



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**INDUÇÃO E PADRÃO DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS DE
Capsicum annuum CV. PIMENTÃO AMARELO**

PRICIANNY GALDINO DE SOUZA

Porto Velho-RO
2016



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE**

**INDUÇÃO E PADRÃO DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS DE
Capsicum annuum CV. PIMENTÃO AMARELO**

PRICIANNY GALDINO DE SOUZA

Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade para a obtenção de Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Souza, Pricianny Galdino de.

S7293i

Indução e padrão de crescimento de calos friáveis de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo. / Pricianny Galdino de Souza. Porto Velho / RO, 2016.
40 fls.

Orientador: Prof. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)–
Fundação Universidade Federal de Rondônia.

1.Solanaceae. 2.Calos friáveis – *Capsicum annuum*. 3.Pimentão Amarelo.I.Santos,
Maurício Reginaldo Alves dos. II.Título

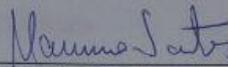
CDU 582.926.2

Bibliotecária responsável: Rejane Sales – CRB 11/903

PRICIANNY GALDINO DE SOUZA

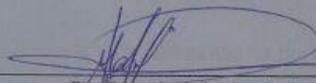
**INDUÇÃO E PADRÃO DE CRESCIMENTO DE CALOS FRIÁVEIS DE
Capsicum annuum CV. PIMENTÃO AMARELO**

Comissão Examinadora



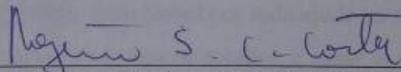
Dr. Mauricio Reginaldo Alves dos Santos
Orientador

Embrapa Rondônia; Fundação Universidade Federal de Rondônia



Dr. Vanderlei Maniesi
Membro

Fundação Universidade Federal de Rondônia



Dr. Rogério Sebastião Correa da Costa
Membro
Embrapa Rondônia

Dr. Arthur de Souza Moret
Suplente

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 13 de setembro de 2016.

Resultado: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos.

Agradeço ao meu pai Pedro Galdino Rodrigues pelo apoio aos estudos.

A minha mãe Cléris Lúcia de Souza por todo amor, afeto, paciência, compreensão em todos os momentos da minha vida. Por me ensinar o valor dos estudos, por cuidar de mim, por ser uma mulher forte e guerreira que foi capaz de mover céu e terra para dar base aos filhos. Uma mulher digna da qual tem toda a minha admiração.

Ao meu irmão Perciley Souza e minha irmã Perla Souza pelo cuidado e apoio durante toda a minha trajetória de vida.

As minhas sobrinhas Natália Guimarães Galdino e Ariadne Stephany Souza pelos sorrisos e gargalhadas que me fizeram dar em dias difíceis.

Ao meu namorado Djo Miran, pelos cuidados e “mimos”, pelos abraços e carinho, pela paciência, calma e amor.

A Glaura Mugrabe que durante o mestrado se mostrou uma grande amiga, na qual quero sempre ter ao meu lado.

A Eloísa Paz, pela amizade, pela ajuda e ensinamento na parte experimental do meu trabalho.

Ao meu orientador de graduação Renato Abreu, que me incentivou a fazer o mestrado.

A todos os meus colegas da turma 2015/2 do mestrado, sempre unidos.

Aos professores do Programa de Pós Graduação Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente –PGDRA/UNIR, e a senhora secretária dona Izabel por toda ajuda na parte burocrática.

Ao Dr. Maurício Reginaldo, por aceitar ser meu orientador, e sanar as minhas dúvidas.

A Embrapa-RO pela oportunidade de estágio no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, dando todo suporte e infraestrutura para a realização do trabalho experimental.

A Capes pelo apoio financeiro através da bolsa de estudo concedida.

RESUMO

No Brasil, o gênero *Capsicum* possui 32 espécies e tem sido estudado amplamente, pois é de interesse nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A espécie *Capsicum annuum* possui diversos metabólitos secundários, dentre eles os capsaicinóides, os princípios ativos mais conhecidos, usados principalmente em condimentos alimentares devido à sua pungência, e na medicina popular por possuir ação antireumática, anestésica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, e para problemas intestinais. Métodos de cultura de tecidos vegetais têm sido utilizados para a produção *in vitro* em larga escala de metabólitos secundários, de forma padronizada, uniforme e sem influência de fatores ambientais bióticos ou abióticos. O objetivo deste trabalho foi induzir calos a partir de explantes foliares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo, e estudar o padrão de crescimento destes calos, com foco na fase de desaceleração, quando os calos devem ser subcultivados para o estabelecimento de suspensões celulares. Os explantes foram inoculados em meio Murashige & Skoog (MS) suplementado com os reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (benzilaminopurina) (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) em combinações fatoriais. O meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP resultou na máxima porcentagem de indução de calos, em 100% dos explantes, e no maior peso fresco de calos, 2,125 mg. A curva de crescimento dos calos desta cultivar apresenta um padrão sigmoide, com seis fases distintas, sendo que a fase de desaceleração teve início após 21 dias após a inoculação. Por meio deste protocolo é possível o estabelecimento de suspensões celulares desta variedade, visando à produção de metabólitos secundários *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Solanaceae, princípios ativos, calos.

ABSTRACT

In Brazil, the *Capsicum* genus has 32 species and has been widely studied as it is of interest in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. The species *Capsicum annuum* has many secondary metabolites, including the capsaicinoids, the most known active principles, mainly used in food flavorings due to their pungency, and in folk medicine for having anti rheumatic, anesthetic, antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities, and for intestinal problems. Plant tissue culture methods have been used for in vitro large-scale production of secondary metabolites, in a standardized and uniform manner, without influence of biotic or abiotic environmental factors. The aim of this study was to induce callus in leaf explants of *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo, and to study the growth pattern of these calluses, focusing on the deceleration phase, when the calluses should be subcultured to establish cell suspensions. The explants were inoculated on Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with the growth regulators 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (0; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹) and BA (benzylaminopurine) (0; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L⁻¹) in factorial combinations. The culture medium supplemented with 1,0 mg L⁻¹ 2,4-D and 1,0 mg L⁻¹ BA resulted in the highest percentage of friable callus induction, in 100% of the explants, and the highest fresh weight of callus, 2,125 mg. The growth curve of calluses of this cultivar has a sigmoid pattern, with six distinct phases and the deceleration phase begins 21 days after inoculation. Through this protocol it is possible to establish cell suspensions of this variety, aiming at the in vitro production of secondary metabolites.

KEYWORDS : Solanaceae, active principles, callus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crescimento de calos de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo cultivados em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP durante 42 dias de cultivo. 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 42 dias de cultivo. 24

Tabela 2. Médias do peso da massa fresca (mg) de calos em explantes de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0; 1,0; 2,0; e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e BAP (0; 1,0; 2,0; e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$), após 42 dias de cultivo. 25

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido Alfa- Naftalenoacético
KIN	Cinetina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
v/v	Volume por volume
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
MS	Murashige & Skoog
pH	Potencial de Hidrogênio
mg L ⁻¹	Miligrama por Litro
g L ⁻¹	Gramas por Litro
mL	Mililitro
μM	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
1. OBJETIVOS	11
1.1 GERAL	11
1.2 ESPECÍFICOS	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	12
2.2 <i>Capsicum annuum</i> (SOLANACEAE)	13
2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	15
2.3.1 Reguladores de Crescimento	16
2.3.2 Calogênese	17
2.3.3 Curva de Crescimento de Células de Calo	18
2.4 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 INDUÇÃO DE CALOS	21
3.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 INDUÇÃO DE CALOS	23
4.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS	26
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE	40

INTRODUÇÃO

Está sendo desenvolvido um projeto na Embrapa Rondônia que visa buscar meios que possam diminuir o uso de agrotóxicos na agricultura e pecuária. Rondônia tem papel importante na exportação de carne bovina, elevando assim a economia do estado, sendo de grande importância econômica. Porém, doenças parasitárias que atacam bovinos são causadores de prejuízos. Todos os anos o agronegócio tem grandes gastos com perdas de animais doentes, ou gastos para prevenir as doenças. O grande problema é que para proteger o gado de doenças, são usados agroquímicos, criando assim um ciclo de transtornos, principalmente ambiental. Por isso faz-se importante os estímulos a pesquisas científicas que visem à substituição de agroquímicos por produtos naturais, conseqüentemente diminuindo os impactos ambientais. Além da pecuária, Rondônia tem um importante papel na agricultura sendo produtor e exportador de café, arroz, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, soja, e não diferente da pecuária a agricultura passa transtornos nas plantações com ataques de pragas e doenças acarretando prejuízos ao final da safra. Defensivos agrícolas biológicos já são usados em grandes plantações, porém, seu uso ainda é menor do que o uso de agroquímicos. Várias espécies de plantas são descritas na literatura como tendo princípios ativos capazes de proteger as plantações de pragas e doenças. De acordo com a sabedoria popular, extratos de pimentas do gênero *Capsicum* são usados contra lagartas, pulgões, ácaros, fungos, brocas, cochonilhas, formigas, percevejos, entre outros.

O presente estudo visa estabelecer a indução e o padrão de crescimento de calos friáveis de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo, a partir de explantes foliares inoculados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Esse trabalho serve de base para futuras pesquisas que tenham como objetivo a suspensão celular, a identificação de metabólitos secundários e posteriormente a descrição dos princípios ativos.

Espera-se que o trabalho venha a contribuir nos sistemas de agricultura e pecuária, minimizando os impactos ambientais, beneficiando assim a quem faz o uso da agropecuária direta e indiretamente.

As tecnologias aplicadas da cultura de tecidos vegetais permitem prever uma fase de desenvolvimento acelerado para as tecnologias baseadas em procedimentos que têm como base a diversidade biológica, e utilizando espécies de plantas da Amazônia como matéria prima.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Estabelecer um protocolo para o estabelecimento de suspensões celulares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo.

1.2 ESPECÍFICOS

1. Estabelecer protocolos para indução de calos em explantes foliares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo em meio de cultivo suplementado com reguladores de crescimento em diferentes concentrações;
2. Definir a curva de crescimento de calos induzidos em segmentos foliares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo, objetivando a identificação das fases de crescimento, com foco na fase de desaceleração.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (CROTEAU et al., 2000; PINTO et al., 2002; VIZZOTO et al., 2010).

As plantas produzem substâncias provenientes dos metabolismos primário e secundário. O metabolismo primário fornece as substâncias envolvidas nas funções básicas essenciais da vida celular – respiração e biossíntese de aminoácidos e outras substâncias necessárias para a vida da célula (BRAZ FILHO, 2010).

Os metabólitos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (FUMAGALI et al., 2008; LI et al., 1993).

Os metabólitos secundários são específicos das espécies e participam das interações intra e intercelulares do próprio organismo ou com células de outros organismos; atuam em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes vivos deste processo ou contribuem para a resistência dos organismos pela defesa contra pestes e outras doenças e estabelecendo a competência para a guerra química dos ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental. Assim, por exemplo, o metabolismo primário assume importância no crescimento e rendimento agrícola e o metabolismo secundário contribui com os aromas, as cores dos alimentos e com a resistência contra pestes e doenças, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis (BRAZ FILHO, 2010).

Os estudos dos metabólitos secundários de plantas se desenvolveram aceleradamente nos últimos 50 anos. Estes compostos são conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes e também representam uma fonte importante de substâncias farmacologicamente ativas. As técnicas de cultura de células de

plantas iniciaram-se na década de 1960 como uma possível ferramenta para estudar e produzir os metabólitos secundários de plantas. O uso de cultura de células de planta para a produção de substâncias de interesse contribuiu grandemente para avanços em diversas áreas da fisiologia e bioquímica vegetal. Diferentes estratégias, usando sistemas de cultura *in vitro*, foram estudadas com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos secundários (FUMAGALI et al., 2008).

Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA & CARDOSO; 2012; SIMÕES et al., 2007).

2.2 *Capsicum annuum* (SOLANACEAE)

O Brasil é o segundo maior produtor de pimentas no mundo e um centro de diversidade de *Capsicum*, com o maior número de espécies do gênero, pelo menos 32 espécies, das quais somente cinco são amplamente cultivadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008; MIRANDA, 2014).

Algumas espécies, como a *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, apresentam crescimento herbáceo, e pimentas selvagens como *C. eximium*, desenvolvem-se em árvores, apresentando formas tanto arbustivas como em tronco (MARTINS, 2015; MOSCONE et al., 2007). As diferentes espécies e variedades de pimentas podem ser discriminadas por características morfológicas, visualizadas principalmente nas flores, e também nos frutos (CARVALHO et al., 2003; NEITZKE, 2012). As flores são bastante semelhantes entre si, mas os frutos apresentam grande diversidade genética em termos de cores, tamanhos, formatos, composição química e grau de pungência ou picância (BORGES et al., 2015; CHUAH et al., 2008; HEISER, 1979; NASCIMENTO, 2014).

De acordo com o sistema de taxonomia vegetal a classificação de plantas do gênero *Capsicum* estão incluídas no Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Solanales, Família Solanaceae, Subfamília Solanoideae, Tribo Solaneae, Subtribo Capsicinae, e Gênero *Capsicum*. Representando-as, encontra-se um grupo de plantas não-pungentes, os pimentões, e um grupo de plantas pungentes, as pimentas (APG II, 2003; HUNZIKER, 2001; MARTINS, 2015).

Os frutos de pimenta, além de atrativos, possuem odor, paladar agradável e composição química diversificada, sendo ricos em vitaminas A, C e antioxidantes. A pungência da pimenta é a principal característica e está relacionada ao acúmulo de metabólitos secundários denominados capsaicinóides, encontrados apenas no gênero *Capsicum*. De acordo com o nível de pungência, as pimentas são destinadas a produção de diferentes produtos, tais como molhos, conservas, pimentas desidratadas, páprica e óleorresinas (LUTZ e FREITAS, 2008; MIRANDA, 2014).

O gênero *Capsicum* pode ser associado à medicina tradicional humana, no combate de enfermidades em criações domésticas. Entretanto, é mais fortemente relacionado a produtos condimentares, devido aos alcaloides (capsaicinóides) contidos em seus frutos. Além disso, as pimentas deste gênero também são excelentes fontes de β -caroteno, vitaminas A e C (BARBOSA et al., 2002; LINHARES et al., 2014).

A espécie *C. annuum* é a mais cultivada, não somente no Brasil, mas no mundo todo. É representada pelos pimentões e pimentas de consumo fresco ou *in natura* (MARTINS, 2015; SOUSA, 2012). No Brasil, é a espécie com maior importância econômica e mais cultivada. Inclui cultivares de polinização aberta, híbridos de pimentões doces, pimentas doces para páprica, pimenta-americana, e as pimentas picantes jalapeño e cayene, entre outras, além de cultivares ornamentais (RIBEIRO e REIFSCHNEIDER, 2008).

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas pelo mundo, sendo utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (BENTO et al., 2007; SIGNORINI et al., 2013).

Nos últimos anos, o pimentão (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) tem se destacado como uma das hortaliças mais importante do país. Entre as solanáceas, é a terceira mais cultivada, sendo superada apenas pelo tomate e pela batata. As mudanças nos sistemas de cultivo, como a utilização, pelos agricultores, de cultivares mais adaptadas (especialmente híbridos), mais produtivas e com resistência e ou tolerância a um número cada vez maior de doenças, são tidas como alguns dos principais fatores do aumento da área plantada e da produtividade (NASCIMENTO, 2005). É a espécie de *Capsicum* que apresenta a mais ampla variação em tamanho, cor e formato de frutos (HERNÁNDEZ-VERDUGO et al., 2001).

Essa hortaliça está difundida em todas as regiões do Brasil, sendo que as principais áreas de cultivo são as regiões Sudeste e Centro-Oeste. São comercializadas para o consumo *in natura*, conservas caseiras e exportação do produto industrializado (COSTA et al., 2010; MARTINS, 2015; NASCIMENTO et al., 2012; SOUZA et al., 2011).

2.3 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Entende-se por cultura de tecidos vegetais o conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais (explantes) em meio nutritivo sintético, de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como a luz, temperatura, O₂ e CO₂, para gerar uma planta (QUISEN e ANGELO, 2008).

A aplicação de técnicas de cultura de tecidos pode resolver ou minimizar problemas através da multiplicação sistematizada de plantas; intercâmbio de material genético; resgate de germoplasma e preservação de material ameaçado; redução no período de germinação; isenção de pragas e doenças e; uniformização nas plântulas obtidas (MELO, 2000). O aumento de interesse das técnicas de cultura de tecido de plantas está documentada na literatura recente, abrangendo os mais variados aspectos da agricultura, horticultura, florestas e da indústria farmacêutica (CAPALDI, 2002; POCHET et al., 1991)

Os meios utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

As técnicas consistem em selecionar explantes, desinfestá-los e cultivá-los em meio nutritivo mantido sob condições assépticas, sendo multiplicação dos propágulos feitas através de sucessivos subcultivos em meio próprio (AMARAL e SILVA, 2003). Explantes são fragmentos retirados dos tecidos das plantas utilizados para iniciar uma cultura de tecido ou célula vegetal (VALLE, 2003). Contaminações que ocorrem frequentemente em culturas de tecidos vegetais podem ser consequência não da ineficiência da técnica ou descuido do manipulador, mas sim da presença de microrganismos endofíticos. É certo que muitas culturas vegetais derivadas de pequenos segmentos da planta resultam em plantas axênicas, isto é, sem microrganismos prejudiciais, como vírus, e podem ter sua produção melhorada posteriormente em campo (AZEVEDO, 1998).

As técnicas de cultura de tecidos envolvem plantas medicinais, com ênfase na micropropagação, cujos protocolos permitem estabelecer padrões para a multiplicação massal de várias espécies. Para a técnica envolvendo a multiplicação *in vitro*, a capacidade dos explantes sobreviverem, desenvolverem e se multiplicarem é consequência de vários fatores, como o genético, o estado fisiológico e as concentrações endógenas de hormônios nos explantes e as condições ambientais de cultivo. Além disso, essa ferramenta biotecnológica permite a produção de metabólitos secundários *in vitro*, assegurando, assim, formas

alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados (KOZAY et al., 1997; MORAES et al., 2012).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais, o método de suspensão celular é usado para o cultivo em larga escala de células vegetais, a partir das quais metabólitos secundários são extraídos. A vantagem desse método é fornecer uma fonte contínua e segura de produtos naturais, os quais podem ser produzidos de formas semelhantes ou superiores aos das plantas inteiras (VANISREE et al., 2004). A produção *in vitro* de compostos secundários sob condições controladas evita flutuações nas concentrações devido a variações geográficas, sazonais e ambientais (MURTHY et al., 2014). Estas culturas oferecem a possibilidade de obtenção de quantidades desejáveis de compostos, bem como garantir a conservação sustentável e utilização racional da biodiversidade (COSTE et al., 2011).

2.3.1 Reguladores de Crescimento

Reguladores de crescimento vegetal são compostos sintéticos com ação igual ou semelhante aos hormônios naturais das plantas (VALLE, 2003). São utilizados na cultura de tecidos para garantir um nível de crescimento básico e são igualmente importantes para direcionar a resposta do explante em desenvolvimento, sendo o sinergismo entre auxina e citocinina determinantes no controle da morfogênese *in vitro* (NASCIMENTO, 2006). Enquanto uma alta razão auxina/citocinina estimula a formação de raízes, uma baixa razão leva a formação de partes aéreas; e em níveis intermediários, o tecido cresce como um calo indiferenciado (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Para a formação de calos, a composição do meio de cultura e a presença de reguladores de crescimento são fatores determinantes no estabelecimento da competência e determinação destas células, condições necessárias para a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares (KERBAUY, 1999).

No meio de cultura utilizado é imprescindível que haja um balanço entre os reguladores de crescimento, ou seja, uma combinação eficiente entre auxinas e citocininas. No entanto, esta combinação também depende da espécie, do tipo e da idade do tecido utilizado na cultura. Ao utilizar explantes de plantas adultas, as respostas a um regulador de crescimento são diferentes em relação ao tecido jovem, por exemplo (SOUZA, 2007).

A formação de calos tem sido obtida principalmente através do uso de auxinas como 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e AIB (ácido indol 3-butírico), embora o 2,4-D tem se mostrado mais eficaz na formação de calos, 2,4-D é a auxina sintética que auxilia no

desenvolvimento do calo (REIS et al., 2007; SOUZA, 2007). As auxinas são hormônios vegetais produzidos principalmente nas regiões apicais que, transportados para outros locais da planta, participam do seu crescimento e diferenciação. Esses fitorreguladores podem ser necessários para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados. Quantidades excessivas de auxina sintética 2,4-D tendem a estimular a formação de calo (SMITH e MURASHIGE, 1970).

Dentre os reguladores de crescimento utilizados na fase de multiplicação celular destacam-se as citocininas, as quais participam de vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, morfogênese da parte aérea e das raízes e senescência (CALDAS, et al., 1998). Dentro do grupo de citocininas encontramos BAP (benzilaminopurina) e KIN (cinetina), as quais são empregadas para formação de brotos, sendo BAP mais eficaz na multiplicação celular, formando calos nos explantes (SOUZA et al., 2003). Um dos reguladores de crescimento utilizados nos meios de cultura é o tiadiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5-ylureia), possui alta atividade de citocinina em cultivos *in vitro*, quando utilizado em pequenas concentrações, seu efeito é mais conhecido na micropropagação de espécies lenhosas (MOK et al., 1982).

2.3.2 Calogênese

Calos são massas de células desorganizadas, com tamanhos e colorações diferentes que podem ser formados a partir de uma ou várias células com potencial de diferenciação (CARVALHO et al., 2013; IKEUCHI et al., 2013). Estas estruturas se desenvolvem em resposta a substâncias químicas ou lesões físicas, em condições hormonais determinadas (LIMA et al., 2008; MANTELL et al., 1994).

Os tecidos vegetais possuem totipotência e alta plasticidade para a diferenciação celular, principalmente quando colocados em contato com meios de culturas adequados na presença ou não de reguladores de crescimento sofrendo sucessivas divisões celulares e formando aglomerados de células denominados calos (IKEUCHI et al., 2013).

Estudos com calos devem ser desenvolvidos para determinar as condições de cultura que os explantes requerem para sobreviver e crescer. O cultivo de calos pode ser utilizado para se estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário, obter suspensão celular e propagação via formação de gemas ou embriões somáticos (LANDA et al., 2000; SANTOS et al., 2005; SIQUEIRA e INOUE, 1992). A cultura de calos tem permitido o estabelecimento *in vitro*, o que, conseqüentemente,

proporciona a propagação em larga escala de diversas espécies. No entanto, ainda estão em fase inicial de exploração as possíveis mudanças no tecido vegetal capaz de induzir a formação de calos (PAIVA NETO et al., 1997; SANTOS et al., 2003).

Em relação aos reguladores de crescimento vegetal, a indução de calos friáveis é geralmente favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, assim como pela adição de outros componentes ao meio de cultivo ou mesmo pelo genótipo empregado (COSTA et al., 2008; PESCADOR et al., 2000).

Alguns calos são fortemente lignificados e passam a apresentar uma textura mais rígida, fazendo com que estes sejam divididos com maior facilidade em pequenos fragmentos. Quando são facilmente separados são denominados calos friáveis, ou seja, esmigalhável, fragmentável com facilidade, de fácil separação. Podem apresentar colorações amareladas, brancas, verdes ou pigmentadas com antocianina, essa pigmentação pode ser uniforme em toda a extensão do calo, ou algumas regiões podem permanecer sem pigmento (DODDS e ROBERTS, 1985; VALLE, 2003). Para a obtenção de culturas embriogênicas é indispensável à indução de calos friáveis, por possuir células arredondadas e com características meristemáticas. A friabilidade é capacidade das células vegetais se separarem uma das outras quando cultivadas *in vitro* (VASCONCELOS et al., 2012). Os calos friáveis se diferem dos calos compactos, pois os calos compactos as células são justapostas, de maiores dimensões e vacuoladas (NARAYANASWAMY, 1994; PILATTI, 2011; VALLE, 2003).

2.3.3 Curva de Crescimento de Células de Calo

Durante o cultivo *in vitro*, a importância de se estabelecer a curva de crescimento de calos de determinada espécie está na identificação das fases em que ocorrem processos fundamentais ao estudo cinético do seu crescimento. A partir desse estudo, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem dos calos para um novo meio ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, visando a produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (NOGUEIRA et al., 2008; SOARES, 2003).

A partir da determinação das fases lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária da curva de crescimento de calos, pode-se determinar o índice mitótico para cada fase desta curva, o que torna possível estipular o intervalo médio dos subcultivos (GUERRA et al., 1999; STEIN et al., 2010).

O crescimento *in vitro* de calos geralmente apresenta um padrão sigmoidal, com seis fases. A fase lag se caracteriza como fase de maior produção de energia, correspondendo ao

período em que as células se preparam para a divisão, visando sua expansão. Ocorre o início da mobilização de metabólitos primários, sem qualquer divisão celular, síntese de proteínas e de compostos específicos. Essa fase resulta em um pequeno crescimento dos calos. A fase exponencial é biossintética. Observa-se o maior crescimento dos calos, devido à máxima taxa de divisão celular, característica desse período. O número de células aumenta. Na fase linear há diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular. A fase de desaceleração é o momento em que as culturas devem ser transferidas para outro meio, ideal para a repicagem dos calos, devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Na fase estacionária ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários. Na fase declínio as células perdem peso devido à morte celular (CASTRO et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2008; SMITH, 1992).

2.4 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

O uso contínuo e indiscriminado de produtos químicos na agricultura pode trazer sérios prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente (FREIRE et al., 2016).

Nas últimas duas décadas com o aumento dos problemas da resistência de insetos a inseticidas organo sintéticos, ressurgência e erupção de pragas, e os problemas advindos do uso indiscriminado de inseticidas organo sintéticos sobre inimigos naturais, meio ambiente e homem e sobretudo o desenvolvimento da agricultura orgânica (onde o uso de defensivos organo sintéticos é proibido) aumentou o interesse no mundo inteiro pelos inseticidas botânicos. Adiciona-se ainda o rápido aumento do custo de síntese de novos produtos e a crescente dificuldade de se descobrir novas classes de compostos com ação inseticida. Enquanto os dezenove principais pesticidas foram introduzidos no período de 1961 a 1970, oito foram introduzidos no período de 1971 a 1980 e somente três na primeira metade do período de 1981 a 1990. Espera-se que a taxa de introdução de novos pesticidas continue a diminuir a não ser que novas inovações sejam introduzidas no desenvolvimento destes produtos (BERENBAUM, 1988; CHIU, 1988; CLOUGH et al., 1994; MOREIRA et al., 2005).

Um novo passo à frente, comparável ao advento da agricultura, esboça-se nos dias atuais, com a substituição dos recursos biológicos naturais por outros, mais adequados ao uso, gerados a partir da intervenção humana nos processos naturais. É a Era da Biotecnologia, quando os conhecimentos acumulados ao longo dessa mesma História, nas Ciências Naturais, são potencializados como recursos e viabilizados em benefício do Homem (MANFREDI,

2003). O processo de descoberta e desenvolvimento de compostos bioativos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (JOSHI, 2007). Os efeitos do biofertilizante no controle de pragas e doenças de plantas têm sido bem evidenciados (MEDEIROS e LOPES, 2006).

A cultura de tecidos vegetais, pertencente a área de biotecnologia, inserida no campo da Biologia, possui várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura (SACCHET, 1999). As culturas de células vegetais apresentam uma variedade de características de crescimento e de produção de metabólitos secundários (BUFFA et al., 2002). A diversidade de metabólitos secundários presentes nas plantas, vem despertando o potencial na agricultura, para utilização desses compostos na ativação de rotas de defesa de plantas contra fitopatógenos (PADILHA et al., 2007).

Em nenhum lugar do mundo existem mais espécies de flora e fauna do que na Amazônia. Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos compostos químicos que reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003; GUIMARÃES, 2015).

Um importante fator que pode diminuir drasticamente os valores finais da produção de uma dada cultura é a presença de pragas no campo e o consequente desenvolvimento de doenças. Com relação as bactérias e fungos, sua importância como patógenos de plantas se deve não só a gravidade das doenças que causam nas culturas de valor econômico, mas também à facilidade com que podem se espalhar. A defesa contra pragas fitopatógenas tem sido inegavelmente o maior problema que a humanidade tem enfrentado na produção de alimentos (FRANKEL, 1977; SILVA, 2013).

Na agricultura, Rondônia é um estado que vem se destacando neste setor, sendo hoje considerada a nova fronteira do agronegócio no Brasil, atraindo cada vez mais investimentos e com isso emprego e renda para a população. A economia do estado de Rondônia tem como principais atividades a agricultura, a pecuária, a indústria alimentícia e o extrativismo vegetal e mineral (IDARON, 2013; TABORDA, 2015). Nessa perspectiva de desenvolvimento busca-se usar pesquisas que abordem biotecnologia vegetal que permita entender os mecanismos e processos de regulação de vias metabólicas visando à produção de compostos de interesse (TORRES, 1998).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho.

3.1 INDUÇÃO DE CALOS

No laboratório de cultura de tecidos vegetais, na Embrapa, usando a câmara de fluxo horizontal, as sementes de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo foram submersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 2,0% (v/v) por 10 minutos e em seguida a repetição de três enxagues com água destilada. As sementes foram colocadas em placas de Petri esterilizadas, e posteriormente inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), para germinação. Após 50 dias, os explantes estavam com aproximadamente 8,0 cm, adequados para serem segmentados e inoculados em meio suplementado com reguladores de crescimento.

Em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, foram inoculados segmentos de explantes foliares de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo. Ao meio foram adicionados os reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (benzilaminopurina) (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) em combinações fatoriais, perfazendo um total de 16 tratamentos. Os cultivos foram mantidos sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. Após 42 dias o percentual de explantes com calos friáveis foi avaliado.

Os calos foram pesados para avaliação da sua massa fresca, como parâmetro para avaliar a proliferação de células de calos.

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5%.

3.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS

O tratamento que resultou na maior massa fresca de calos foi repetido para a identificação do padrão de crescimento dos calos. Segmentos foliares foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio com metade dos sais minerais do meio MS (MS 50%), pH 5,8, suplementado com 15,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 26±1°C e fotoperíodo de 16 horas. A cada sete dias, durante 42 dias, três repetições foram pesadas para

estabelecimento da curva de crescimento, identificando-se suas fases. Os dados foram submetidos à análise de regressão. Para determinação das fases de crescimento dos calos, a equação da reta foi aplicada para a obtenção do peso fresco referente aos 42 dias da cultura (Apêndice A), e então foi utilizado o seguinte critério:

Fase lag: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são menores ou igual a zero.

Fase exponencial: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são crescentes.

Fase linear: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são estáveis.

Fase de desaceleração: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são decrescentes.

Fase estacionária: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes tendem a zero.

Fase de declínio: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são negativas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INDUÇÃO DE CALOS

Aos sete dias após inoculação nos meios suplementados com reguladores de crescimento, houve intumescimento foliar e o consequente início da formação de calos. No meio sem reguladores de crescimento, não se observou indução de calos, o que evidencia a necessidade da suplementação destes para que a indução ocorra (Tabela 1). O tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP também não resultou em indução de calos nos explantes. É evidente a interação positiva de 2,4-D e BAP, bem como a baixa eficiência de cada um deles isoladamente, sendo que a utilização de uma auxina (neste caso 2,4-D) e uma citocinina (BAP) é normalmente preconizada na literatura para a indução eficiente de calos. É possível observar uma faixa ótima de 100% de indução de calos friáveis, com a suplementação do meio de cultivo com $1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em combinação com $1,0$, $2,0$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Pode-se inferir que, acima de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, ocorreu saturação, ou efeito tóxico do regulador de crescimento nos explantes.

A indução de calos friáveis também foi registrada por Santos et al. (2005) que constataram que houve a indução de calos friáveis nos explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd), sendo uma produção significativa usando $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

O desenvolvimento de calos usando o BAP também foi relatado por Barbosa et al. (1994), que trabalharam com explantes da espécie *Capsicum annuum* e observaram que os meios contendo concentrações mais elevadas de BAP e tidiazuron promoveram a indução e produção de calos nos explantes provenientes de plântulas. Pasqual (2001), relata que citocininas são necessárias para a divisão celular das plantas com resultados positivos na indução de calo. Agrawal et al. (1989), concluíram que para a indução de calos de *C. annuum* L. cv. Mathania, faz-se necessário as concentrações em meios suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Farias Filho (2006), relata que no experimento com *C. annuum* houve calogênese utilizando $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, e com a espécie *C. chinense* também houve formação de calos no meio suplementado com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Torres et al. (1998) citam que o regulador vegetal 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade. Segundo Taiz e Zeiger (2009), as auxinas são responsáveis pelo início da divisão e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular, sendo indispensáveis para a formação de calos. Kittipongpatana et al. (2007), observaram a calogênese em explantes foliares de *C. annuum* em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de

2,4-D e 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Já Umamaheswari e Lalitha (2007) constataram o melhor tratamento 2,0 mg L⁻¹ de 2, 4-D e 0,5 mg L⁻¹ de KIN, para a produção de calo de explante foliar de *C. annuum*. Kintzios et al. (2000), trabalhando com a mesma espécie, definiram que 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,9 mg L⁻¹ de BAP são as melhores concentrações para a indução de calos em explante foliar.

Tabela 1: Porcentagens de indução de calos em explantes foliares de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo sob diferentes concentrações de BAP e 2,4-D no meio de cultivo, após 42 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	4
0	0 Bc	20 Bab	30 Ba	30 Ca
1	0 Bc	100 Aa	100 Ab	50 ABb
2	40 Ac	100 Aa	100 Aa	60 Ab
4	40 Ac	100 Aa	100 Aa	40 BCb

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Kehie et al. (2012) observaram que no meio MS contendo 2,0 mg L⁻¹ de 2,4- D e 0,5 mg L⁻¹ de KIN induziram a formação de células de calos de *C. chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. Gunay e Rao (1978), no trabalho com explantes de hipocótilo em uma espécie híbrida de *C. frutescens* (Bharath), afirmam que houve enraizamento e formação de calos em meios contendo 1,0 mg L⁻¹ de AIA + 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

Palú et al. (2004) relatam em seu trabalho que trata da produção de calogênese em anteras de *Coffea arabica* L que o aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, ponto a partir do qual o regulador de crescimento passou a inibir a produção de calos, provavelmente devido a um efeito fitotóxico promovido por concentrações superiores a essa; a melhor resposta para indução de calos foi na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,9 mg L⁻¹ de cinetina. Já os autores Rady e Nazif (1997) usando as concentrações de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, observaram resultados significativos na produção de calos derivados de hipocótilos de *Cassia acutifolia* Del. (Fabaceae-Caesalponioideae). No experimeto de Feitosa et al. (2013) com explantes foliares de *Jatropha curcas* L., houve interação significativa entre os reguladores de crescimento BAP e AIB para as variáveis analisadas; todos os tratamentos com BAP e AIB formaram calos compactos, os quais variaram em tamanho de acordo com as combinações de suas concentrações, verificando-se uma maior formação de calos nas concentrações de 1,9 mg L⁻¹ e 1,87 mg L⁻¹

de BAP com 0,79 mg L⁻¹ e 0,72 mg L⁻¹ de AIB e as porcentagens de 99,28% e 99,82% de formação de calo, respectivamente.

Santos et al. (2003) estudando a indução de calos em segmentos foliares de *Coffea arabica*, observaram que o uso isolado da auxina 2,4-D, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg L⁻¹, proporcionou, respectivamente, 61%, 67% e 69% de produção de calos, sendo que concentrações de 2,4-D superiores a 1,5 mg L⁻¹ inibiram a formação de calos. Rodrigues e Almeida (2010) no experimento com segmentos foliares, observaram que, no cultivo de calos da espécie *Cissus sicyoides* a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu o maior número de calos compactos e o maior número de calos friáveis foi obtido utilizando-se 12,0 mg L⁻¹ de BAP. No trabalho de Werner et al. (2009) a indução de calos em explantes foliares de *Caesalpinia echinata* ocorreu em meios contendo 2,4-D, e as melhores respostas ocorreram em folíolos juvenis nas concentrações mais baixas de 5,0 a 20 mg L⁻¹ e folíolos jovens nas concentrações mais elevadas 50 e 100 mg L⁻¹.

Concentrações semelhantes de auxinas e citocininas no meio de cultura promovem a indução de calos, e as respostas às interações desses reguladores de crescimento podem variar de acordo com as especificidades do regulador, de explantes e genotípicas (CORDEIRO et al., 2007).

O mesmo padrão observado quanto às porcentagens de indução de calos se repetiu quanto à proliferação de células de calo, avaliada por meio da massa fresca dos explantes. Os maiores valores observados para massa fresca dos explantes foliares foram os tratamentos com combinações de 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0, 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias do peso da massa fresca (mg) de calos em explantes de *Capsicum annuum* cv. Pimentão Amarelo submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹), após 42 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	4
0	129 Bd	325 Bc	442 Bb	533 Ca
1	124 Bc	2.125 Aa	2.098 Aa	1.150 Ab
2	782 Ac	2.037 Aa	1.998 Aa	1.249 Ab
4	813 Ac	2.025 Aa	2.128 Aa	914 Bb

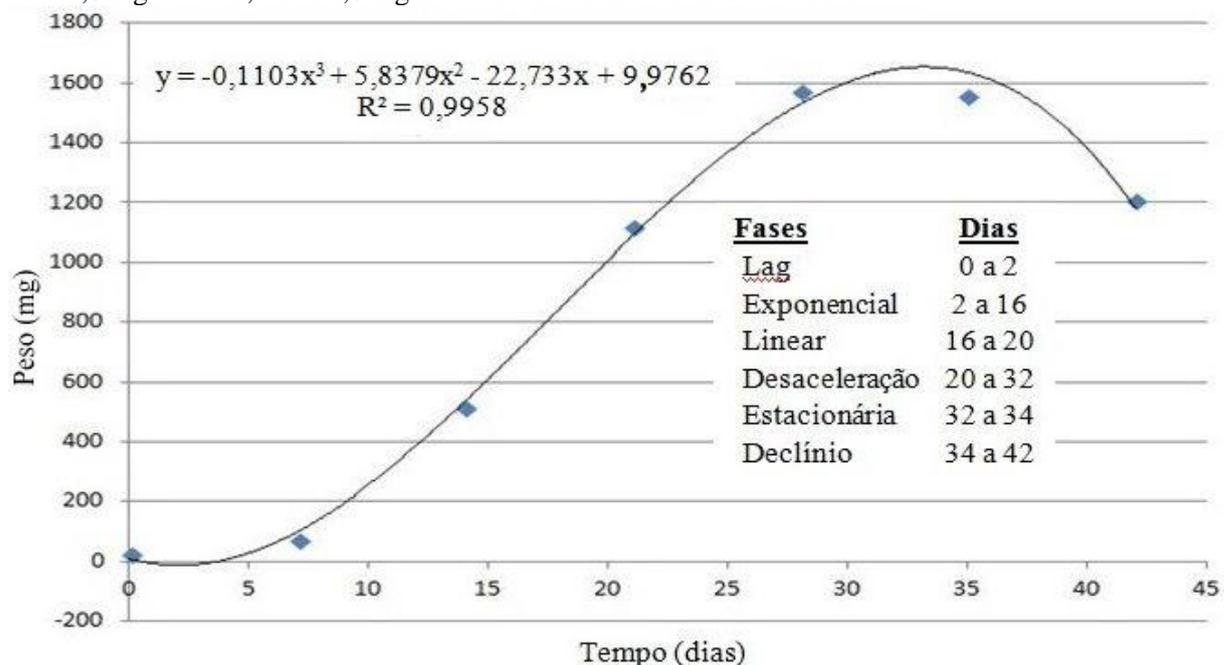
*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna; médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma linha, pelo teste de Tukey a 5%.

Oliveira (2014) verificou que nos calos de brotos de *Physalis angulata* houve variação na biomassa fresca com diferenças significativas entre as concentrações na presença e ausência de 2,4-D. A biomassa fresca foi de 2.580 mg, obtida na presença de 2,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, e de 2.810 mg na ausência de reguladores. Feitosa et al. (2013) observaram que, 40 a 45 dias após a inoculação, o segmento foliar de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de AIB apresentou valores médios de 2,038 mg de massa fresca. Rocha (2014) constatou que os maiores valores de massa fresca dos explantes foliares de *Cissus verticillata* foram obtidos nos tratamentos contendo apenas BAP na suplementação, com 4,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, resultando em 18.190; 14.030 e 12.330 mg de massa fresca, respectivamente.

4.2 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS CALOS

O crescimento dos calos seguiu uma curva do tipo sigmoide, com seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e de declínio (Figura 1).

Figura 1. Curva de crescimento de calos de *Capsicum annuum* cultivados em meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de BAP durante 42 dias de cultivo.



A curva de crescimento de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo demonstrou a fase lag nos dias que compreenderam do dia da inoculação até o 2º dia. Nesta fase começa a mobilização de metabólitos, síntese de proteínas e metabólitos, sem multiplicação celular (SANTOS et al., 2010). Souza et al. (2015) relatam que a fase lag na curva de crescimento de explantes foliares de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño compreendeu do dia da inoculação até o 12º de cultivo. Guimarães (2015) no estudo da calogênese em

explantes foliares de *Piper permucronatum*, verificou que a fase lag, onde as células do explante se preparam para a divisão celular e produção de energia, ocorreu até o 21º dia após a inoculação.

A fase exponencial da curva de crescimento de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo deu-se entre o 2º a 16º dia. Nesta fase a divisão celular alcança seu máximo (SANTOS et al., 2010). Farias Filho (2006) relata que houve formação de calos friáveis a partir do 7º dia de inoculação em anteras de *Capsicum* ssp. Já Bárány et al. (2005) em cultura de anteras, observaram a formação de calos a partir do 6º dia de inoculação em *C. annuum*. Nogueira et al. (2008) concluíram em seu trabalho que a fase exponencial estendeu-se do 20º ao 40º dia de cultivo, em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia*).

A fase linear da curva de crescimento de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo deu-se entre os 16º a 20º dia. Nesta fase ocorre redução da divisão celular e aumento da área celular (SANTOS et al., 2010). Bastante diferente foram os resultados encontrados por Abbade et al. (2010), em experimento com ipê-branco, onde se observou o período de crescimento linear entre os 45º e 60º dias da inoculação.

A fase de desaceleração de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo ocorreu entre o 20º e o 32º dia após a inoculação. Nesta fase a divisão celular diminui, bem como a expansão das células (SANTOS et al., 2010). De acordo com Torres (2013) o início do processo de repicagem deve ocorrer na fase de desaceleração, quando a divisão celular diminui e ocorre a expansão das células; a repicagem deve terminar antes do início da fase estacionária, pois neste momento não ocorre mais divisão celular, não há síntese de biomassa ou aumento do número de células. Assim, ao determinar a curva de crescimento dos calos, pode-se estabelecer o momento exato de repicagem para um meio fresco ou a possibilidade da sua utilização em suspensões celulares, podendo visar à produção de metabólitos secundários em espécies medicinais (SMITH, 1992; PORTO, 2013). Azevedo (2003) verificou que na espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. a fase de desaceleração ocorreu entre o 126º e o 154º dia após a inoculação e que a fase estacionária ocorreu a partir do 154º dia após a inoculação, sendo esta a fase em que não ocorre mais divisão celular.

A fase estacionária da curva de crescimento de *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo deu-se entre o 32º a 34º dia. Nessa fase se tem o maior acúmulo de metabólitos secundários (SMITH, 1992; CASTRO et al., 2008). Resultado diferente foi observado no trabalho de Kittipongpatana et al. (2007), que observaram a fase estacionária no 21º dia de cultivo em explantes de folhas de *Capsicum annuum* L.

Na cultivar *C. annuum* cv. Pimentão Amarelo, a fase de declínio compreendeu do 34º ao 42º dia, no qual não havia mais produção de calos. Nesta fase há perda de peso devido à morte celular (SANTOS et al., 2010). Já no trabalho de Umamaheswari e Lalitha (2007) foi constatado que a maior produção de células de calos em explante foliar de *C. annuum* ocorria aos 30 dias após a inoculação. Diferentemente, Amaral (2003), ao trabalhar com explantes de cenoura (*Daucus carota* L.), observou um aumento significativo de calos cultivados com 30 e 60 dias de inoculação. Rossato (2015) relata que após o 42ª dia da inoculação já era possível observar um breve declínio da curva de crescimento dos calos de segmentos nodais de gabirobeira (*Campomanesia adamantium*), indicando o início da fase de declínio. Lopes et al. (2016) concluíram que ao final de 91 dias os calos de *Hilocereus undatus* entraram na fase de declínio, em processo de senescência. Essa diferença de dias do início da fase de declínio relatada pelos autores se dá pela diferença de genótipos estudados.

CONCLUSÕES

Para a indução de calos em explantes foliares de *Capsicum annuum* recomenda-se o meio de cultura com metade da concentração dos sais MS, suplementado com os reguladores de crescimento na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Conclui-se ainda que a curva de crescimento dos calos de *C. annuum* apresenta um padrão sigmoide, com seis fases distintas de crescimento (fases lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio). Os calos são de aspectos friáveis, ou seja, as células são globulares, de vacúolos pequenos, possuem células facilmente separáveis umas das outras, sendo indicados para estudos de células em suspensão. O subcultivo dos calos em meio líquido visando ao estabelecimento de suspensões celulares deve ser feito no início da fase de desaceleração, que ocorre no 21º dia de cultivo.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L.C.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R.; GRACIANO, M.H.P. Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipê-Branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v.33, p.45-56, 2010.

AGRAWAL, S.; CHANDRA., N.; KOTHARI, S.L. Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv mathania). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.47-55, 1989.

AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B.; Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, 2003.

AMARAL, A. F. C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

A.P.G. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.

AZEVEDO, J.L.; Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p.117-137, 1998.

AZEVEDO, K.S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BÁRÁNY, I. GONZÁLEZ-MELENDI, P.; FADÓN, B.; MITYKÓ, J.; RISUEÑO, M.C.; TESTILLANO, P.S. . Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. **Biology of the Cell**, v.97, p.709-722, 2005.

BARBOSA, M.H.P.; INNECO, R.; PINTO, J.E.B.P.; PINTO, C.A.B.P. Efeito de reguladores de crescimento e tipo de explantes na morfogênese *in vitro* de *Capsicum annum* L. **Ciência Rural**, v.24, n.1, p.67-72, 1994.

BARBOSA, R.I.; LUZ, F.J.F.; NASCIMENTO FILHO, H.R.; MADURO, C.B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. I. Espécies domesticadas. **Acta Amazônica**, v.32, n.2, p.177-192, 2002.

BENTO, C.S.; SUDRE, C.P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; PEREIRA, M.G.; Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.149-156, 2007.

BERENBAUM, M.R. North American ethnobotanicals as sources of novel plant-based insecticides. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. Washington, DC, **American Chemical Societ**, v.387, p.44-58, 1988.

BORGES, K.M.; VILARINHO, L.B.O.; FILHO, A.A.M.; MORAIS, B.S.; RODRIGUES, R.N.S. Caracterização morfoagronômica e físico-química de pimentas em Roraima. **Revista Agro@ambiente On-line**, v.9, n.3, p.292-299, 2015.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BUFFA, W.F.; SOARES, A.M.P.; CASTRO, S.F.; FURLANL, M. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus Ilicifolia*. **Eclética Química**, v.27, n.1, 2002.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Meios nutritivos**. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p.87-132, 1998.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CAPALDI, F.R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica* D. Don. “Elegans” cultivados *in vitro*: Análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais**. 2002. 84f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CARVALHO, M.A.F.; PAIVA, R.; ALVES, E.; NOGUEIRA, R.C.; STEIN, V.C.; CASTO, E.M.; PAIVA, P.D.O.; VARGAS, D.P. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* N. E. Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, v.36, n.2, p.141-151, 2013.

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

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. Botânica e Recursos genéticos. In: Ribeiro, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.S.; HENZ, G.P.; REIFSCHIDER, F.J.B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Athalais Gráfica e Editora Ltda, p.39-50, 2008.

CASTRO, A.H.F.; LIMA, C.M.M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; SÓTER, M.O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (FabaceaeMimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.4, n.2, p.99-104, 2008.

CHIU, SHIN-FOON. Recent advances in research on botanical insecticides in China. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. Insecticide of plant origin. Washington, DC, **American Chemical Society**, v.387, p.69-77, 1988.

CHUAH, A.M.; LEE, Y.C.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; YIN, L.J.; MATOBA, T. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. **Food Chemistry Barking**, v.111, n.1, p.20-28, 2008.

CLOUGH, J.M.; EVANS, D.A.; FRAINE, P.J.DE.; FRASER, T.E.M.; GODFREY, C.R.A.; YOULE, D. In: HEDIN, P.A.; MENN, J.J.; HOLLINGWORTH, R.M. Natural and engineered pest management agents, Washington, DC. **American Chemical Society**, p.37-53, 1994.

CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; REIS, L.R.S. Indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.3, n.1, p.35-40, 2007.

COSTA, F.H.S.; LOUREIRO, T.S.; PEREIRA, J.E.S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agrônômica**, v.39, n.02, p.269-274, 2008.

COSTA, L.M.; MOURA, N.F.; MARANGONI, C.; MENDES, C.E.; TEIXEIRA, A.O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.51-59, 2010.

COSTE, A.; VLASE, L.; HALMAGYI, A.; DELIU, C.; COLDEA, G. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, n.2, p.279-288, 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

DODDS, J.H. ; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2ed. Cambridge: Cambridge University Press, 232p. 1985.

FARIAS FILHO, L.P. **Calogênese em anteras e diversidade genética de acessos de pimenta (*Capsicum* SSP.) do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima com base em marcador RAPD**. 2006. 55f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais), Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.

FEITOSA, L.S.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M.P.; BLANK, A.F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v.29, n.2, p.370-377, 2013.

FRANKEL, R.; GALUN, E. POLLINATION MECANISMS, REPRUDUCTION AND PLANT BREEDING. Berlim, **Springer-verlang, hierdelberg**, 281p, 1977.

FREIRE, G.F.; LEITE, D.T.; PEREIRA, R.A.; MELO, B.A.; SILVA, J.F.; MARACAJÁ, P.B. Bioatividade de *Solanum melongena* L. e *Capsicum annuum* L. sobre *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Acta Biológica Colombiana**, v.21, n.1, p.123-130, 2016.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.627-641, 2008.

GUERRA, P.G.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogenese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, L.A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa, v.2, p.533-568, 1999.

GUIMARÃES, M.C.M. **Estudo da calogênese, dinâmica de crescimento de calos e estabelecimento de suspensões celulares de *Piper permucronatum***. 2015. 46.p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

GUNAY, A.L.; RAO, P.S. *in vitro* plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of red pepper (*capsicum*). **Plant Science Letters**, v.11, p.365-372, 1978.

HEISER, C.B. Jr. Peppers - Capsicum (Solanaceae). In: SIMMONDS, N.W. *Evolution of crop plants*. Longman, p.265-273, 1979.

HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; LUNA-REYES, R.; OYAMA, K. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. **Plant Systematics and Evolution**, v.226, p.129-142, 2001.

HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag. 500p. 2001.

IDARON. **Levantamento de dados sobre a produção de leite em Rondônia**. Porto Velho: [s.n.]. 2013.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, v.25, p.3159-3173, 2013.

JOSHI, H.N. Drug development and imperfect design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.343, n.1-3, 2007.

KEHIE, M.; KUMARIA, S.; TANDON, P. Osmotic stress induced-capsaicin production in suspension cultures of *Capsicum chinense* Jacq.cv. Naga King Chili. **Acta Physiol Plant**, v.34, 2039-2044, 2012.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v.2, 1999.

KINTZIOS, S.; DROSSOPOULOS, J.B.; SHORTSIANITIS, E.; PEPPEPES, D. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. **Scientia Horticulturae**, v.85, p.137-144, 2000.

KITTIPONGPATANA, N.; MANEERAT, P.; PATTANAKITKOSOL, P.; KITTIPONGPATANA, O.S. Effect of some factors on the growth of *Capsicum annuum* L. cell suspension culture and biotransformation of hydroquinone to arbutin. **CMU Journal of Natural Sciences**, v.6, n.2, p.207-218, 2007.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, p.49-56, 1997.

LANDA, F.S.L.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; BUENO FILHO, J.S.S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.56-63, 2000.

LI, J.; OU-LEE, T.; RABA, R.; AMUNDSON, R.G.; LASTA, R.L. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. **The Plant Cell**, v.5, n.2, p.171-179, 1993.

LIMA, E.C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SOARES, F.P.; EMRICH, E.B.; SILVA, Á.A.N. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* BAILL. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.1, p.17-22, 2008.

LINHARES, P.C.A.; SILVA, J.N.; SILVA, J.N.; IRINEU, T.H.S.; SOUSA, T.P.; ANDRADE, R. Fitomassa de pimenta doce-italina (*capsicum*) em função de adubação orgânica. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.9, n.4, p.163-167, 2014.

LOPES, C.A.; DIAS, G.M.G.; PIO, L.A.S.; SILVEIRA, F.A.S.; RODRIGUES, F.A.; PASQUAL, M. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.11, n.1, p.21-25, 2016.

LUTZ, D.L.; FREITAS, S.C.de. Valor Nutricional. In: Ribeiro, C.S.C.; LOPES, C.A.; CARVALHO, S.I.S.; HENZ, G.P.; REIFSCHIDER, F.J.B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Athalais Gráfica e editora Ltda. p.31-38. 2008.

MANFREDI, J.F. O que é biotecnologia?. **Argumento**, v.5, n.10, p.39-51, 2003.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. **Revista Brasileira de Genética**, p.344, 1994.

MARTINS, L.V. **Caracterização citogenética com ênfase na cromatina em acessos de pimentas *Capsicum* L.** 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

MEDEIROS, M.B.; LOPES, J.S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, 2006.

MELO, B. **Cultivo de embrião *in vitro* da gabirobeira (*Syagrus oleraceae* (Mart) Becc).** 2000. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

MIRANDA, T.G. **Caracterização físico-química de genótipos de pimentas (*Capsicum chinense* e *Capsicum annuum*).** 2014. 72f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO. Cytokinin activity of N- phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry*, v. 21, n. 7, p. 1509-1511, 1982.

MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MOREIRA, M.D.; PICANÇO, M.C.; SILVA, E.D.; MORENO, S.C.; MARTINS, J.C.; VENZON, M. "Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas." Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM. p.89-120, 2005.

MOSCONE, E.A.; SCALDAFERRO, M.A.; GRABIELE, M.; CECCHINI, N.M.; SÁNCHEZ, G.Y.; JARRET, R.; DAVIÑA, J.R.; DUCASSE, D.A.; BARBOZA, G.E.; EHRENDORFER, F. The evolution of chili pepers (*Capsicum Solanaceae*): a cytogenetic Perspective. **Acta Horticulturae**, v.745, p.137-170, 2007.

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

MURTHY, H.N.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.118, n.1, p.1-16, 2014.

NARAYANASWAMY, S. **Plant cell and tissue culture**. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1994.

NASCIMENTO, A. C. **Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess)**. Lavras, 2006. 122f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia vegetal), Universidade Federal de Lavras.

NASCIMENTO, I.R. **Heterose e capacidade combinatória de linhagens de pimentão resistentes ao mosaico amarelo causado por PepYMV (*Pepper yellow mosaic vírus*)**. 2005. 101f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NASCIMENTO, K.O.; VICENTE, J.; SALDANHA, T.; JÚNIOR, J.L.B.; BARBOSA, M.I.M.J. Caracterização química e informação nutricional de geleia de pimenta Cambuci orgânica (*Capsicum baccatum* L.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, n.2, p.283-288, 2012.

NASCIMENTO, M.F. **Diversidade genética e estudo de geração em características morfoagronômicas de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum*)**. 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

NEITZKE, R.S. **Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* - explorando a multiplicidade de usos**. 2012. 116f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E.C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

OLIVEIRA, J.A.R. **Multiplicação em *in vitro* e estaquia de *Physalis angulata* L.** 2014. 39f. Mestrado (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural), Universidade da Cruz Alta, Cruz Alta, 2014.

PADILHA, T.R.; MAZARO, S.M.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S.S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*Glycine max*) em resposta a derivados de folhas de Alfavaca-Cravo (*Ocimum gratissimum* L.). **I Seminário Sistemas de Produção Agropecuária** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos, 2007.

PAIVA NETO, V.B.; PAIVA, R.; GOMES, G.A.C.; PÓVOA, J.S.R. Comportamento *in vitro* de segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.40, n.1, p.135-141, 1997.

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

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p. 146-152, 2012.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H.; REBELO, R.A.; GIOTTO, C.R.; WENDHAUSEN, J.R.R.; LARGURA, G.; TAVARES, L.B.B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.15, p.18-23, 2000.

PILATTI, F.K. **Crescimento, perfil metabólico e citoquímica de calos de *Cedrela fissilis* Veloso (Meliaceae).** 2011. 132f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociência), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

PINTO, Â.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

POCHET, B.; SCOMAN, V.; MESTDAGH, M.M.; MOREAU, B.; ANDRE, P. Influence of agar gel properties on the '*in vitro*' micropropagation of different clones of *Thuja plicata*. **Plant Cell Reports**, v.10, p.406-409, 1991.

PORTO, J.M.P. **Criopreservação de calos, ápice caulinares e sementes de Barbatimão.** 2013. 105f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental.** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, p.44, 2008.

RADY, M.R.; NAZIF, N.M. Response of explant type to proliferation and anthraquinones accumulation in *Cassia acutifolia*. **Fitoterapia**, v.68, n.4, p.349-354, 1997.

REIS, I.N.R.S.; LAMEIRA, O.A.; CORDEIRO, I.M.C.C. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.498-500, 2007.

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

ROCHA, J.F. **Indução de calos em explantes foliares de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**. 2014. 42f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.333-340, 2010.

ROSSATO, M. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium***. 2015, 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2015.

SACCHET, A.M.O.F. **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. da Universidade – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.286, 1999.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar Rubi. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.3, p.571-577, 2003.

SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, P.D.O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.510-514, 2005.

SANTOS, M.R.A.; FERREIRA, M.G.R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in conilon coffee. **Revista Caatinga**, v.23, n.1, p.133-136, 2010.

SIGNORINI, T.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S.; BESPALHOK, D.N.; MONTEIRO, E.R. Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.4, p.534-539, 2013.

SILVA, C.M.A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – Uma nova inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC, p.1102, 2007.

SIQUEIRA, E.R. de.; INOUE, M.T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.4, p.639-646, 1992.

SMITH, R.H.; MURASHIGE, T. *In vitro* development of isolated shoot apical meristem of angiosperm. **American Journal of Botany**, v.57, p.562-568, 1970.

SMITH, R.M. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: academic, 1992. 172p.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro [*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.]**. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003

SOUSA, W.R.N. **Caracterização cariotípica de acessos de pimentas (*Capsicum* sp)**. 2012. 45f. Dissertação de Mestrado (Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.

SOUZA, A. V. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) Mart**. 2003. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA, C.A.; MAGALHÃES, G.M.O.; SOUZA, P.; PAZ, E.S.; SANTOS, M.R.A. Padrão de crescimento de calos friáveis de folhas, entrenó e nó de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *iberaba jalapenõ*. **X Jornada Científica**, Instituto Federal de Rondônia, 02 a 05 dez/2015. p.1092-1094.

SOUZA, K.C.A. **Atenuação do processo de lignificação em células de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, em suspensão, por 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)**. 2007. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

SOUZA, S.A.M.; MARTINS, K.C.; PEREIRA, T.N.S. Polimorfismo cromossômico em *Capsicum chinense* Jacq. **Ciência Rural**, v.41, n.10, p.1777-1783, 2011.

STEIN, V.C.; PAIVA, R.; HERRERA, R.C.; VARGAS, D.P. Curva de crescimento e índice de divisão celular de calos de Ingazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, v.53, n.2, p.159-163, 2010.

TABORDA, J.M.M. **Desenvolvimento da pecuária bovina no estado de Rondônia: contextualização histórica e indicadores zootécnicos**. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, p.820, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

TORRES, A.C, CALDAS L.S.; BUSO J.A. (Eds) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa, v.1, p.864, 1998.

TORRES, L.F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. 2013. 111f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

UMAMAHESWARI, A.; LALITHA, V. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annuum* L. on the callus induction and production of capsaicin. **Journal of Plant Sciences**, v.2, n.5, p.545-551, 2007.

VALLE, R.C.S.C. **Estratégias de cultivo de células de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 184f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1-22, 2004.

VASCONCELOS, J.N.C.; CARDOSO, N.S.N.; OLIVEIRA, L.M.; SANTANA, J.R.F.; FERNANDES, L.G.; BELLO KOBLITZ, M.G.; SILVA, M.L.C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.4, p.592-597, 2012.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado. Documentos**, Pelotas, 2010. 16p.

WERNER, E.T.; CUZZUOL, G.R.F.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P.; ROGER, J.A. Controle da calogênese do Pau-Brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v.33, n.6, p.987-996, 2009.

APÊNDICE

APÊNDICE – A

A Determinação das fases de crescimento dos calos em explantes de *Capsicum annum* cv. Pimentão Amarelo, a equação da reta foi aplicada para a obtenção do peso fresco referente aos 42 dias de cultivo.

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	PESOS FRESCOS (mg)	¹ PESOS INFERIDOS	² d(i+1) – d(i)	FASES
0	25	9,9762	-17,0054	lag
1		-7,0292	-5,9914	lag
2		-13,0206	4,3608	exponencial
3		-8,6598	14,0512	exponencial
4		5,3914	23,0798	exponencial
5		28,4712	31,4466	exponencial
6		59,9178	39,1516	exponencial
7	73	99,0694	46,1948	exponencial
8		145,2642	52,5762	exponencial
9		197,8404	58,2958	exponencial
10		256,1362	63,3536	exponencial
11		319,4898	67,7496	exponencial
12		387,2394	71,4838	exponencial
13		458,7232	74,5562	exponencial
14	515	533,2794	76,9668	exponencial
15		610,2462	78,7156	exponencial
16		688,9618	79,8026	linear
17		768,7644	80,2278	linear
18		848,9922	79,9912	linear
19		928,9834	79,0928	linear
20		1008,0762	77,5326	desaceleração
21	1119	1085,6088	75,3106	desaceleração
22		1160,9194	72,4268	desaceleração
23		1233,3462	68,8812	desaceleração
24		1302,2274	64,6738	desaceleração
25		1366,9012	59,8046	desaceleração
26		1426,7058	54,2736	desaceleração
27		1480,9794	48,0808	desaceleração
28	1574	1529,0602	41,2262	desaceleração
29		1570,2864	33,7098	desaceleração
30		1603,9962	25,5316	desaceleração
31		1629,5278	16,6916	desaceleração
32		1646,2194	7,1898	estacionária
33		1653,4092	-2,9738	estacionária
34		1650,4354	-13,7992	declínio
35	1560	1636,6362	-25,2864	declínio
36		1611,3498	-37,4354	declínio
37		1573,9144	-50,2462	declínio
38		1523,6682	-63,7188	declínio
39		1459,9494	-77,8532	declínio
40		1382,0962	-92,6494	declínio
41		1289,4468	-108,1074	declínio
42	1209	1181,3394		

¹ Valores obtidos a partir da equação da reta ($y = -0,1103x^3 + 5,8379x^2 - 22,733x + 9,9762$).

² Diferenças entre os pesos do dia considerado e do dia subsequente.