.
- Saldanha, C. W., Otoni, C, G., Azevedo, J. L. F., Dias, L. L. C., Rêgo, M. M., Otoni, W. C. (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 110:413–422.
- Sha Valli Khan, P.S., Kozai, T., Nguyen, Q.T., Kubota, C., Dhawan, V. (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum* 46:161–166.

- Shim, S. W., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2003) *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57-62.
- Shin, K.S., Park, S.O., Paek, K.Y. (2013) Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 10.
- Silva, A. B., Pasqual, M., Castro, E. M., Miyata, L, Y., Melo, L.A; Braga, F. T. (2008) Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro. *Interciencia*, Caracas, v. 33, n. 11, p. 839-843.
- Skrebsky, E. C., Nicoloso, F. T., Ferrão, G. E. (2004) Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimação *ex vitro* de gengibre brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural*. 34:1471-1477.
- Schmidt, O., Torres Neto, A., Schmidt, E. R., Carvalho, V. C., Otoni, W. C., Campostrini, E. (2014) Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*.
- Smith, M.A.L., Spomer, L.A. (1995) Vessels, gels, liquid media, and support systems. Automation and environmental control in plant tissue culture. *Kluwer, Dordrecht*, p: 371– 404.
- Sousa, M.C. (2016) *Qualidade de mudas de laranjeira 'pêra' interenxertadas por tecidos de plântulas nucelares sobre o portaenxerto 'flying dragon'*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 88p.

- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: *Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.). Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, p 445-483.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013) *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p.
- Tanaka, K., Fujiwara, K., Kozai, T. (1992) Effects of relative humidity in culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets in vitro. *Acta Horticulturae*, 319:59–64.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*.
- Triantaphylides, C., Havaux, M. (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science*, 219-229.
- Van Huylbroeck, J.M. (1994) Influence of light stress during the acclimatization of in vitro plantlets. Plant production on threshold of a new century. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht- Boston-London, 451–453.
- Van Huylbroeck, J.M., Piqueras, A., Debergh, P.C (2000) The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science*, 155:59–66.
- Walter, R. (2015) *Resgate de embriões zigóticos de espécies do gênero capsicum visando sua utilização em programas de melhoramento genético*. Tese (Mestrado Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 67p.

- Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.
- Xiao, Y., Kozai, T. (2006) In vitro multiplication of static plantlets using sugar-free media. *Scientia Horticulturae* 109:71–77.
- Xiao, Y., Lok, Y., Kozai, T. (2003) Photoautotrophic growth of sugarcane in vitro as affected by photosynthetic photon flux and vessel air exchanges. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 39:186–192.
- Xiao, Y., Niu, G., Kozai, T. (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105: 149-158.
- Yoon, Y.J., Mobin, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2009) Impact of in vitro CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to ex vitro conditions. *Environmental and Experimental Botany* 65:183–188.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009) Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Horticultural Science* 44:757-763.
- Zobayed, S. M. A. (2006) Aeration in plant tissue culture. In: Dutta Gupta S, Ibaraki Y (eds) *Plant tissue culture engineering*. *Dordrecht: Springer*, p. 313–327.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kubota, C., Kozai, T. (1999) Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology –Plant*, 35:183–188.

Zobayed, S. M. A. (2000) In vitro propagation of Lagerstroemia spp. From nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. *Environmental Control in Biology*. 38: 1–11.

Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Kozai, T. (2001) Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown hotoautotrophically in a scaled-up vessel. *In vitro Cellular and Development Developmental Biology*.

8. APÊNDICE

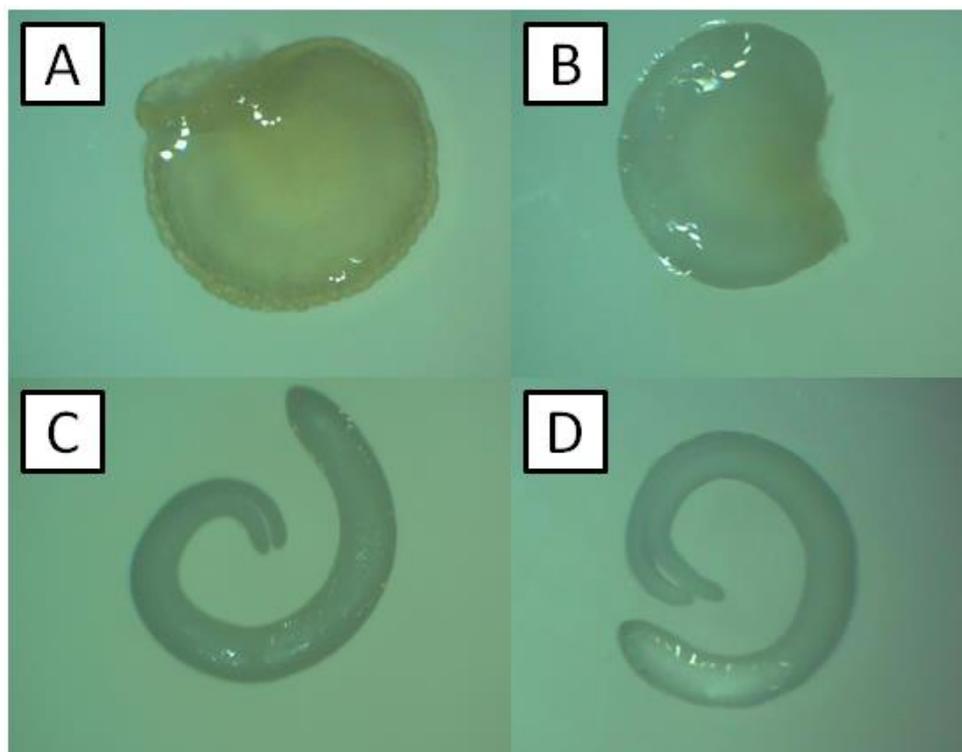


Figura 1 A. Sementes fisiologicamente maduras de *Capsicum frutescens*. (A) Semente intacta; (B) Semente sem tegumento; (C,D) Embrião isolado.

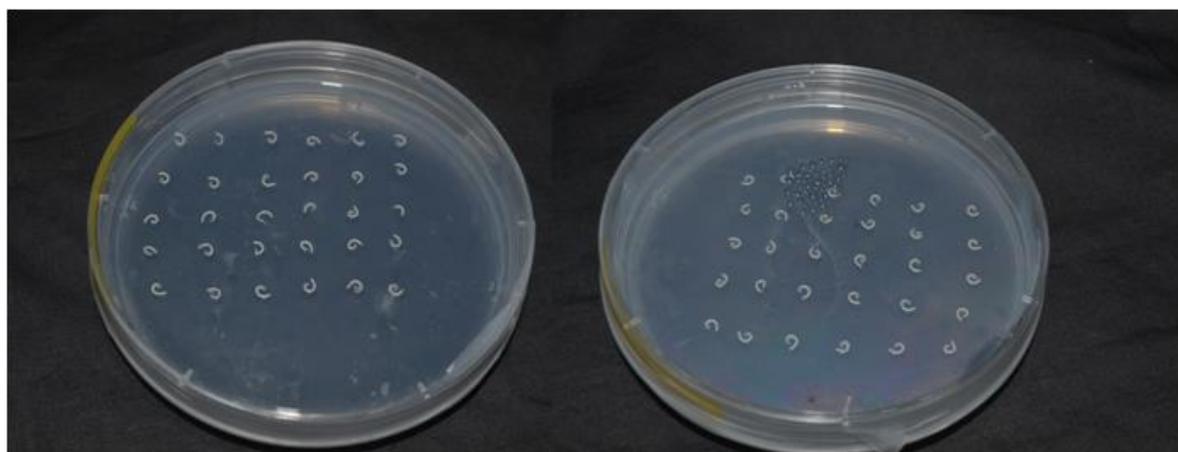


Figura 2 A. Embriões de *Capsicum frutescens* após excisão, colocado sem placas de Petri, com meio MS para germinação.

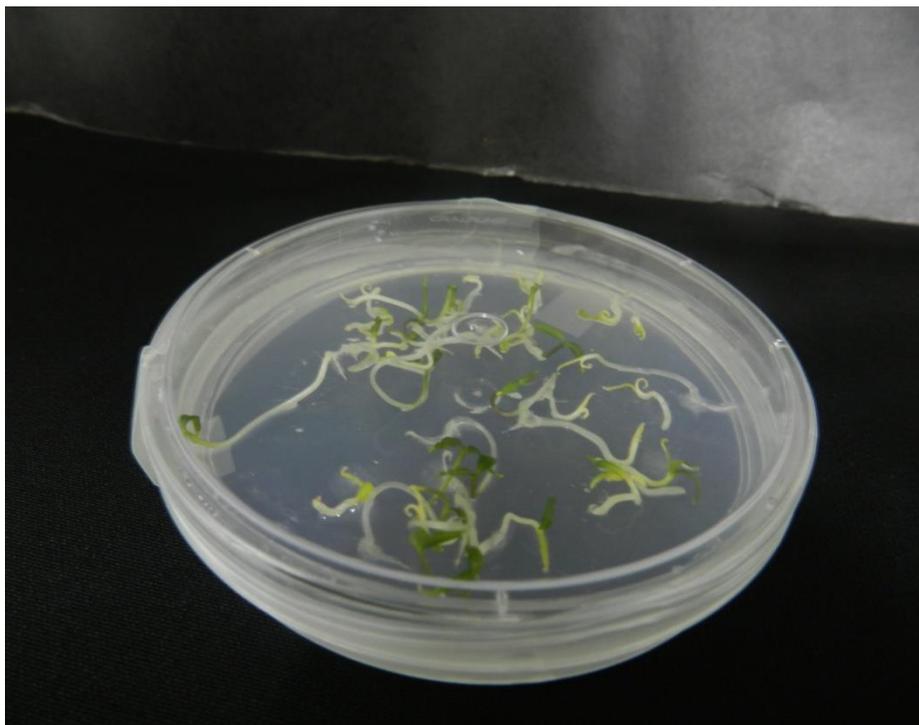


Figura 3 A. Embriões *Capsicum frutescens* germinados com 10 dias de idade.



Figura 4 A. Transferência dos embriões de *Capsicum frutescens* para os frascos com diferentes tipos de vedação.



Figura 5 A. Transferência dos embriões *Capsicum frutescens* para os frascos com diferentes tipos de vedação.

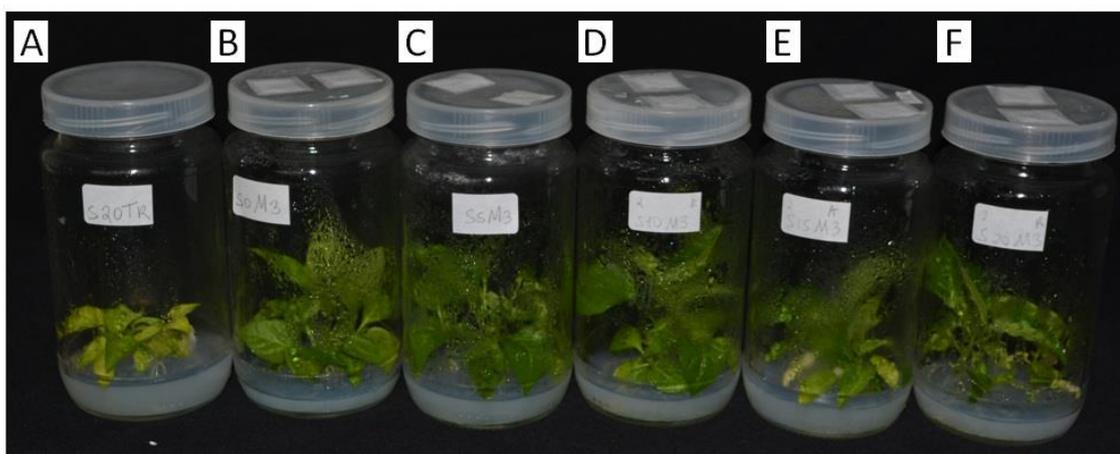


Figura 6 A. Plantas de *Capsicum frutescens* cultivadas *in vitro* com 57 dias de idade. (A) frasco com vedação TR com 20 g L^{-1} de sacarose; (B) frasco com vedação M3 sem sacarose; (C) frasco com vedação M3 com 5 g L^{-1} de sacarose; (D) frasco com vedação M3 com 10 g L^{-1} de sacarose; (E) frasco com vedação M3 com 15 g L^{-1} de sacarose; (F) frasco com vedação M3 com 20 g L^{-1} de sacarose.

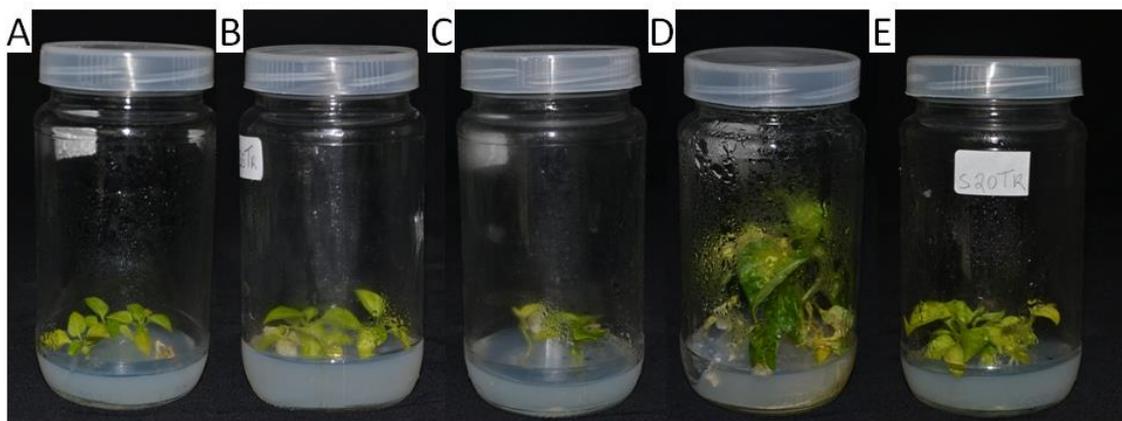


Figura 7A. Plantas de *Capsicum frutescens in vitro* com 57 dias de idade. (A) frasco com vedação TR sem sacarose; (B) frasco com vedação TR com 5 g L⁻¹ de sacarose; (C) frasco com vedação TR com 10 g L⁻¹ de sacarose; (D) frasco com vedação TR com 15 g L⁻¹ de sacarose; (E) frasco com vedação TR com 20 g L⁻¹ de sacarose.



Figura 8 A. Avaliação das taxas fotossintéticas de *Capsicum frutescens in vitro* com 57 dias de idade.