

CRUZABILIDADE, TAMANHO DO GENOMA E VIABILIDADE  
POLÍNICA EM *Capsicum* spp

**KELLEN COUTINHO MARTINS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2014

CRUZABILIDADE, TAMANHO DO GENOMA E VIABILIDADE  
POLÍNICA EM *Capsicum* spp

**KELLEN COUTINHO MARTINS**

“Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2014

CRUZABILIDADE, TAMANHO DO GENOMA E VIABILIDADE  
POLÍNICA EM *Capsicum* spp

**KELLEN COUTINHO MARTINS**

“Tese 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 Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>o</sup> Derly José Henriques da Silva (D. Sc. Agronomia) – UFV

---

Prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues (D. Sc. Produção Vegetal) – UENF

---

Prof<sup>a</sup> Helaine Christine Cancela Ramos (D. Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D. Melhoramento de Plantas) – UENF  
Orientadora

*Aos meus pais, Gilberto e Mara, que me ensinaram a caminhar, que choraram minhas lágrimas, que ficaram felizes com minha alegria e que fizeram de mim a pessoa que hoje sou, com suas palavras e exemplos, além de inegavelmente me proporcionar o maior amor que um ser humano pode dar;*

*À minha irmã, Suellen, que sempre torceu por mim e esteve ao meu lado, em todos os momentos;*

*Ao meu esposo, Sérgio, por ser tão especial e por todo carinho, apoio e paciência que sempre teve comigo;*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao maior mestre que já existiu, Jesus Cristo, que me possibilita ter todas as oportunidades na vida, para ser, a cada dia que passa, uma pessoa melhor;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa de estudo concedida;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade de realização do curso;

À minha orientadora, Telma Nair Santana Pereira, pela orientação e pelos ensinamentos desde a graduação;

Aos professores Rosana Rodrigues e Messias Gonzaga Pereira, pela co-orientação neste estudo;

Aos professores Derly José Henriques da Silva e Helaine Christine Cancela Ramos, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões dadas;

A todos os docentes da pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;

Às amigas de laboratório, pelo agradável convívio diário;

A Jose Daniel Valle de Almeida, funcionário da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;

Aos colegas do curso de Doutorado;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	3
3.CAPÍTULOS.....	4
3.1. CRUZABILIDADE E AVALIAÇÃO DAS BARREIRAS DE INCONGRUIDADE EM CRUZAMENTOS ENTRE ESPÉCIES DE <i>Capsicum</i> .....	4
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	4
3.1.2. REVISÃO.....	5
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1.5. CONCLUSÕES.....	39
3.2. TAMANHO DO GENOMA NUCLEAR EM ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Capsicum</i> VIA CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	40
3.2.2. REVISÃO.....	41
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.2.5. CONCLUSÕES.....	59
3.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA VIABILIDADE POLINICA DE ESPÉCIES DE <i>Capsicum</i> COM BASE NA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN <i>in vitro</i> .....	60

3.3.1. INTRODUÇÃO.....	60
3.3.2. REVISÃO.....	62
3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.3.5. CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

## RESUMO

MARTINS, Kellen Coutinho; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2014. Cruzabilidade, constituição genômica e viabilidade polínica em *Capsicum* spp. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira. Conselheiros: Prof<sup>a</sup> Rosana Rodrigues, Prof<sup>o</sup> Messias Gonzaga Pereira.

Os objetivos deste trabalho foram obter híbridos interespecíficos entre espécies de *Capsicum* e identificar a ocorrência de barreiras de incongruidade; estimar o tamanho do genoma das espécies e dos híbridos obtidos e determinar as temperaturas mínima, máxima e ótima sobre a germinação dos grãos de pólen para cada acesso analisado. Para a obtenção dos híbridos interespecíficos, foram realizados cruzamentos manuais entre as espécies *C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum*. Posteriormente, foram registrados o número de cruzamentos realizados e a presença de frutos com e sem sementes. Após a obtenção das plantas híbridas, foi avaliada a fertilidade do híbrido interespecífico via teste de viabilidade polínica, com base na coloração, onde os grãos de pólen viáveis coram-se de vermelho e os inviáveis de verde. Por fim, foram, também, observados a germinação e o crescimento do tubo polínico *in vivo* dos grãos de pólen nos acessos envolvidos nas combinações que não formaram frutos, visando à identificação da ocorrência de barreiras de pré-fertilização. Algumas combinações híbridas geraram frutos e plantas híbridas adultas, enquanto

outras não geraram frutos ou, apesar de gerarem frutos, as sementes não deram origem a plantas. Observou-se a presença de barreiras de fertilização entre as espécies. As barreiras de pós-fertilização se caracterizaram pela morte do embrião (sementes anormais), falta de vigor da planta híbrida e esterilidade do híbrido. Barreira de pré-fertilização foi observada entre *C. frutescens* e *C. baccatum*, na qual os grãos de pólen germinaram, mas não alcançaram os óvulos. Além disso, foi observada uma incompatibilidade unilateral entre essas espécies, quando *C. frutescens* foi utilizada como genitor masculino. A combinação *C. frutescens* x *C. chinense* foi a de maior sucesso, confirmando a estreita relação entre as duas espécies. Para a determinação do conteúdo de DNA, espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres do gênero *Capsicum*, bem como os híbridos interespecíficos obtidos entre algumas dessas espécies foram analisados. Folhas jovens foram coletadas e maceradas em tampão de extração, visando à liberação dos núcleos que foram, então, corados com o fluorocromo iodeto de propídeo. O material foi analisado para a quantificação da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo Partec PA II, sendo utilizada, como padrão interno, a espécie *Zea mays*. Os histogramas gerados apresentaram picos de núcleos em G1 com CV's médio de 2,94 % nas espécies de *Capsicum* e de 3,10% nos híbridos interespecíficos. Com base nesses picos, tanto do padrão quanto das amostras, determinou-se o tamanho do genoma das espécies, que variou de 3359 Mpb (6,87 pg) em *C. frutescens* a 5599 Mpb (11,45 pg) em *C. parvifolium*. O conteúdo de DNA dos híbridos foi intermediário ao dos parentais utilizados nos cruzamentos ou mais relacionado ao do genitor com maior conteúdo de DNA, comprovando que os mesmos não são produtos de autofecundação. Com base nos resultados, observou-se que a citometria de fluxo pode ser uma ferramenta auxiliar na identificação de híbridos interespecíficos de *Capsicum*. Para a definição das temperaturas mínima, máxima e ótima para a germinação dos grãos de pólen, foi, primeiramente, realizado um experimento para definir o melhor meio de cultura com o uso de diferentes concentrações de sacarose (0;5;10 %) e ácido bórico (0; 7,5; 15; 30 ppm) para promover a germinação e, posteriormente, foi realizado outro experimento com o cultivo *in vitro* dos grãos de pólen em diferentes regimes de temperatura (15; 20; 25; 30; 35; 40°C). A combinação sacarose (10%) x ácido bórico (30ppm) promoveu os melhores

percentuais de germinação *in vitro* dos grãos de pólen nos genótipos testados, sendo esse o meio utilizado para a definição das temperaturas cardinais mínima ( $T_{\min}$ ), ótima ( $T_{\text{otm}}$ ) e máxima ( $T_{\text{máx}}$ ). Os grãos de pólen foram, então, distribuídos no meio de germinação e incubados, por cinco horas, em diferentes temperaturas. As temperaturas ótimas variaram de 22,57 a 27,63°C nas espécies *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. annuum* var. *annuum*, respectivamente, mostrando uma resposta similar à temperatura nas diferentes espécies. Foi possível observar que existiu uma relação entre a germinação e o crescimento do tubo polínico, ocorrendo maior alongamento dos tubos nas temperaturas que proporcionaram maiores percentagens de germinação (30 e 35°C em *C. annuum* var. *annuum*; 20 e 25°C em *C. annuum* var. *glabriusculum*; 20°C em *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*; 25 °C em *C. frutescens*).

## ABSTRACT

MARTINS, Kellen Coutinho; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February , 2014. Crossability, Genome Constitution and Pollen Viability in *Capsicum* spp. Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Committee members: Rosana Rodrigues, Messias Gonzaga Pereira.

The aims of this study were the obtaining of interspecific hybrids between *Capsicum* species and the identification of incongruity barriers; the size estimation of the genome of the species and hybrids involved; and the determination of the minimum temperature, maximum and optimum over pollen germination for each accession regarding. The interspecific hybrids were obtained by manual crosses between the species *C. annuum* var. *annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *pendulum* and *C. baccatum* var. *baccatum*. The number of crosses and the occurrence of fruits with and without seeds were registered. After the development of hybrid plants, the interspecific hybrid was undergone to sterility evaluation via pollinic viability test, based on staining, in which the viable pollen grains become red and the unviable ones become green. Finally, it was observed in vivo, the germination and the growth of the pollinic tube of the pollen grains of the accessions involved in the crossings that have not formed fruits, aiming the identification of the occurrence of barriers during pre-fertilization. Some hybrid combinations have generated fruits and high adult plants, while others either have not generated fruits or, despite of generating fruits, the seeds have not originated plants. The presence of barriers against fertilization between species was

observed. The post-fertilization barriers were characterized by the embryo's death (abnormal seeds), the lack of vigor of the hybrid plant and sterility of hybrids. The pre-fertilization barrier was observed between *C. frutescens* e *C. baccatum*, whose pollen grains germinate, but do not reach the ovules. Furthermore, there is unilateral incompatibility between such species, when *C. frutescens* is used as male genitor. The combination *C. frutescens* x *C. chinense* was the most successful combination of all, confirming the straight relation between those species. In order to determine the DNA content, domesticated species, semi-domesticated and wild, all of them from Capsicum genus as well as the interspecific hybrids obtained between some of those species were used. Young leaves were collected and macerated into extraction buffer aiming the liberation of nuclei that were, then, stained with fluorochrome propidium iodide. The material was analyzed regarding to the quantification of the fluorescence by using the flow cytometer Partec PA II, which has used the species *Zea mays* as a pattern. The histograms have presented peaks of nuclei in G1 with mean CV of 2.94% for Capsicum species and 3.10% for interspecific hybrids. The genome size of the species was determined based on the peaks of the pattern and of the samples, which have ranged from 3359 Mbp (6.87pg) in *C. frutescens* to 5599 Mbp (11.45pg) in *C. parvifolium*. The DNA content of hybrids was intermediate in relation to that of the parentes used in the crosses or it was more related to the genitor with greater DNA content, which has proved that the hybrids are not results of self-pollination. The results show that the flow cytometry can be a tool for identifying interspecific hybrids of Capsicum. Some experiments were developed in order to define the minimum temperature, maximum and optimum for pollen grains germination. Firstly, an experiment was conducted to determine the best culture medium for germination with different contents of sucrose (0; 5; 10%) and boric acid (0; 7.5; 15; 30 ppm). Another experiment involved the cultivation in vitro of pollen grains using different temperature schemes (15; 20; 25; 30; 35; 40°C). The combination of sucrose (10%) and boric acid (30ppm) has promoted the best percentages of in vitro germination of pollen grains for the tested genotypes. Moreover, such culture medium was used to determine the minimum cardinal temperature (Tmin), maximum (Tmax) and optimum (Topt). The pollen grains were distributed onto the germination medium and incubated for 5 hours at different temperatures. The optimum temperatures varied from 22.57 to 27.63°C for the

species *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. annuum* var. *annuum*, respectively, showing a similar response of the different species. It was possible to observe that there was certain relation between germination and pollinic tube growth, occurring a greater elongation of tubes at the temperatures that promoted greater percentages of germination (30 and 35 °C for *C. annuum* var. *annuum*; 20 and 25 °C for *C. annuum* var. *glabriusculum*; 20°C for *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*; 25 °C for *C. frutescens*).

## 1. INTRODUÇÃO

Estima-se que o cultivo de hortaliças, no Brasil, ocupou, em 2011, uma área de, aproximadamente, 809 mil hectares, que produziram cerca de 19 milhões de toneladas (Embrapa, 2012). Um importante segmento do setor de hortaliças frescas e, também, de condimentos, temperos e conservas, em nível mundial, é constituído pelas pimentas e pimentões que pertencem ao gênero *Capsicum* (Rufino e Penteado, 2006). A crescente demanda do mercado por pimentas tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias em várias regiões do Brasil (Carvalho *et al.* 2005), sendo o Sudeste e o Centro-oeste os principais produtores (Rufino e Penteado, 2006).

Apesar da importância do gênero para a agricultura, há vários problemas que o produtor tem que enfrentar no cultivo da sua lavoura. Um desses problemas é a suscetibilidade a doenças, que acaba causando problemas na produção de frutos. Uma das formas de se ajudar o homem do campo é o desenvolvimento de cultivares resistentes via programas de melhoramento, usando a hibridação.

A hibridação interespecífica tem sido utilizada para transferir genes de espécies silvestres e relacionadas, para espécies cultivadas em muitas Solanáceas, principalmente em termos de resistência (Yoon *et al.*, 2006; Hajjar e Hodgkin, 2007), sendo a cruzabilidade definida como a capacidade que as espécies têm de gerar progênies férteis. Sua estimativa é feita com base no número de polinizações controladas realizadas e no número de híbridos obtidos; enquanto que a incongruidade é a incompatibilidade entre as espécies,

dificultando ou impedindo a transferência de genes (Singh, 2002). Híbridagens com progênies férteis podem ocorrer entre as espécies de *Capsicum* em graus variados (Nwankiti, 1976; Kumar *et al.*, 1987; Jarret e Dang, 2004; Panda *et al.*, 2004; Baral e Bosland, 2004).

Para o melhoramento das culturas e para o sucesso dos programas de melhoramento, é essencial obter informações sobre a diversidade genética do germoplasma disponível e sobre as afinidades genômicas entre os possíveis doadores de alelos valiosos e a cultura a ser melhorada, uma vez que vários são os problemas quando se utiliza a hibridação interespecífica em função das barreiras de incongruidade, que fazem com que o melhorista desista desse tipo de metodologia para desenvolver suas cultivares (Hajjar e Hodgkin, 2007).

Além do desenvolvimento de novas cultivares através da hibridação interespecífica, um novo desafio para o melhoramento é a atual preocupação com o aquecimento global e a obtenção e identificação de cultivares tolerantes a altas temperaturas. O quinto relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), com base na revisão de milhares de pesquisas realizadas nos últimos cinco anos, mostra que a temperatura do planeta poderá aumentar até 4,8°C neste século, o que deve gerar grande impacto nos ecossistemas de todo o planeta.

Alguns exemplos têm mostrado o efeito que o aquecimento global tem sobre a produtividade de algumas culturas, e uma compreensão completa das respostas fisiológicas das plantas a temperaturas elevadas, dos mecanismos de tolerância ao calor e possíveis estratégias para melhorar essa tolerância é imperativo (Wahid *et al.*, 2007).

Pequenos aumentos na temperatura podem interferir na viabilidade polínica, na capacidade germinativa e nas taxas de crescimento do tubo polínico (Hedhly *et al.*, 2008). Em *Capsicum*, a temperatura, além de interferir na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Reddy e Kakani, 2007; Kafizadeh *et al.*, 2008), também pode afetar as flores (Erickson e Marhart, 2002) e os frutos (Pagamas e Nawata, 2008) das diferentes espécies.

## 2. OBJETIVOS

2.1. Os Objetivos dessa pesquisa foram:

- i) Obter híbridos interespecíficos (HI) em combinações envolvendo espécies de *Capsicum* spp. e verificar a ocorrência de barreiras de incongruidade na obtenção dos HI;
- ii) Estimar o tamanho do genoma de espécies de *Capsicum* e de híbridos interespecíficos via citometria de fluxo;
- iii) Avaliar o efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico e estimar as temperaturas cardinais para a germinação dos grãos de pólen.

### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1. CRUZABILIDADE E AVALIAÇÃO DAS BARREIRAS DE INCONGRUIDADE EM CRUZAMENTOS ENTRE ESPÉCIES DE *Capsicum*

##### 3.1.1. INTRODUÇÃO

*Capsicum* é um gênero economicamente importante da família *Solanaceae*, com várias espécies nativas das regiões tropicais e temperadas das Américas. Cinco espécies são consideradas domesticadas e utilizadas em todo o globo, devido a seus valiosos frutos, que são utilizados como especiarias e vegetais (Andrews, 1995; Pickersgill, 1997).

Os cruzamentos interespecíficos podem permitir o melhoramento de cultivares pela introdução de importantes alelos, tais como os de resistência a patógenos (Moscone *et al.*, 2003). Entretanto, para que seja bem sucedida a transferência de genes entre diferentes espécies, é necessário que as mesmas sejam geneticamente próximas, ou seja, apresentem certa homologia cromossômica, minimizando os problemas de incongruidade e, desse modo, viabilizando o híbrido. Além disso, é imprescindível o conhecimento sobre a direção do cruzamento, uma vez que, em algumas espécies, o cruzamento

interespecífico é efetivo e exclusivo de uma determinada direção (Prestes e Goulart, 1995).

É sabido que as espécies de *Capsicum* são agrupadas em complexos gênicos com base na obtenção de híbridos férteis. Existem barreiras de incongruidade em cruzamentos interespecíficos que podem se manifestar antes da fertilização, chamadas de barreiras pré-zigóticas, e as barreiras após a fertilização conhecidas como barreiras pós-zigóticas. Dentre as primeiras, podem ser citadas a falta de germinação dos grãos de pólen no estigma da planta receptora e o crescimento lento dos tubos polínicos em direção ao óvulo. Já entre as barreiras pós-zigóticas, citam-se a morte do embrião causada pela degeneração do endosperma, a falta de vigor e a esterilidade da planta híbrida obtida (Pickersgill, 1991; 1992; 1997).

Em geral, quanto mais próximas geneticamente são as espécies envolvidas no cruzamento, mais fácil será a obtenção do híbrido e mais fértil será a progênie (Singh, 2002). Assim, a existência de barreiras em cruzamentos interespecíficos indica a distância genética das espécies. A literatura reporta que híbridos interespecíficos podem ser obtidos entre as espécies domesticadas do gênero *Capsicum*, porém os mesmos apresentam graus variados de fertilidade, o que pode ser devido a problemas de pareamento dos cromossomos no híbrido ou devido à presença de diferentes arranjos estruturais cromossômicos (Kumar *et al.*, 1987; Lanteri e Pickersgill, 1993).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a cruzabilidade via obtenção de híbridos interespecíficos e verificar a ocorrência de barreiras de incongruidade manifestadas na obtenção desses híbridos.

### **3.1.2 REVISÃO**

#### **3.1.2.1. O gênero *Capsicum***

O gênero *Capsicum* pertence à família *Solanaceae* sendo representado pelas pimentas e pimentões (Eshbaugh, 1993). As espécies de *Capsicum* podem

ser separadas em três categorias: **domesticadas**, as quais já passaram por um processo de seleção e adaptação de certas características, considerados úteis para suprir necessidades humanas, de tal modo que não são mais capazes de sobreviver em condições naturais; **semidomesticadas**, aquelas selecionadas, cultivadas, mas, ainda, não totalmente domesticadas e que não apresentam diferenças morfológicas significativas em relação às populações silvestres das quais se originaram e **silvestres**, aquelas que podem ser exploradas pelo homem no seu ambiente natural, não ocorrendo, normalmente, em ambientes alterados (Reifschneider, 2000).

O centro de origem do gênero *Capsicum* é a região tropical do Continente Americano, podendo ter sido simultaneamente domesticado em várias partes da América do Sul e Central (Pickersgill, 1991). A origem do gênero é controversa: alguns indicam, como centro primário de diversidade, o México/América Central, sendo o Brasil um centro secundário; enquanto outros propõem, como centro de origem, o Brasil e a Bolívia, com dispersão posterior para os Andes e a América Central (Prince *et al.*, 1995).

O centro primário de diversidade da espécie *C. annuum* var. *annuum* está localizado no México e na América Central, com centros secundários no sudeste e centro da Europa, na África, na Ásia e em partes da América Latina. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum* abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru e Bolívia e o sul e o sudeste do Brasil. *C. chinense* tem a Amazônia como área de maior diversidade, sendo considerada a mais brasileira de todas as pimentas. *C. frutescens* se distribui desde as terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas, no Caribe, sendo muito cultivada no sudeste dos Estados Unidos. Já *C. pubescens* é, notadamente, uma espécie de terras altas, adaptadas a temperaturas baixas, tendo como centro de diversidade a Bolívia (Carvalho e Bianchetti, 2008). O Brasil é considerado como um importante centro secundário de várias espécies como *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, este último tendo a bacia amazônica como área de maior diversidade. As espécies semidomesticadas e silvestres, por sua vez, restringem-se à região andina e à região litorânea brasileira (Reifschneider, 2000).

Dentre as 30 espécies já identificadas (Moscone *et al.*, 2007), cinco delas são cultivadas e utilizadas pelo homem: *C. annuum* var. *annuum*; *C. baccatum*

var. *baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Belletti *et al.*, 1998). Representantes silvestres de todas essas espécies são conhecidos, com exceção de *Capsicum pubescens* (Paran *et al.*, 1998), que, por sua vez, é a única não cultivada no Brasil (Casali e Couto, 1984).

As espécies de *Capsicum* também podem ser diferenciadas tomando por base a coloração das flores, sendo divididas em dois grupos: o grupo das flores brancas e o grupo das flores púrpuras. No grupo das flores brancas, estão as espécies cultivadas *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e as espécies semidomesticadas *C. praetermissum*, *C. chacoense* e *C. galapagoense*. O grupo de flores púrpuras inclui as espécies *C. pubescens*, *C. eximium*, *C. cardenasii* e *C. tovarii* (Pickersgill, 1991).

Os caracteres reprodutivos típicos do gênero *Capsicum* são as flores hermafroditas, com cinco anteras e um único estigma, com algumas cultivares de pimentão podendo apresentar seis anteras. O comprimento do estilete varia entre as espécies, e o estigma já está receptivo na fase de botão, assim como duas a três horas após a abertura da flor (Casali e Couto, 1984). Nas espécies cultivadas, o estigma encontra-se na mesma altura das anteras, o que aumenta a chance de autopolinização e, como consequência, diminui a taxa de fecundação cruzada (Pickersgill, 1991).

A diversidade encontrada em *Capsicum* é ampla, com grande variedade de formatos, tamanhos, cores e sabores de fruto, e, também, com diferentes pungências, arquitetura de planta e composição nutricional (Bosland e Votava, 2000). Características, como a coloração e o número de flores por nó, a coloração, posição e o formato dos frutos (Teixeira, 1996), além das características bioquímicas e citológicas, têm permitido a distinção entre diferentes espécies (McLeod *et al.*, 1983).

No gênero *Capsicum*, são encontradas espécies diplóides com número de  $2n=2x=24$  e  $2n=2x=26$  cromossomos (Pozzobon *et al.*, 2006; Moscone *et al.*, 2007). Segundo Moscone *et al.*, (2007),  $n=12$  corresponde à condição ancestral em *Capsicum*, enquanto  $n=13$  teria surgido depois, na evolução do gênero, provavelmente devido a uma fissão cêntrica. Já Pozzobon *et al.*, (2006) sugerem que a direção filogenética do número básico de cromossomos de *Capsicum* teria sido de  $n=13$  para  $n=12$  cromossomos devido à perda de um par de cromossomos.

As espécies domesticadas são autógamas (Reifschneider, 2000) com taxa de polinização cruzada, que pode ser tão baixa quanto 2%; porém, em espécies silvestres, é possível obter-se taxa de cruzamento de 90% (Pickersgill, 1997) devido, por exemplo, à presença de estilete mais comprido ultrapassando a altura das anteras, o que dificulta a autopolinização e aumenta a possibilidade da ocorrência de polinização cruzada (Nascimento *et al.*, 2006).

Uma característica exclusiva do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de capsaicinóides. Tais alcalóides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho *et al.*, 2003). Dentre os capsaicinóides, o componente mais importante é a capsaicina (cerca de 70%), seguido da dihidrocapsaicina (cerca de 20%) e de outros componentes em menor número, como a nordihidrocapsaicina, a homocapsaicina e a homodihidrocapsaicina (Lopes, 2008).

### 3.1.2.2. Complexos gênicos

Tomando por base a facilidade de cruzamento entre as espécies e a fertilidade do híbrido, Harlan e De Wet (1971) propuseram os complexo gênicos, que, dependendo da facilidade ou dificuldade em obter híbridos, podem ser: **1-complexo gênico primário**, em que o germoplasma pode ser cruzado facilmente, resultando em híbridos com alta fertilidade e, conseqüentemente, assegurando a transferência do gene; **2-complexo gênico secundário**, no qual o cruzamento e a transferência gênica são mais difíceis, requerendo técnicas mais elaboradas. Híbridos entre elementos do complexo gênico secundário e a espécie ou cultura em questão são, de algum modo, debilitados ou estéreis; **3-complexo gênico terciário**, em que, embora cruzamentos possam ser feitos com grandes dificuldades, o híbrido resultante é estéril ou inviável.

*Capsicum* é classificado em três complexos gênicos: **1) Complexo C. annuum**: compreende as espécies *C. annuum* (variedades *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense* e *C. galapagoense* (Pickersgill, 1971; Zijlstra *et al.*, 1991); **2) Complexo C. baccatum**: espécies *C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* e *praetermissum*) (Pickersgill, 1991; Zijlstra *et al.*, 1991) e *C. tovarii* (Tong e Bosland, 1999); e **3) Complexo C.**

**pubescens:** *C. cardenasii*, *C. eximium* e *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Zijlstra *et al.*, 1991).

Esses complexos foram formados de acordo com a estrutura dos cromossomos, bandeamento isoenzimático e polimorfismo de DNA cloroplastídico. O cruzamento interespecífico entre espécies de um mesmo complexo é tido como possível, o mesmo não acontecendo para cruzamento entre espécies de complexos diferentes em que podem ocorrer barreiras de pré e pós-fertilização.

Cruzamentos interespecíficos entre espécies de um mesmo complexo são relativamente fáceis de serem realizados (Choong, 1998), e, embora as barreiras entre os complexos gênicos possam ser quebradas, raramente isso ocorre na natureza (Eshbaugh, 1993).

#### **3.1.2.2.1. O Complexo *annuum***

Com base na cruzabilidade, o complexo *annuum* é formado pelas espécies domesticadas *C. annum*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Pickersgill, 1991). As espécies do complexo *annuum* são as mais cultivadas, tanto nas Américas como em todo o mundo (Pickersgill, 1997). Todos os acessos apresentam flores brancas ou branco-esverdeadas, além da capacidade de se intercruzarem, embora a fertilidade de alguns híbridos seja comprometida (Smith e Heiser, 1957). As espécies mais próximas entre si, dentro do complexo, são *C. chinense* e *C. frutescens* (Pickersgill, 1991). Segundo o IPGRI (1995), a principal diferença entre elas é a presença de uma constrição anular no cálice, característica da espécie *C. chinense*.

*Capsicum annum* é a espécie mais cultivada e economicamente importante do gênero (Heiser Jr., 1976), sendo considerada a espécie domesticada mais conhecida no mundo (Eshbaugh, 1993). Isso se deve, em parte, ao fato de ter sido a primeira pimenta descoberta por Colombo (Paran *et al.*, 1998) e, logo em seguida, ter sido dispersada para outros países (Eshbaugh, 1993). Essa espécie possui duas formas botânicas: *C. annum* var. *annuum* (pimentão e pimentas) e *C. annum* var. *glabriusculum* (pimenta ornamental) (Viñals *et al.*, 1996).

Pertencem à espécie *C. annuum* as variedades mais comuns do gênero *Capsicum*, como pimentões doces, pimentas doces para páprica, pimenta “jalapeño” e algumas poucas cultivares ornamentais (Reifschneider, 2000). Essa espécie não é bem adaptada às planícies úmidas dos trópicos, onde, pelo menos na América Latina, é substituída por *C. frutescens* e *C. chinense* (Pickersgill, 1997).

*Capsicum chinense* é a espécie de pimenta mais difundida na América tropical, sendo encontrada na região Amazônica (Bosland, 1992), seu provável centro de diversidade (Reifschneider, 2000). Algumas variedades dessa espécie, encontradas em cultivo na África, são reportadas como as mais pungentes de todas as pimentas (Heiser Jr., 1976). É, também, muito cultivada nas Índias Ocidentais, norte da América do Sul, na Bacia Amazônica, Peru e Bolívia (Pickersgill, 1971). Segundo Eshbaugh (1993), a expansão global mais limitada da espécie *C. chinense* se deve, mais provavelmente, à sua descoberta na América do Sul, depois de *C. annuum* já ter sido estabelecida no Continente Europeu.

*C. frutescens* tem ampla distribuição nos trópicos, são pimentas extremamente pungentes (Heiser Jr., 1976), que, aparentemente, possuem uma única forma domesticada, popularmente chamada de “tabasco”. Foi sugerido que *C. frutescens*, em sua forma primitiva, possa ser ancestral de *C. chinense*, visto que as mesmas são muito próximas e, no passado, já foram consideradas como a mesma espécie (Heiser Jr, 1976; Reifschneider, 2000).

#### **3.1.2.2.2. O Complexo *baccatum***

Dentro do complexo *baccatum*, encontram-se as espécies *C. baccatum* (Pickersgill, 1991) e *C. tovarii* (Tong e Bosland, 1999). A espécie *C. baccatum* é comumente cultivada na América do Sul, onde, também, é chamada de “aji” (Bosland, 1996). No entanto, essa espécie é pouco conhecida fora do continente sul-americano (Heiser Jr., 1976), apesar de ser, também, encontrada no México, na Índia e no Hawaí (Eshbaugh, 1993).

O nome “*baccatum*” significa fruto igual à baga, fruto pequeno, pois os frutos dessa espécie de pimenta são bem pequenos, arredondados ou ovalados. Existem, dentro desse grupo, cultivares considerados doces (Reifschneider,

2000), além das pimentas mais picantes (tanto frescas quanto secas) dos países andinos (Pickersgill, 1997).

Dentro de *C. baccatum*, existem as variedades botânicas *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum* (DeWitt e Bosland 1993) e *C. baccatum* var. *praetermissum*. *C. baccatum* var. *pendulum* é representada, no Brasil, pelas pimentas “Dedo-de-moça” e “Cambuci” ou “Chapéu-de-frade”, sendo, preferencialmente, encontrada na Região Sul, mas também tendo boa representatividade na Região Sudeste (Carvalho e Bianchetti, 2008).

*C. baccatum* var. *baccatum*, também conhecida como “Cumari verdadeira” ou “Pimenta de passarinho” (Carvalho e Bianchetti, 2008), é tida como provável ancestral da variedade cultivada *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (Moscone et al., 1996). Já *C. baccatum* var. *praetermissum* é conhecida pelas mesmas denominações das pimentas variedade *baccatum*. Sua ocorrência é restrita ao Brasil, sendo encontrada, principalmente, na Região Centro-Oeste e, de forma significativa, também na Região Sudeste. Os frutos de ambas as variedades semidomesticadas de *C. baccatum* possuem aroma suave e pungência elevada, sendo utilizados em conserva (Carvalho e Bianchetti, 2008).

### **3.1.2.3. Hibridação Interespecífica no gênero *Capsicum***

A hibridação interespecífica permite a transferência de genes de interesse agrônomo entre espécies diferentes, principalmente aqueles envolvidos na resistência a doenças (Bosland e Votava, 2000), permitindo ao melhorista desenvolver materiais geneticamente superiores.

Um fluxo gênico pode ser mantido entre as espécies melhoradas do gênero *Capsicum* e seus parentes domesticados, semi-domesticados e silvestres, que são portadores de genes de interesse agrônomo como resistência a pragas e doenças, entre outros (Nass et al., 2001). A introdução de genes que conferem resistência a doenças em *C. annuum*, a partir de outras espécies do gênero, é uma das mais bem sucedidas aplicações da hibridação interespecífica dentro do gênero para o melhoramento da cultura (Russo, 2012). Por exemplo, a introgressão de genes de resistência ao vírus TMV de *C. chinense* e *C. chacoense* em *C. annuum* (Pickersgill, 1997).

Dentro do gênero *Capsicum*, o cruzamento entre espécies diferentes tem sido realizado com graus de sucesso variados (Nwankiti, 1976; Kumar *et al.*, 1987; Jarret e Dang, 2004; Panda *et al.*, 2004; Baral e Bosland, 2004). Limitações ocorrem devido a problemas como incompatibilidade unilateral e aborto das sementes (Pickersgill, 1997). A incompatibilidade unilateral ocorre quando, em um cruzamento recíproco, o tubo polínico atinge e fertiliza o óvulo em uma direção do cruzamento, mas é inibido no estigma, estilete ou ovário na outra direção. Esse tipo de barreira ocorre no gênero *Capsicum* entre o complexo *C. pubescens* e todas as demais espécies do gênero. Como resultado, os tubos polínicos das espécies do complexo *C. pubescens* crescem, normalmente, através do estigma e estilete de outras espécies, mas o pistilo das espécies, no complexo *C. pubescens*, inibe o crescimento do tubo polínico de todas as outras espécies (Onus e Pickersgill, 2004).

Frutos obtidos via hibridações interespecíficas podem apresentar sementes inviáveis, porque a fertilização não ocorreu ou porque as sementes abortaram após a fertilização (Pickersgill, 1991). No caso do aborto da semente, o endosperma se desenvolve de forma lenta, retardando o desenvolvimento do embrião. Como consequência, cerca de duas semanas depois, o saco embrionário colapsa (Pickersgill, 1997).

### **3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.3.1. Material Genético e Condições de Cultivo**

Foram utilizados a variedade Casca Dura Ikeda (*C. annuum*) e mais quatro acessos do gênero *Capsicum*, que fazem parte da coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF): UENF 1785 (*C. chinense*), UENF 1636 (*C. frutescens*), UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*) e UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*).

As sementes foram, inicialmente, colocadas para germinar em B.O.D. a 27,5°C, em 8 horas de luz e 16 horas de escuro e, posteriormente, plantadas em

casa de vegetação em bandejas de isopor com substrato vegetal Vivatto®, sendo dez plantas por espécie. Cerca de dois meses após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 5L, utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal. As adubações de cobertura e defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças foram empregados de acordo com as recomendações para a cultura (Filgueira, 2000).

O presente trabalho foi conduzido na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), e todas as análises foram realizadas no Setor de Citogenética Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF.

### **3.1.3.2. Métodos**

#### **3.1.3.2.1. Obtenção dos híbridos interespecíficos**

Os híbridos interespecíficos foram obtidos a partir de cruzamentos manuais e controlados entre espécies pertencentes ao complexo *annuum* e ao complexo *baccatum*. Foram realizados 314 cruzamentos entre novembro de 2012 e julho de 2013, sempre no horário entre 05h30min e 7h30min.

Para isso, genótipos que foram utilizados como doadores de pólen tiveram flores em antese identificadas, coletadas pela manhã e colocadas para secar com o auxílio de lâmpadas incandescentes, visando à deiscência das anteras. Os grãos de pólen foram, então, retirados, colocados em cápsulas, e conservados em geladeira.

Nas plantas receptoras de grãos de pólen, foram identificadas flores em antese, que foram emasculadas com o auxílio de uma pinça, anteriormente à polinização. Com o auxílio de um palito de madeira, os grãos de pólen foram, então, transferidos para o estigma da planta receptora. Após esse procedimento, as flores foram protegidas por um saco de papel para evitar a contaminação com pólen dos demais genitores, e os cruzamentos foram identificados com o uso de etiquetas e lãs coloridas (Figura 1).



Figura 1. Etapa dos cruzamentos entre genitores do gênero *Capsicum*: A) Identificação da flor; B) Retirada das pétalas; C) Retirada das anteras; D) Botão floral emasculado; E) Polinização; F) Botão floral polinizado e protegido.

### 3.1.3.2.2. Frutos sem sementes e/ou com sementes anormais (chochas)

Para avaliar a ocorrência de barreira de pós-fertilização, foram registrados o número de cruzamentos realizados em ambas as direções, e, 48 horas após a polinização, os cruzamentos foram observados para verificar o pegamento dos frutos, sendo registrado posteriormente, o número de frutos com e sem sementes.

Os frutos procedentes dos cruzamentos manuais foram colhidos maduros e as sementes híbridas foram extraídas manualmente, secas à temperatura ambiente e conservadas em geladeira para posterior semeadura. Os híbridos que atingiram a fase adulta de planta foram caracterizados de acordo com os descritores do IPGRI (1995). Foi, também, registrado o número de frutos em cruzamentos recíprocos para verificar se há a manifestação de incompatibilidade unilateral na combinação e verificar em qual direção se obtém mais sucesso.

#### **3.1.3.2.3. Viabilidade/Fertilidade do híbrido interespecífico**

A esterilidade masculina das plantas híbridas foi avaliada via teste de viabilidade polínica. Para tal, botões florais na antese foram coletados pela manhã, fixados em etanol 70% e armazenados em *freezer* (-10 °C), até o momento do preparo das lâminas.

A viabilidade foi estimada via coloração tripla de Alexander, e, para o preparo das lâminas, as anteras foram cortadas transversalmente com o auxílio de um bisturi e, em seguida, maceradas com um escalpelo, visando à liberação dos grãos de pólen sobre 10µL do corante Alexander (Alexander, 1969). Após a retirada dos debris, o material foi coberto com uma lamínula e observado ao microscópio.

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura, e, para cada combinação híbrida, foram feitas oito lâminas, sendo contados 250 grãos de pólen/lâmina, perfazendo um total de 2000 grãos de pólen por combinação híbrida. Grãos de pólen viáveis foram detectados pela presença de cor vermelha ou púrpura no protoplasto, enquanto que os grãos de pólen inviáveis foram identificados pela coloração verde, com ausência de citoplasma ou com citoplasma contraído ou enrugado.

As preparações foram analisadas ao microscópio ótico BX60, e as imagens digitalizadas foram capturadas, utilizando-se o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, *Media Cybernetics*).

#### **3.1.3.2.4. Barreiras de pré-fertilização: Germinação e crescimento do tubo polínico *in vivo***

Uma das primeiras barreiras de pré-fertilização ocorre na germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico. Assim, para observarmos a ocorrência desta barreira, foram realizadas polinizações cruzadas e autofecundações controladas nos acessos envolvidos nas combinações que não formaram frutos: *C. annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. baccatum* var. *baccatum* x *C. frutescens*; *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. frutescens*.

Após as polinizações, os estigmas foram tratados conforme Dafni (1992). Assim, os botões florais foram coletados 24, 48 e 72 horas após a realização das polinizações e os pistilos fixados em FAA (Formalina 37%, Ácido acético e Álcool 70%) na proporção de 5:5:90 por 24 horas. Foram coletados cinco botões florais por horário para cada acesso e cada combinação híbrida, totalizando 15 botões para cada parental e combinação híbrida.

Posteriormente, os pistilos polinizados foram lavados três vezes em água destilada e conservados em álcool 70%. Após essa etapa, o estigma, estilete e ovário foram amaciados em hidróxido de sódio 8N, por 8 horas; novamente lavados em água destilada por cinco vezes, com duração de cinco minutos cada lavagem e corados em solução de anilina azul 0,1% diluída em acetato de potássio (0,1 M), durante 4 horas.

Os tecidos corados foram separados em duas partes, a primeira constando do estigma e estilete e a segunda do ovário, sendo feitas 10 lâminas por horário testado, por combinação. Os pistilos foram observados em microscópio óptico de fluorescência Olympus BX 60. A avaliação consistiu na observação dos grãos de pólen germinados no estigma e na presença de tubos polínicos no estilete e no ovário.

### **3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1.4.1. Obtenção dos híbridos interespecíficos**

De 314 polinizações manuais realizadas entre as diferentes espécies de *Capsicum*, foram obtidos 63 frutos com sementes, o que corresponde a 20,06%

de sucesso na obtenção de frutos (Tabela 1; Figura 2 e 3).

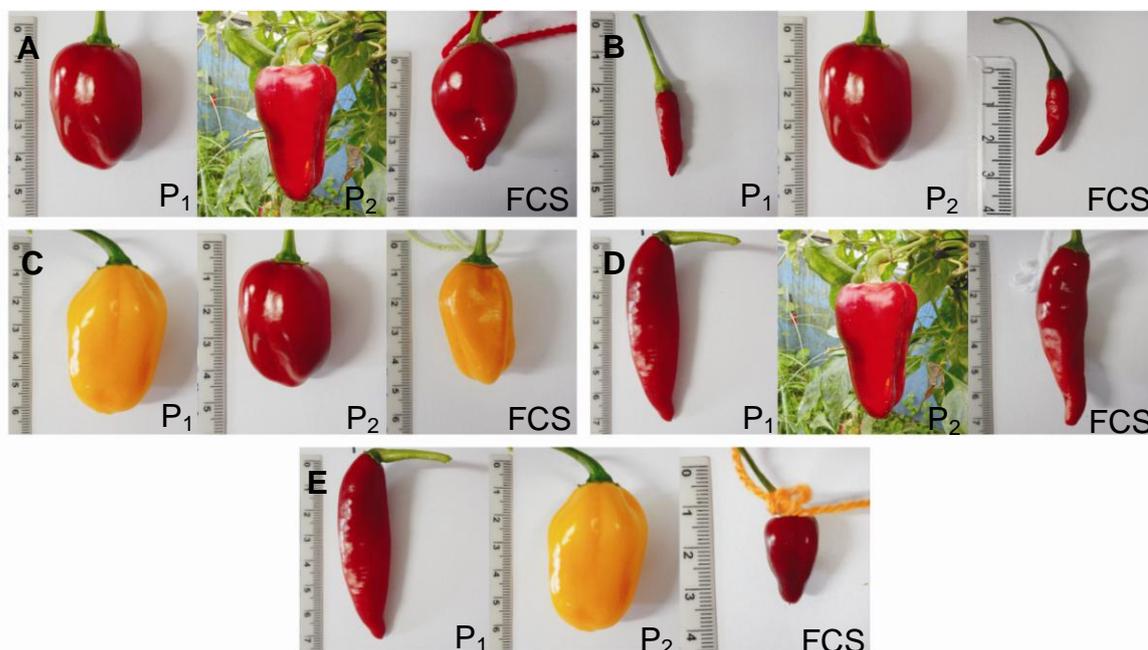


Figura 2. Frutos dos genitores e frutos com sementes  $F_1$  obtidos após os cruzamentos entre espécies de diferentes complexos gênicos: A) UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*) x 'Casca Dura Ikeda' (*C. annuum* var. *annuum*); B) UENF 1636 (*C. frutescens*) x UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*); C) UENF 1785 (*C. chinense*) x UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*); D) UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*) X 'Casca Dura Ikeda' (*C. annuum* var. *annuum*); E) UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*) x UENF 1785 (*C. chinense*).  $P_1$ =Genitor feminino;  $P_2$ =Genitor masculino; FCS=Fruto com semente  $F_1$ .

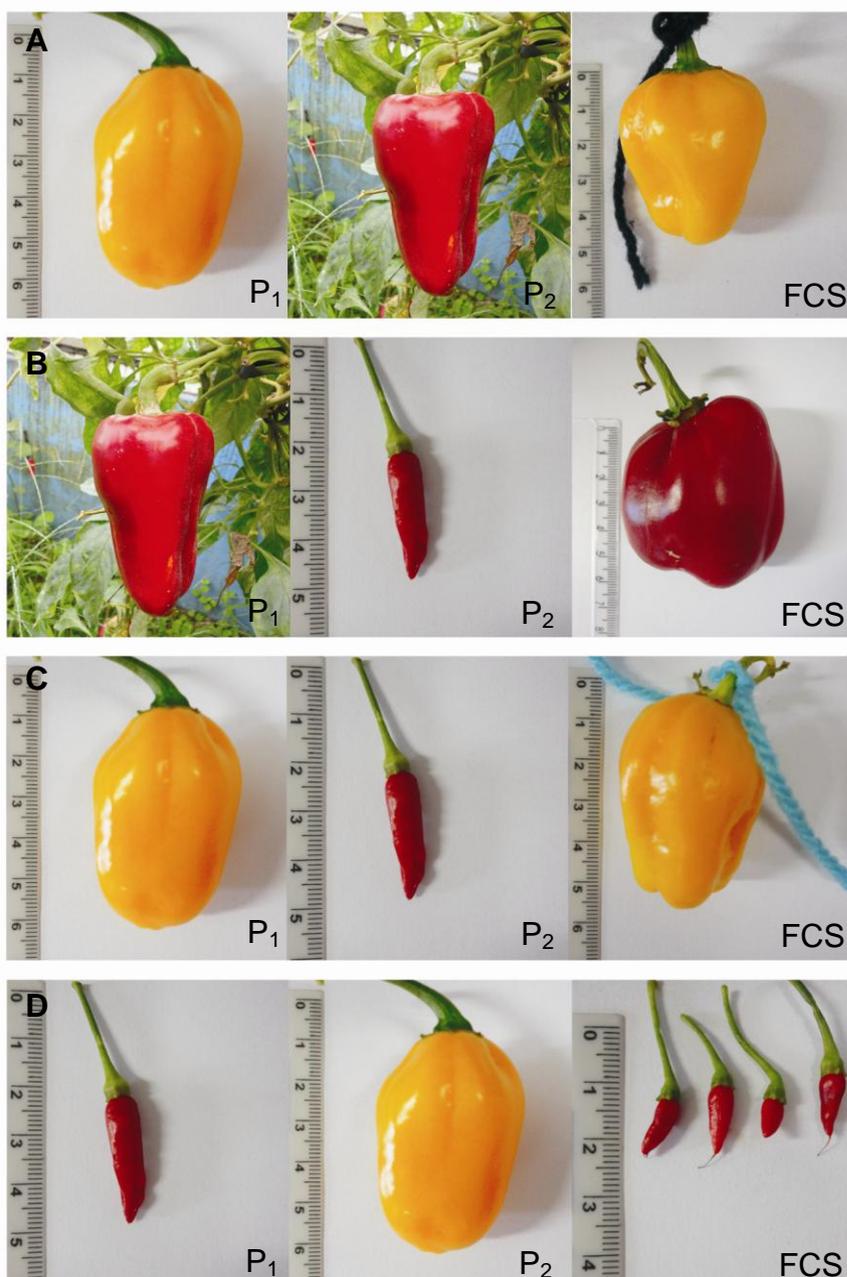


Figura 3. Frutos dos genitores e frutos com sementes  $F_1$  obtidos após os cruzamentos entre espécies do complexo *annuum*: A) UENF 1785 (*C. chinense*) x 'Casca Dura Ikeda' (*C. annuum* var. *annuum*); B) 'Casca Dura Ikeda' (*C. annuum* var. *annuum*) x UENF 1636 (*C. frutescens*); C) UENF 1785 (*C. chinense*) x UENF 1636 (*C. frutescens*); D) UENF 1636 (*C. frutescens*) x UENF 1785 (*C. chinense*). P<sub>1</sub>=Genitor feminino; P<sub>2</sub>=Genitor masculino; FCS=Fruto com semente  $F_1$ .

A literatura reporta que a obtenção de híbridos interespecíficos entre as espécies que compõem o Complexo *annuum* com as do Complexo *baccatum* é difícil, sendo essa transferência de gene bastante prejudicada em função das barreiras de fertilização entre as espécies (Yoon e Park, 2005; Yoon et al., 2006). Entretanto, apesar dessa incongruidade entre as espécies, foi possível a obtenção de híbridos (Tabela 1). Observa-se que, em algumas combinações, houve a produção de frutos, mas não de plantas, combinações que geraram frutos e plantas e combinações que não geraram frutos e, conseqüentemente, nem plantas.

Tabela 1. Número de flores polinizadas (NFP), número de frutos com sementes F<sub>1</sub> (NFCS) e número de plantas adultas (NPA) obtidas nos diferentes cruzamentos entre as espécies de *Capsicum*

Complexos	Genitor feminino	Genitor masculino	NFP	NFCS	NPA
Complexo <i>annuum</i> x Complexo <i>baccatum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	31	02	00
	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	16	00	00
	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	<i>C. frutescens</i>	23	00	00
	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	07	03	01
	<i>C. frutescens</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	04	01	01
	<i>C. chinense</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	09	05	00
<b>Subtotal 1</b>			<b>90</b>	<b>11</b>	<b>02 (2,2%)<sup>1</sup></b>
Complexo <i>annuum</i> x Complexo <i>annuum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	29	03	00
	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. chinense</i>	07	01	00
	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. frutescens</i>	25	00	00
	<i>C. frutescens</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	06	06	04
	<i>C. chinense</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	06	03	00
	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	35	00	00
<b>Subtotal 2</b>			<b>108</b>	<b>13</b>	<b>04 (3,7%)<sup>1</sup></b>
Complexo <i>annuum</i> x Complexo <i>annuum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. chinense</i>	06	01	01
	<i>C. chinense</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	19	14	01
	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. frutescens</i>	27	05	00
	<i>C. frutescens</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	23	05	00
	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>	21	04	00
	<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i>	20	10	15
<b>Subtotal 3</b>			<b>116</b>	<b>39</b>	<b>17 (14,65%)<sup>1</sup></b>
<b>Total Geral</b>			<b>314</b>	<b>63</b>	<b>23</b>

<sup>1</sup>/ Taxa de cruzabilidade

### **Complexo *annuum* versus Complexo *baccatum***

A taxa de cruzabilidade entre espécies do Complexo *annuum* e do Complexo *baccatum* variou de 2,2% a 3,7% (Tabela 1). Observa-se que, nos cruzamentos envolvendo *C. baccatum* var. *baccatum*, como receptor de pólen, com os acessos das espécies do complexo *annuum*, foram obtidos dois frutos (*C. baccatum* var. *baccatum* x *C. annuum* var. *annuum*), porém os mesmos não resultaram em plantas adultas. Na direção inversa, obtiveram-se nove frutos, sendo que, no final, apenas duas plantas híbridas atingiram a fase adulta (*C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*; *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum*). Nas combinações envolvendo *C. baccatum* var. *pendulum*, foram realizadas 108 polinizações controladas, tendo sido obtidos 13 frutos, que resultaram em 04 plantas. Nascimento *et al.*, (2012), ao avaliarem a compatibilidade de cruzamentos entre algumas espécies de *Capsicum*, observaram que a combinação *C. baccatum* x *C. chinense* não foi compatível, apresentando 0% de pegamento dos frutos. Já o cruzamento recíproco mostrou 50% de pegamento.

Uma das barreiras mais presentes nos cruzamentos foi a formação de frutos com sementes anormais, de tamanho diferente da dos genitores e de coloração escura, indicando degeneração e morte das mesmas (Figura 4).

Apesar de algumas das sementes provenientes da combinação *C. chinense* x *C. baccatum* (ambas as variedades) serem, morfológicamente, normais, nenhuma delas germinou, enquanto que, nos cruzamentos entre as espécies *C. annuum* e *C. baccatum*, apenas uma semente germinou e culminou com a obtenção de uma planta adulta (*C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*).

O fruto formado na combinação *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum* apresentou apenas 13 sementes, sendo que sete delas germinaram, mas apenas uma deu origem a uma planta. As demais plântulas não sobreviveram. Os seis frutos do cruzamento *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum* deram origem a 99 sementes. Dessas, 12 sementes germinaram e quatro plantas foram obtidas.

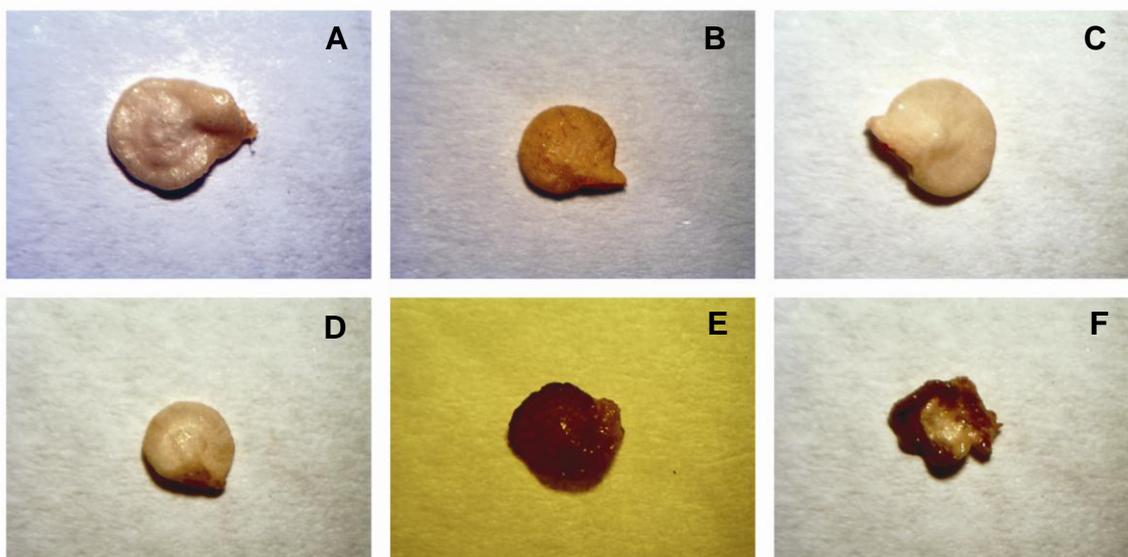


Figura 4. Sementes dos frutos provenientes da autofecundação das espécies genitoras e sementes  $F_1$ : A) *C. chinense*; B) *C. baccatum* var. *pendulum*; C) *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. chinense*; D) *C. baccatum* var. *baccatum*; E) *C. chinense* x *C. baccatum* var. *pendulum*; F) *C. chinense* x *C. baccatum* var. *baccatum*.

Segundo Pickersgill (1991), o aborto do embrião é uma característica comum em cruzamentos interespecíficos em *Capsicum*. O endosperma se desenvolve, anormalmente, devagar, levando a diminuição do desenvolvimento embrião, e, depois de cerca de duas semanas, o saco embrionário colapsa (Pickersgill 1997). Sementes chochas ou degeneradas são consideradas como barreiras de pós-fertilização na maioria dos cruzamentos (Jansky, 2006), podendo ocorrer a degeneração do endosperma e posterior morte do embrião (Rodrangboon *et al.*, 2002). Campos (2006) não conseguiu resultados satisfatórios na hibridação entre *C. baccatum* e *C. chinense*, obtendo apenas sete frutos com sementes com características morfológicas normais e 32 frutos híbridos sem sementes ou com sementes inviáveis, sendo obtidas, ao final, apenas duas plantas de uma mesma combinação. As sementes inviáveis resultantes de frutos dos cruzamentos apresentaram, como principal característica, tamanho reduzido em relação às sementes dos genitores e formato atípico.

Algumas vezes, frutos com sementes são obtidos, porém a germinação e o vigor das plantas são muito baixos, não permitindo que essas sementes cheguem a representar plantas. Nascimento *et al.*, (2011), avaliando o vigor e a

germinação de sementes híbridas de pimenteiras ornamentais de *Capsicum*, observaram uma variação de vigor de 0 a 100%, sendo observado 0% de vigor entre *C. baccatum* x *C. chinense*. Já o cruzamento recíproco obteve valor de vigor e de germinação de 80% e 70% respectivamente.

Cheng *et al.*, (2007), realizando cruzamentos entre as cinco espécies de *Capsicum* domesticadas, observaram que, nos cruzamentos envolvendo as espécies *C. chinense* e *C. baccatum*, as sementes obtidas não germinavam quando *C. baccatum* era utilizado como doador de pólen. No cruzamento recíproco, as sementes obtidas germinavam parcialmente, mas as plantas não sobreviviam ou apresentavam um crescimento anormal. Já Yoon e Park (2005) obtiveram uma alta compatibilidade quando *C. baccatum* foi utilizado como genitor feminino; no entanto, o cruzamento recíproco não foi testado no trabalho.

Pickersgill (1971) observou que o cruzamento entre *C. annuum* e *C. baccatum* também resultou em sementes F<sub>1</sub> inviáveis. Segundo Yoon *et al.*, (2006), em cruzamentos entre *C. annuum* x *C. baccatum*, o aborto do embrião ocorre 15 dias após a polinização, sendo essa a primeira barreira genética na hibridação entre as espécies. Eles conseguiram plantas híbridas, fazendo o resgate de embrião e, depois, utilizaram as plantas como receptoras de pólen em retrocruzamentos, obtendo, assim, as gerações necessárias.

Outra anormalidade observada foi o secamento de frutos polinizados ainda na planta mãe; essa anormalidade foi observada no cruzamento *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. annuum*, sendo que, dos oito frutos obtidos, quatro secaram, ainda, na planta mãe antes do início da maturação e não apresentavam sementes (Figura 5). O outro fruto resultante do cruzamento foi perdido ainda verde, mas o mesmo possuía uma aparência normal (Figura 5).

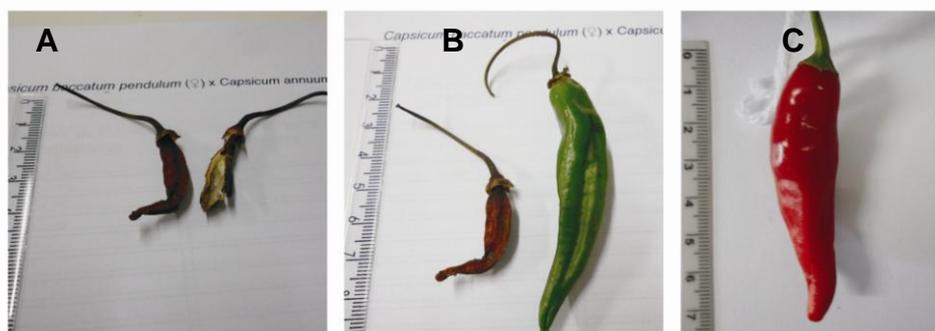


Figura 5. Frutos obtidos após o cruzamento *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. annuum*: A) Frutos secos; B) Frutos seco e imaturo; C) Fruto de aparência normal.

Outra barreira de pós-fertilização, relatada em várias espécies, é a fraqueza do híbrido (*hybrid weakness*) ou necrose do híbrido (*hybrid necrosis*). Essa anomalia é definida como uma série de características fenotípicas que são similares às aquelas associadas com resposta ao estresse ambiental, incluindo ataque de patógenos e doenças virais (Bombliés e Weigel, 2007). Esse tipo de manifestação foi observado na combinação *C. frutescens* x *C. baccatum* (Figura 6); além disso, algumas plântulas obtidas nos cruzamentos entre *C. frutescens* e *C. baccatum*, mas que não chegaram a se desenvolver, morrendo ainda jovens, apresentavam as folhas cotiledonares deformadas, com baixo desenvolvimento. Segundo Yazawa *et al.*, (1989), híbridos com crescimento anormal e o encolhimento das folhas são características, tipicamente, encontradas em cruzamentos envolvendo essas duas espécies.

Essa anormalidade, também, já foi relatada em combinações híbridas de *C. annuum* x *C. baccatum* e, de acordo com os autores, é devido à influência citoplasmática (Pickersgill, 1971). De acordo com Csilléry (2013), plantas mutantes surgem espontaneamente, devido a um possível efeito mutagênico da hibridação interespecífica, porém o ambiente, também, pode contribuir para o surgimento dessa anomalia.

Observou-se, também, que, em apenas uma direção, foi que se obteve sucesso. Quando *C. frutescens* foi utilizada como genitor feminino, a maioria das polinizações resultaram em fruto, porém, na direção contrária, não se obteve fruto (Tabela 1). Esse comportamento pode ser considerado como uma incompatibilidade unilateral. A incompatibilidade unilateral ocorre quando os tubos polínicos alcançam e fertilizam os óvulos em um cruzamento feito em uma direção, mas são inibidos no estigma, estilete ou ovário no cruzamento recíproco, fazendo com que as polinizações entre as espécies ocorram com sucesso, apenas, em uma direção (Onus e Pickersgill, 2004).

Bapa Rao *et al.*, (1992) obtiveram três combinações híbridas nos cruzamentos envolvendo *C. baccatum* e *C. frutescens*, também observando uma incompatibilidade unilateral, só que, nesse caso, híbridos entre as espécies foram obtidos, apenas, quando a espécie *C. baccatum* foi utilizada como genitor feminino.



Figura 6. Aspecto anormal das plantas híbridas obtidas dos cruzamentos *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum* (A-H) e *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum* (I-L).

### **Complexo *annuum* versus Complexo *annuum***

A taxa de cruzabilidade dentro do Complexo *annuum* foi de 14,65%, sendo realizadas 116 polinizações controladas, obtidos 39 frutos e 17 plantas; dessas, 15 foram obtidas entre *C. chinense* x *C. frutescens* (Tabela 1).

### ***C. annuum* x *C. chinense***

Apesar de ter sido obtido um número razoável de frutos nos cruzamentos envolvendo as espécies *C. annuum* var. *annuum* e *C. chinense*, só duas plantas adultas foram obtidas (Tabela 1), visto que a maioria das sementes possuíam formato e coloração anormais, não germinando. As demais sementes que germinaram não chegaram a emitir folhas definitivas e não sobreviveram. Em ambas as combinações, todos os frutos possuíam coloração vermelha, independente da direção de cruzamento, mostrando que a cor vermelha de *C. annuum* var. *annuum* predominou sobre a cor alaranjada de *C. chinense* (Figura 7).

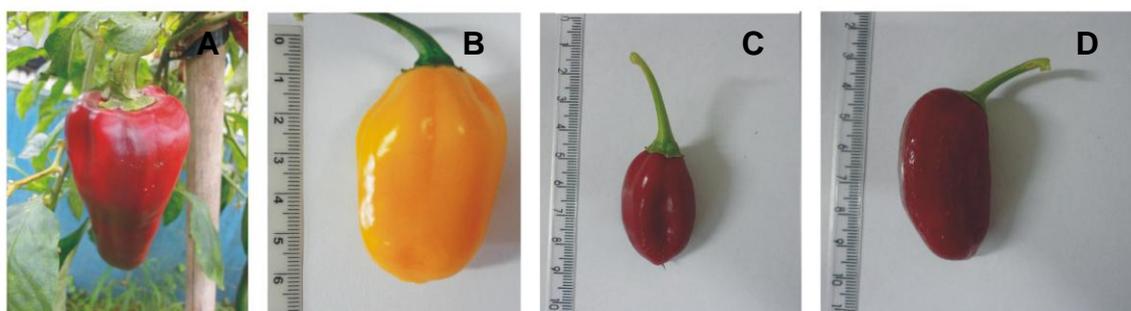


Figura 7. Frutos provenientes da autofecundação das espécies genitoras e frutos provenientes dos híbridos  $F_1$ : A) *C. annuum* var. *annuum*; B) *C. chinense*; C) *C. annuum* var. *annuum* x *C. chinense*; D) *C. chinense* x *C. annuum* var. *annuum*.

Costa *et al.*, (2009) avaliaram a compatibilidade do cruzamento entre *C. chinense* e *C. annuum* e o vigor e a germinação das sementes dos híbridos interespecíficos. Os autores observaram que todos os cruzamentos interespecíficos realizados produziram frutos com taxas de pegamento variando de 8,9 % a 40,0 % e a germinação das sementes variou de 0,0 % a 87,5 %. Taxas de pegamento elevadas foram, também, obtidas por Ribeiro e Melo (2005) que observaram valores de 73,5 a 100%, usando *C. chinense* como genitor feminino e 87,5 a 91,5 % com *C. chinense* como doador de pólen.

Casali (1970) observou valores mais baixos, com a germinação variando de 0% a 6,6% quando *C. chinense* foi o genitor feminino e de 0% a 47% no cruzamento recíproco. Segundo Kumar *et al.*, (1987), apesar de cruzamentos recíprocos entre essas duas espécies produzirem sementes viáveis, híbridos  $F_1$

viáveis somente podem ser obtidos no cruzamento *C. annuum* x *C. chinense*. As sementes do cruzamento recíproco ou não germinaram, ou morreram após alguns dias.

Subramanya (1982), ao realizar cruzamentos entre *C. annuum* e *C. chinense*, observou uma baixa germinação das sementes em ambos os cruzamentos recíprocos, sendo obtidas plântulas com folhas malformadas e crescimento limitado quando *C. chinense* foi utilizado como genitor feminino, enquanto, no cruzamento recíproco, as plântulas eram, morfologicamente, normais. Zewdie e Bosland (2000) também se depararam com problemas como esterilidade, baixo número de sementes e pouca germinação das mesmas.

Cruzamentos interespecíficos entre essas duas espécies foram realizados por Yoon e Park (2005), visando à superação da barreira genética entre *C. annuum* e *C. baccatum* através da obtenção do cruzamento triplo [(*C. annuum* x *C. chinense*) x *C. baccatum*]. Esses cruzamentos foram determinados com base em resultados de cruzamentos preliminares que mostraram que quase todos os cruzamentos entre *C. baccatum* e *C. annuum* foram incompatíveis e todos os cruzamentos entre *C. baccatum* e *C. chinense* foram compatíveis. Os autores obtiveram muitas plantas híbridas, entre *C. annuum* e *C. chinense*, mostrando crescimento normal.

Estudos realizados por Debbrama *et al.*, (2013) mostraram que os cruzamentos foram muito mais fáceis quando *C. annuum* foi utilizado como genitor feminino. Variação de 0 a 29% de pegamento dos frutos e vigor variando de 0 a 100%, este último dependendo da direção do cruzamento entre *C. chinense* e *C. annuum*, têm sido reportados na literatura (Nascimento *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2012). Cheng *et al.*, (2007), por sua vez, obtiveram frutos sem sementes (*C. chinense* x *C. annuum*) e sementes F<sub>1</sub> com germinação parcial e crescimento anormal das plântulas.

### ***C. chinense* x *C. frutescens***

Das 21 flores de *C. chinense* polinizadas com o pólen de *C. frutescens*, 12 frutos foram obtidos, no entanto apenas quatro deles atingiram a maturação e apresentaram sementes (Tabela 1). Das 125 sementes obtidas, apenas seis germinaram, mas não atingiram a fase adulta. Muitas das sementes geradas, à

semelhança do ocorrido em cruzamentos envolvendo *C. baccatum*, apresentavam formato irregular e coloração escura quando comparado aos pais (Figura 8).



Figura 8. Sementes dos frutos provenientes da autofecundação das espécies genitoras e sementes F<sub>1</sub> A) *C. chinense*; B) *C. frutescens*; C) Combinação híbrida *C. chinense* x *C. frutescens*.

Quando *C. frutescens* foi utilizada como genitor feminino, 20 flores foram polinizadas, sendo obtidos 10 frutos maduros. Os demais foram perdidos ainda no campo. Ao total, foram obtidas 48 sementes que, ao final, resultaram em 15 plantas adultas. O cruzamento entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* é tido como possível, uma vez que pertencem ao mesmo complexo gênico e, dentro do Complexo *C. annuum*, são as espécies mais próximas (Pickersgill, 1991). Apesar das perdas no campo, observa-se uma alta taxa de pegamento dos frutos e um número razoável de sementes híbridas obtidas, mostrando a proximidade entre as espécies.

Egawa e Tanaka (1984), estudando as relações citogenéticas entre *C. chinense* e *C. frutescens*, observaram que os seus híbridos apresentaram 12 bivalentes na meiose, sugerindo uma alta homologia entre elas e que as mesmas não são duas espécies distintas, mas sim uma única espécie envolvendo duas variedades. No entanto, Baral e Bosland (2004), estudando a relação entre as espécies de *C. chinense* e *C. frutescens*, através de diferenças morfológicas, moleculares e de hibridação, concluíram que as duas são espécies distintas. Os autores observaram que as duas espécies são, reprodutivamente, isoladas, devido à parcial esterilidade das progênes híbridas, além da baixa frutificação. Foi possível observar, também, o aborto do embrião, além de frutos sem sementes.

Melo *et al.*, (2010), ao realizarem cruzamentos entre dois acessos de *C. chinense*, como genitores masculinos, e um acesso de *C. frutescens*, alcançaram

uma taxa de pegamento de 64 e 69% para cada um dos cruzamentos, com médias de 6,41 e 6,30 de sementes por fruto e taxa de germinação de 58 e 62% respectivamente. Apesar da facilidade de cruzamento entre as espécies, Olszewska *et al.*, (2011) obtiveram híbridos com plantas anãs e folhas deformadas na combinação *C. frutescens* x *C. chinense*.

Exemplos de hibridação artificial e natural entre *C. chinense* e *C. frutescens* têm sido reportados. A cultivar Greenleaf Tabasco foi desenvolvida por hibridação interespecífica entre essas duas espécies, seguida de repetidos retrocruzamentos com *C. frutescens* (Greenleaf *et al.*, 1970). Já Bosland e Baral (2007) reportaram que a “Bhut Jolokia”, a pimenta mais quente do mundo com um nível de calor 1.001.304 SHU, é um híbrido interespecífico natural entre *C. chinense* e *C. frutescens*.

As 15 plantas híbridas, obtidas na combinação *C. frutescens* x *C. chinense*, apresentaram características intermediárias entre os genitores, como cor das anteras, massa, comprimento, largura e espessura do fruto, apesar do formato do fruto ser semelhante ao do genitor feminino. Em relação à coloração, os frutos possuíam cor vermelha, o que comprova a dominância da cor vermelha de *C. frutescens* em relação à alaranjada de *C. chinense*. Para a característica número de sementes, a média de 10 frutos por planta revelou que os valores médios foram, sempre, menores que os valores médios dos pais, o que pode ser atribuído à menor percentagem de viabilidade polínica em comparação com a dos genitores. Já em relação à altura e largura das plantas híbridas, as mesmas mostraram-se, sempre, superiores aos genitores (Tabela 2; Figura 9).



Figura 9. Frutos provenientes da autofecundação das espécies genitoras e frutos provenientes dos híbridos  $F_1$  entre *C. frutescens* e *C. chinense*.

Tabela 2. Caracterização morfoagronômica dos acessos representantes das espécies *C. frutescens* e *C. chinense* e das plantas híbridas F<sub>1</sub> (*C. frutescens* x *C. chinense*) obtidas

Características	<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i>	Híbrido
<b>Características Sementes</b>			
Número de sementes por fruto	252	347	95
Cor da semente	Amarelo escuro	Amarelo escuro	Amarelo escuro
Massa de 100 sementes	0,6	1,48g	0,7g
<b>Características Flores</b>			
Dias para florescimento	67	60	63
Número de flores por axila	Muitas	4	3
Posição da Flor	Ereta	Pendente	Ereta
Cor da corola	Branca	Branca	Branca
Comprimento da corola (mm)	7,05	8,31	7,02
Cor das anteras	Azul Pálido	Roxa	Roxo claro
<b>Características Plantas</b>			
Cor da haste	Verde	Verde com listras roxas	Verde com listras roxas
Antocianina nodal (em plantas maduras)	Verde	Roxo escuro	Roxo claro
Altura de planta (cm)	66-85	66-85	<85
Largura da planta (cm)	65,2	73,2	84,7

Tabela 2, Cont.

Hábito de crescimento	Ereto	Intermediário	Ereto
Cor do caule	Verde	Verde com estrias roxas	Verde com estrias roxas
Cor da folha	Verde-escuro	Verde	Verde
<b>Características Frutos</b>			
Constricção anular do cálice	Ausente	Presente	Ausente
Posição do fruto	Intermediário	Declinado	Intermediário
Coloração do fruto no estágio intermediário	Alaranjado	Verde	Vermelho
Coloração do fruto no estágio maduro	Vermelho	Amarelo-Laranja	Vermelho
Forma do fruto	Alongado	Quadrado	Alongado
Epiderme do fruto	Liso	Semi-rugoso	Rugoso
Comprimento do fruto (mm)	25,58	47,96	29,39
Largura do fruto (mm)	5,91	28,871	9,996
Massa média do fruto (g)	0,52	11,57	1,14
Espessura da parede do fruto (mm)	0,578	2,822	1,242

### ***C. annuum* x *C. frutescens***

No cruzamento entre *C. annuum* e *C. frutescens*, 50 polinizações foram realizadas, originando 18 frutos. Desses, 10 atingiram a maturação, sendo cinco frutos provenientes de cada direção de cruzamento; no entanto, nenhuma das 368 sementes obtidas no cruzamento *C. annuum* x *C. frutescens* germinou.

A presença de sementes inviáveis caracteriza a presença de barreiras de pós-fertilização, podendo, nesse caso, ocorrer degeneração do endosperma com posterior morte do embrião, comumente observadas em alguns cruzamentos interespecíficos (Rodrangboon *et al.*, 2002).

Cheng *et al.*, (2007), também observaram, em ambas as direções de cruzamento entre *C. annuum* e *C. frutescens*, frutos com sementes, mas as mesmas eram inviáveis. Sementes inviáveis, também, foram observadas por Campos (2006). Smith e Heiser (1951) verificaram que, quando *C. frutescens* foi empregado como genitor feminino, a porcentagem de germinação das sementes desse cruzamento foi muito baixa e, quando *C. annuum* foi utilizado como genitor feminino, as sementes não germinaram.

Charlo *et al.*, (2009) também observaram baixa produção de sementes, bem como baixa taxa de germinação quando se utilizou *C. annuum* como genitor feminino. O cruzamento recíproco apresentou maior número de sementes, mas as mesmas não germinaram.

#### **3.1.4.2. Viabilidade/Fertilidade do híbrido interespecífico**

A fertilidade dos híbridos interespecíficos foi avaliada em função da baixa, ou mesmo ausência, de frutificação de alguns desses híbridos (Tabela 3). Grãos de pólen inviáveis apresentaram cor verde em função da ausência de citoplasma e presença da parede do grão de pólen, e os viáveis coloriram de púrpura por apresentarem citoplasma, e esse reagir com o corante específico para DNA (Figura 10).

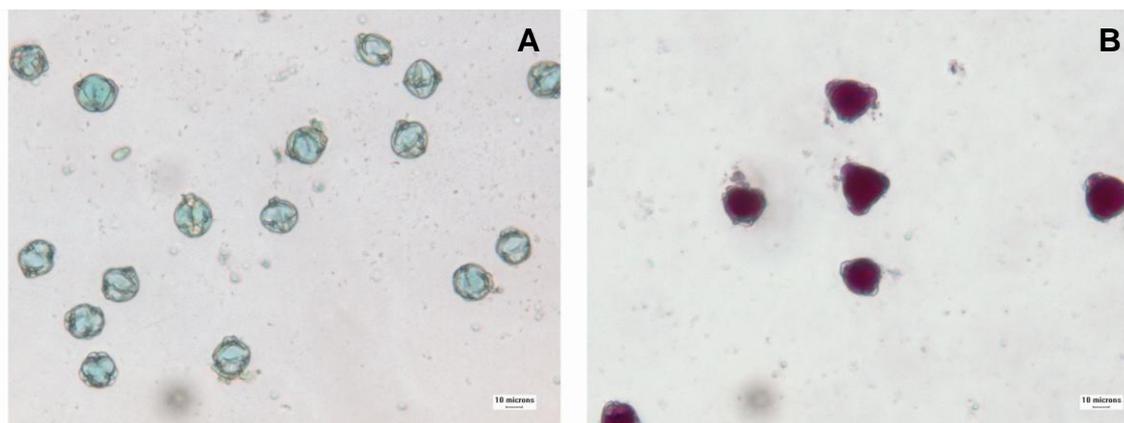


Figura 10. A) Grãos de pólen inviáveis do híbrido F<sub>1</sub> 'Casca Dura Ikeda' x UENF 1495; B) Grãos de pólen viáveis do híbrido F<sub>1</sub> UENF 1636 x UENF 1785.

Em todas as combinações estudadas, com exceção de *C. frutescens* x *C. chinense*, foi observada uma baixa viabilidade polínica (Tabela 3), sendo a combinação *C. annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum* completamente estéril (0%), e as demais combinações com percentual baixo (11,35 e 12,20) podem ser consideradas quase estéreis. Esses resultados indicam que, possivelmente, a não formação de frutos ou a formação de poucos frutos nos híbridos podem estar diretamente relacionadas à viabilidade do gametófito masculino. A barreira gerada pela infertilidade dos híbridos é devido ao desenvolvimento anormal do gametófito masculino, provocando, assim, o aborto do pólen (Yoon e Park, 2005).

Tabela 3. Média da viabilidade dos híbridos F<sub>1</sub> obtidos entre *C. annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum* ('Casca Dura Ikeda' x UENF 1495), *C. annuum* var. *annuum* x *C. chinense* ('Casca Dura Ikeda' x UENF 1785), *C. chinense* x *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1785 x 'Casca Dura Ikeda'), *C. frutescens* x *C. chinense* (UENF 1636 x UENF 1785)

Combinações	% de Grãos de Pólen Viáveis
<i>C. annuum</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	0
<i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i>	11,35
<i>C. chinense</i> x <i>C. annuum</i>	12,2
<i>C. frutescens</i> x <i>C. chinense</i>	72,5

Não foi possível a observação de grãos de pólen viáveis no cruzamento envolvendo a espécies *C. annuum* e *C. baccatum* ('Casca Dura Ikeda' x UENF 1495) (Figura 10). Como pertencem a complexos diferentes (Pickersgill, 1991), quando híbridos são obtidos entre essas espécies, o mesmo apresenta certo grau de esterilidade. No entanto, segundo Monteiro *et al.*, (2011), híbridos férteis entre *C. annuum* var. *glabriusculum* e *C. baccatum* var. *pendulum* foram obtidos, com viabilidade polínica superior a 90%. Por outro lado, a viabilidade polínica dos híbridos resultantes dos cruzamentos recíprocos foi baixa, ao redor de 35 %, o mesmo ocorrendo nas combinações híbridas entre *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. annuum* var. *annuum*.

Segundo Egawa e Tanaka (1986), *C. annuum* e *C. baccatum* diferem por, ao menos, três translocações recíprocas, o que foi determinante para a esterilidade do híbrido F<sub>1</sub>, que apresentou uma viabilidade polínica média de 6,5%. Kumar *et al.*, (1987) também observaram híbridos parcialmente estéreis entre *C. annuum* e *C. baccatum* var. *pendulum* com meiose irregular, o que indicou que as duas espécies diferem por duas translocações, uma inversão e outras pequenas alterações estruturais. Segundo Yoon *et al.*, (2009), híbridos entre essas duas espécies são muito difíceis de se obter, devido a barreiras genéticas como a esterilidade do híbrido.

Várias anomalias meióticas foram observadas por Yoon e Park (2005), como a formação de univalentes, quadrivalentes e hexavalentes nas células mãe de grão de pólen dos híbridos. Além disso, disjunção irregular e cromossomos retardatários, indicando que a causa direta da macho-esterilidade são as anormalidades meióticas encontradas nos híbridos F<sub>1</sub>. Em adição a essas irregularidades, os autores também observaram uma degeneração das células do tapete durante o desenvolvimento da parede da antera.

A combinação híbrida entre *C. annuum* var. *annuum* x *C. chinense* apresentou uma viabilidade polínica média de 11,35%, sugerindo ser essa planta estéril ou de ter pouquíssimos grãos de pólen viáveis. Monteiro *et al.*, (2011) também observaram uma viabilidade polínica baixa em híbridos de *Capsicum*, porém a combinação *C. annuum* x *C. chinense* teve 56% de viabilidade polínica, sugerindo uma esterilidade parcial do híbrido. Valores baixos como os observados nesse estudo não eram esperados, uma vez que ambas as espécies pertencem

ao mesmo complexo gênico; no entanto, entre *C. annuum* e *C. chinense*, são encontradas translocações espontâneas, que podem gerar gametas desbalanceados e, conseqüentemente, inviáveis (Moscone, 1990).

Híbridos entre essas duas espécies, com baixa viabilidade polínica, também têm sido relatados na literatura, com valores variando de 13 a 16% (Lanteri e Pickersgill, 1993), 12% (Tanksley e Iglesias-Olivas, 1984) e 42% (Kumar *et al.*, 1987). Segundo Kumar *et al.*, (1987), o genoma de *C. annuum* difere de *C. chinense* por duas translocações. Híbridos entre *C. annuum* e *C. chinense* apresentaram hexavalentes em 18% das células mãe de grãos de pólen, o que mostra que os acessos usados diferem por duas translocações (Lanteri e Pickersgill, 1993).

A viabilidade polínica dos parentais UENF 1495, UENF 1636 e UENF 1785 foi observada, previamente, por Martins (2010) com a utilização de quatro diferentes corantes: alexander, lugol, carmim acético e azul de Tripiano. Independente do corante utilizado, verificaram-se altas porcentagens de grãos de pólen viáveis, com média geral acima de 90% de viabilidade.

Em relação ao cruzamento entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens*, valores satisfatórios foram obtidos, indicando que esses genótipos apresentam uma divisão celular normal, que resulta em grãos de pólen viáveis, portanto capazes de germinar no estigma da flor, fertilizar e gerar frutos viáveis. A esterilidade do pólen ou mesmo a baixa fertilidade dos indivíduos utilizados são fatores extremamente negativos quando se pretende utilizar programas de hibridação artificial ou autofecundações (Manara, 1974).

Com base nos resultados aqui apresentados, a esterilidade dos grãos de pólen pode ser considerada como uma segunda barreira de pós-fertilização observada em *Capsicum*.

#### **3.1.4.3. Barreiras de pré-fertilização: germinação e crescimento do tubo polínico *in vivo***

Levando-se em conta a não obtenção de frutos, com ou sem sementes, nos cruzamentos *C. annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum* x *C. frutescens* e *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. frutescens*, procedeu-se a observação do crescimento do tubo polínico nos cruzamentos

mencionados anteriormente e em *C. annuum* e *C. baccatum* var. *pendulum*, que funcionaram como controle.

Nas plantas de *C. annuum* var. *annuum* testadas, com 24 horas após a polinização, os grãos de pólen já tinham germinado no estigma e se encontravam no final do estilete, alcançando os óvulos após 48 horas. Quando as plantas de *C. baccatum* var. *pendulum* foram analisadas, pôde-se perceber que, em comparação com *C. annuum* var. *annuum*, os grãos de pólen demoraram mais para completar a fertilização, visto que, 24 horas após a polinização, os grãos de pólen, ainda, não tinham germinado sobre a superfície do estigma e, 48 horas após, os mesmos encontravam-se no final do estilete, já alcançando o ovário, mas sem, ainda, atingir os óvulos. Apesar da diferença de tempo, em nenhum dos acessos, foi encontrado algum tipo de autoincompatibilidade, mostrando que não existe nenhuma barreira para que os grãos de pólen germinem e os tubos polínicos alcancem os óvulos para que ocorra a fecundação (Figura 11).

De forma semelhante aos resultados obtidos aqui, Ofosu-Anim *et al.*, (2006), analisando o crescimento do tubo polínico em *C. annuum*, observaram que os tubos somente alcançaram o ovário 36 horas após a polinização, e a presença dos tubos nos óvulos foi constatada após 48 horas.

Cruz e Campos (2007), estudando a polinização em pimenta malagueta (*C. frutescens*), observaram que, cerca de 24 horas após a polinização, os tubos polínicos já haviam chegado ao ovário e alcançado os óvulos, sugerindo que a fertilização, nessa espécie, ocorre um dia após a polinização.

Nas três cruzamentos testados, foi possível observar os grãos de pólen germinando na superfície do estigma. No cruzamento envolvendo as espécies *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum*, de forma semelhante à autofecundação de *C. annuum* var. *annuum*, os tubos polínicos germinados puderam ser vistos atingindo os óvulos 48 horas após a polinização (Figura 11), mostrando que não existe nenhum tipo de incompatibilidade que impeça o crescimento do tubo polínico, sendo provável que o insucesso do cruzamento entre essas duas espécies seja devido a barreiras de pós-fertilização.

Yoon *et al.*, (2006) também não observaram nenhuma barreira para germinação dos grãos de pólen no estigma ou para o crescimento do tubo polínico no estilete em todas as combinações interespecíficas entre os acessos de *C. annuum* e *C. baccatum* testadas por eles. De forma semelhante, Zijlstra *et*

*al.*, (1991) também não observaram qualquer barreira à penetração do tubo polínico na células ovo, em ambas as direções de cruzamentos envolvendo essas espécies.

Nos cruzamentos envolvendo as espécies *C. frutescens* e *C. baccatum*, não foi possível a observação dos tubos polínicos, alcançando os óvulos da espécie utilizada como genitor feminino. Em ambos os cruzamentos, 24 horas após a polinização, já era possível observar os grãos de pólen germinando e, 48 horas após, era possível observar os tubos polínicos no estilete. No entanto, 72 horas após a realização dos cruzamentos, os tubos polínicos permaneciam no estilete, não alcançando o ovário (Figura 11). Barreiras, prevenindo o crescimento dos tubos polínicos, indicam que, no cruzamento entre as duas espécies envolvidas, é improvável que sejam produzidas sementes viáveis (Zijlstra *et al.*, 1991), no entanto algumas alternativas podem ser testadas, visando à superação dessas barreiras, como a polinização *in vitro*.

O sucesso da hibridação envolve uma série de eventos, incluindo a germinação do pólen, o crescimento do tubo polínico, a fertilização, o desenvolvimento do embrião e do endosperma e a maturação da semente (Debbrema *et al.*, 2013) Segundo Pickersgill (1993), as fertilizações interespecíficas, frequentemente, falham porque os tubos polínicos são incompatíveis com o pistilo e param de crescer antes de atingirem os óvulos. Esse parece ser o caso de *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum* quando os mesmos são utilizados como genitores femininos em cruzamentos com *C. frutescens*, indicando que o insucesso pode ser devido à barreira de pré-fertilização na etapa de germinação do tubo polínico

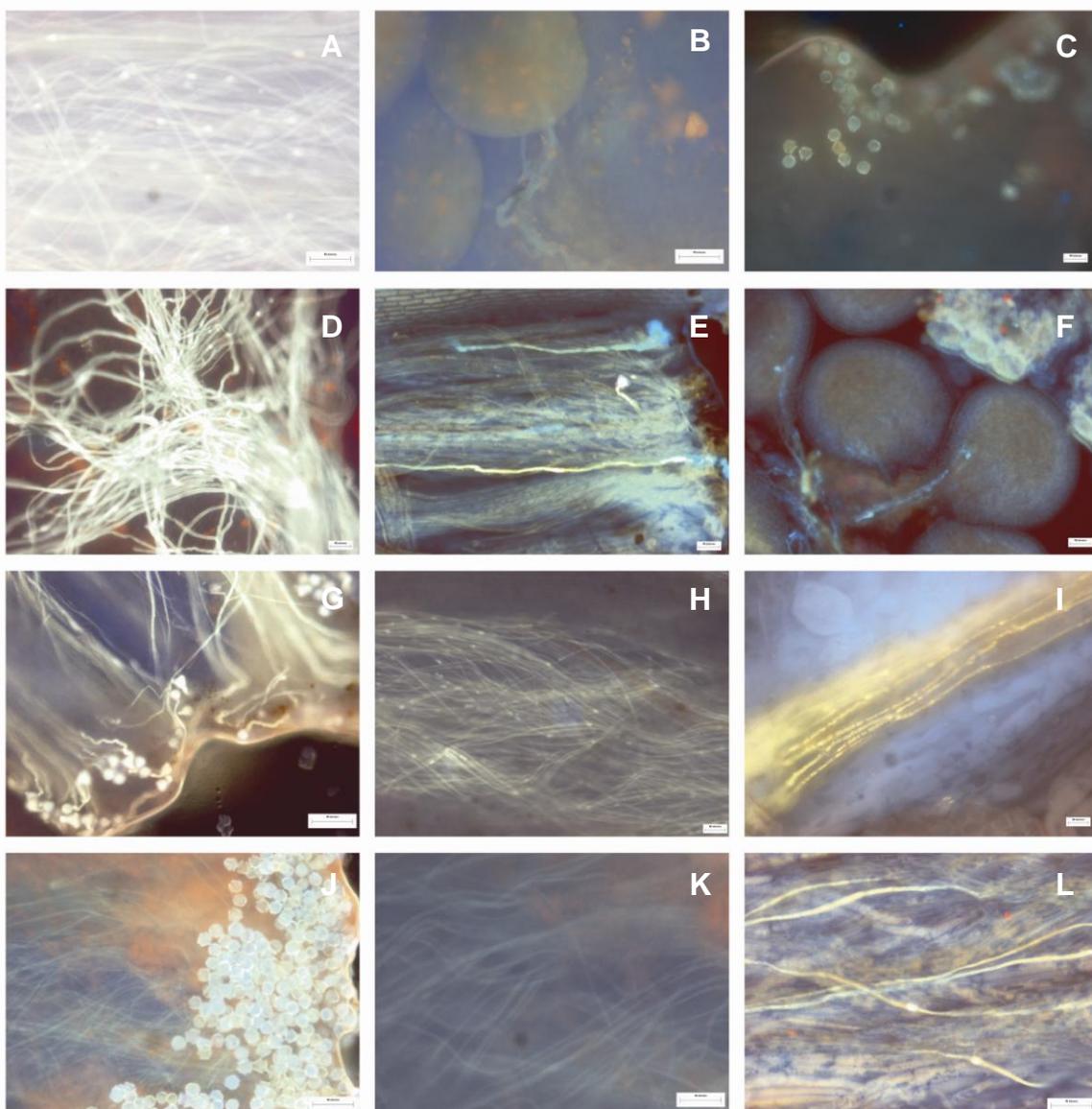


Figura 11: Germinação do tubo polínico *in vivo* em *C. annuum* var. *annuum* (A;B), *C. baccatum* var. *baccatum* (C;D), *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum* (E,F), *C. baccatum* var. *baccatum* x *C. frutescens* (G,H,I), *C. baccatum* var. *pendulum* x *C. frutescens* (J,K,L): A) Tubo polínico no final do estilete após 24 horas; B) Alcançando os óvulos após 48 horas; C) Sem germinar após 24 horas; D) No final do estilete, após 48 horas.; E) Tubos polínicos no estilete 24 horas após a polinização; F) Alcançando os óvulos 48 horas após a polinização; G) Tubos polínicos germinando no estigma após 24 horas; (H,I) No estilete após 48 e 72 horas; J) Tubos polínicos germinando no estigma após 24 horas; (K,L) No estigma 48 e 72 horas após a polinização. Barra = 40 microns.

### 3.1.5. CONCLUSÕES

✓ Existe mais de uma barreira de pós-fertilização. A primeira delas se manifesta no desenvolvimento do zigoto, causando a morte do embrião (semente anormal/chocha). As outras são a falta de vigor da planta híbrida e a esterilidade do híbrido.

✓ Incompatibilidade unilateral existe entre os acessos estudados representantes das variedades de *C. baccatum* e a espécie *C. frutescens*, quando esta última é utilizada como genitor masculino.

✓ Há barreira de pré-fertilização na combinação *C. frutescens* x *C. baccatum* já que os grãos de pólen germinaram, mas não foram capazes de alcançar os óvulos para que ocorresse a fecundação.

✓ O insucesso dos cruzamentos *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum* não é devido à inibição do crescimento do tubo polínico. É provável que seja devido a barreiras de pós-fertilização, visto que, em todos os cruzamentos, o tubo polínico alcançou, com sucesso, os óvulos.

✓ A combinação de maior sucesso foi *C. frutescens* x *C. chinense* com a qual foi possível obter 15 plantas híbridas, confirmando a estreita relação entre essas duas espécies.

## **3.2. TAMANHO DO GENOMA NUCLEAR EM ACESSOS E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Capsicum* VIA CITOMETRIA DE FLUXO**

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

Cada espécie tem um número característico de pares de base em seu núcleo, conhecido como tamanho do genoma ou conteúdo de DNA nuclear. O tamanho do genoma em plantas pode ser estimado por alguns métodos, sendo a citometria de fluxo um dos mais utilizados (Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011).

A citometria de fluxo é uma técnica rápida, que permite a determinação do conteúdo de DNA nuclear. Essa técnica é baseada no uso de fluorocromos e na análise da intensidade da fluorescência emitida pelos núcleos corados. Para determinar o conteúdo de DNA, a intensidade de fluorescência dos núcleos é comparada com a intensidade de fluorescência dos núcleos isolados de espécies com tamanho do genoma nuclear conhecido (Dolezel *et al.*, 1994).

Dentre as várias aplicações do uso da citometria de fluxo, podemos citar a confirmação da natureza híbrida de materiais resultantes de cruzamentos tanto intra como interespecífico (Dolezel, 1997a). A produção de híbridos interespecíficos é útil não somente na produção de novas cultivares com características intermediárias entre as espécies parentais, mas também para induzir a introgressão de genes úteis de uma espécie parental a outra. Após a

obtenção desses híbridos, a análise do conteúdo de DNA, através da citometria de fluxo, é um meio fácil e rápido de se confirmar o sucesso da ocorrência da hibridação (Kato e Mii, 2012).

Trabalhos, visando à identificação de híbridos, usando a citometria de fluxo, têm sido realizados em vários gêneros como *Eucalyptus* (Grattapaglia e Bradshaw, 1994), *Elytrigia* (Mahelka *et al.*, 2005), *Brassica* (Sabharwal e Dolezel, 1993), *Cucurbita* (Sisko *et al.*, 2003), *Allium* (Keller *et al.*, 1996), *Cirsium* (Bures *et al.*, 2004), *Zea* (Rayburn *et al.*, 1993), *Alstroemeria* (Buitendijk *et al.*, 1997), *Actinidia* (Hirsch *et al.*, 2001) e *Solanum* (Dolnicar e Bohanec, 2000; Szczerbakowa *et al.*, 2003; Trabelsi *et al.*, 2005).

As espécies do gênero *Capsicum*, junto com a maioria das espécies diplóides de *Nicotiana*, apresentam o segundo maior genoma na família *Solanaceae*, ficando atrás, apenas, de *Cyphomandra* (Moscone *et al.*, 2003; Bennett e Leitch, 2012). No entanto, diferentes resultados têm sido observados na determinação do conteúdo de DNA dentro do gênero. Essas diferenças podem ser atribuídas às diferentes metodologias, padrões, tampões e fluorocromos utilizados, bem como à cultivar analisada (Abreu *et al.*, 2008). Até o momento, não foi realizado nenhum estudo de determinação do conteúdo de DNA nuclear de híbridos interespecíficos obtidos entre espécies de *Capsicum*.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o conteúdo de DNA nuclear de espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres do gênero *Capsicum*, bem como de seus híbridos interespecíficos via citometria de fluxo.

### 3.2.2. REVISÃO

#### 3.2.2.1. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi desenvolvida no final dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas (Côrte-Real *et al.*, 2002), sendo, a partir dos anos 1980, adaptada para células vegetais (Dolezel, 1997a) e

introduzida como método de avaliação de ploidia e de quantificação de DNA, com alta resolução, em diferentes espécies de plantas (Tiersch *et al.*, 1989).

Em linhas gerais, na citometria de fluxo, as partículas fluem em direção a uma câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente de velocidade superior à da suspensão líquida. Por causa da diferença de velocidade, as partículas a serem analisadas são forçadas a moverem-se, individualmente, no centro do fluxo (Dolezel, 1997b). Essas partículas passam por um feixe de iluminação proveniente de fontes como *lasers* e/ou lâmpada de vapor de mercúrio e ocorre, então, um processo de dispersão fotônica e/ou emissão de fluorescência (Côrte-Real *et al.*, 2002).

Os pulsos da dispersão de luz e da fluorescência são coletados e convertidos em pulsos de corrente elétrica por sensores ópticos, sendo, então, classificados (Dolezel e Bartos, 2005). A dispersão da luz fornece dados quantitativos relativos ao tamanho e complexidade das partículas que estão a ser analisadas, enquanto, através da fluorescência, pode-se quantificar qualquer composto celular que apresente autofluorescência ou que tenha sido, previamente, marcado com corantes fluorescentes (Robinson e Grégori, 2007).

A fluorescência é separada pela utilização de uma série de espelhos dicróticos, filtros e fotomultiplicadores (Eeckhaut *et al.*, 2005), e os circuitos, dentro do aparelho, convertem esses sinais fluorescentes em valores digitais, que são armazenados e exibidos na forma de histogramas (Dolezel *et al.*, 2007; Ochatt, 2011). Esses histogramas são, então, visualizados e interpretados com auxílio de programas específicos (Robinson e Grégori, 2007).

Várias são as aplicações da citometria de fluxo no melhoramento de plantas, entre as quais podemos citar o controle da estabilidade do nível de ploidia, a identificação de haplóides e duplohaplóides em cultura de anteras e ovários, a verificação dos níveis de ploidia em resultados de cruzamentos, a detecção de aneuplóides no estudo da apomixia, a identificação de híbridos e do produto de fusão de protoplastos, entre outras (Dolezel, 1997a).

Nas plantas superiores, assim como em outros eucariotas, o crescimento e divisão celular é um processo cíclico. No modelo de ciclo celular apresentado por Howard e Pelc, o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G1, S e G2. Durante o período de crescimento celular (fase G1), uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haplóide de

cromossomos), ou seja, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S, ocorre a duplicação do genoma nuclear e, na fase seguinte (fase G2), ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível 4C. Posteriormente, ocorre a mitose (fase M), durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo 2C de DNA (Loureiro e Santos, 2004).

Nas análises de citometria de fluxo, normalmente, são verificados dois picos de fluorescência, aquele dos núcleos 2C, que correspondem às células em G1 e aquele dos núcleos 4C, que correspondem às células em G2 e mitose (Figura 1). Os núcleos de alguns tecidos apresentam, apenas, um único pico, por exemplo, núcleos que não estão se dividindo e que formam um pico referente ao valor 2C de DNA (Bennett e Leitch, 1995).

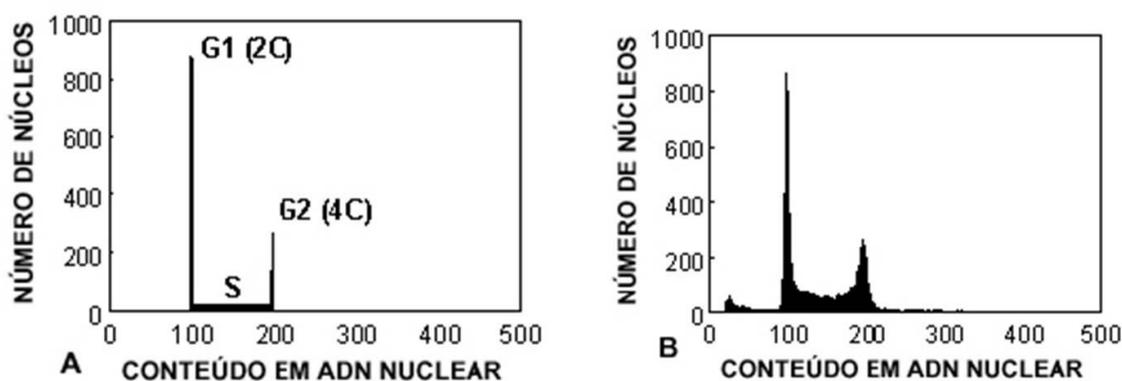


Figura 1. Distribuição do conteúdo em DNA nuclear numa população de células, evidenciando os picos G1 e G2 (Adaptado de Loureiro e Santos, 2004).

A estimação do conteúdo de DNA, fazendo uso da citometria de fluxo, pode ser resumida em três etapas: (1) os núcleos são isolados das plantas, utilizando-se, geralmente, o tecido foliar através de maceração, sendo necessário, em média, 10000 núcleos, o que pode ser obtido a partir de 50 mg de tecido; (2) os núcleos isolados são, então, marcados com um fluorocromo e (3), ao passar pelo citômetro, a fluorescência emitida de cada núcleo, que é proporcional ao conteúdo de DNA, é medida e analisada (Bennett e Leitch, 1995). Isso é possível uma vez que a coloração da amostra com corantes específicos para o DNA

(DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de material genético – DNA (Loureiro e Santos, 2004).

Os fluorocromos usados para estimar o conteúdo de DNA podem ser divididos em dois grupos: (1) aqueles que se intercalam com os ácidos nucleicos, como o brometo de etídeo e o iodeto de propídeo e (2) aqueles que apresentam preferência por base, como o Hoechst 33258 (H33258), o DAPI, mitramicina (MI), cromomicina A3 (Dolezel *et al.*, 1992) (Tabela 1)

Tabela 1. Fluorocromos usados em Citometria de Fluxo para estimar o conteúdo de DNA nuclear (Adaptada de Pasqual *et al.*, 2012)

Fluorocromos	Tipo de Coloração	Comprimento de Onda	
		Excitação	Emissão
Iodeto de propídeo	Intercalante	525 (Azul-Verde)	605 (Vermelho)
Brometo de Etídeo	Intercalante	535 (Azul-Verde)	602 (Vermelho)
DAPI	Específico base AT	354 (UV)	460 (Azul)
Hoechst 33258	Específico base AT	360 (UV)	460 (Azul)
Mitramicina (MI)	Específico base CG	445 (Violeta-Azul)	575 (Verde)
Cromomicina A3	Específico base CG	445 (Violeta-Azul)	520 (Verde)

Os corantes intercalares, como o brometo de etídeo e o iodeto de propídeo, também se ligam ao RNA, portanto, quando se utilizam esses corantes, é necessário o uso de RNases para que ocorra a destruição do RNA (Prince e Johnston, 1996). As regiões do DNA ricas em AT do DNA são ligadas, preferencialmente, pelo Hoechst e pelo DAPI (Portugal e Waring, 1988), enquanto que a cromomicina A3 e a mitramicina se ligam, preferencialmente, às regiões ricas em GC (Van Dyke e Dervan, 1983).

Como o citômetro de fluxo fornece, apenas, valores relativos, a comparação com um padrão de referência, que possui um conteúdo de DNA específico, é necessária para determinar a quantidade em picogramas do DNA da espécie em estudo (Dolezel *et al.* 1992; Dolezel e Bartos, 2005; Dolezel e Greilhuber, 2010).

Existem dois tipos de padrão, o padrão externo, que é processado e analisado separadamente da amostra e o interno, que é analisado,

simultaneamente, à amostra a ser testada (Motley *et al.*, 2000). É recomendado o uso do padrão interno, onde os núcleos do padrão e da amostra são isolados, corados e analisados simultaneamente. No caso do uso do padrão externo, mesmo que as configurações do aparelho continuem sendo as mesmas, a análise pode ser comprometida, por exemplo, pela variação no preparo da amostra e coloração (Dolezel e Bartos, 2005). O *Flower database*, desenvolvido por Loureiro *et al.*, (2008), apresenta uma lista com os padrões de referência que podem ser usados para determinar o tamanho do genoma em plantas, usando-se a citometria de fluxo.

Recomenda-se que o padrão a ser utilizado tenha quantidade de DNA próxima, mas não sobreposta aos picos 2C e 4C das espécies que estão sendo estudadas (Prince e Johnston, 1996) e que sejam analisados, em cada amostra, cerca de 5000 a 20000 núcleos (Galbraith *et al.*, 1998).

A mensuração dos conteúdos de DNA é mais apurada quando o padrão e a amostra possuem conteúdo de DNA de tamanho similar, visto que diferenças no tamanho nuclear e na quantidade de heterocromatina influenciam as propriedades de dispersão da luz do objeto mensurado e, portanto, a determinação do conteúdo de DNA em si. Se o padrão e a amostra tiverem propriedades similares de cromatina, essa fonte de erro é, então, minimizada (Johnston *et al.*, 1999).

Nas análises envolvendo o uso da citometria de fluxo, deve-se levar em consideração o coeficiente de variação (CV). Segundo Marie e Brown (1993), CV, variando entre 1 e 2%, classifica as análises como de alta qualidade, enquanto que o CV de 3% pode ser considerado para análises de rotina. Já Bennet e Leitch, (1995) e Dolezel e Bastos (2005) classificam CV menores que 5% como aceitáveis, visto que tal precisão é difícil de ser conseguida em algumas espécies vegetais. Segundo Bennet e Leitch (1995), picos estreitos e CVs baixos indicam que os núcleos foram isolados de forma limpa e que não sofreram danos significativos ou avaria durante a coloração e análise.

A determinação da quantidade de DNA nuclear pode substituir a contagem do número de cromossomos, especialmente quando está envolvido um grande número de indivíduos, como é o caso de bancos de germoplasma. Conhecer o número cromossômico ou o nível de ploidia é importante para caracterização do germoplasma e para a realização de cruzamentos em programas de melhoramento. A determinação do número de cromossomo requer

tempo e o uso de técnicas que dão resultados semelhantes, ou seja, que identifiquem o nível de ploidia, o que pode agilizar os trabalhos (Schifino-Wittmann, 2001).

### 3.2.2.2. Quantidade de DNA no gênero *Capsicum*

O conteúdo de DNA no gênero *Capsicum* tem sido quantificado por alguns trabalhos, usando-se citometria de fluxo (Galbraith *et al.*, 1983; Arumuganathan e Earle, 1991; Belletti *et al.*, 1998; Moscone *et al.*, 2003; Abreu *et al.*, 2008), no entanto alguns valores 2C obtidos têm sido diferentes.

Moscone *et al.*, (2003) usando brometo de etídeo e analisando 25 acessos pertencentes a nove espécies de *Capsicum* e quatro variedades, observaram um conteúdo de DNA 1C médio para o gênero de 3,94 pg, enquanto Belletti *et al.*, (1998), fazendo uso do iodeto de propídeo e analisando nove espécies e duas subespécies, observaram um valor 1C de 4,21 pg. Em ambos os trabalhos, foi possível separar as espécies de acordo com os seus complexos gênicos, sendo que *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* apresentaram conteúdo de DNA muito próximos, enquanto *C. baccatum* e *C. pubescens* ficaram em grupos distantes.

Segundo Belletti *et al.*, (1998), no geral, as espécies de flores brancas possuem menor conteúdo de DNA, com exceção de *C. praetermissum* (2C = 9,23 pg). Além disso, *C. tovarii* e *C. eximium*, embora possuam flores púrpuras, apresentam conteúdo de DNA similar às espécies com flores brancas.

A espécie *C. annuum* tem sido uma das mais trabalhadas, e o valor atribuído ao seu conteúdo de DNA tem sido conflitante. Moscone *et al.*, (2003) encontraram valores variando de 3,32 a 3,45 pg, valores esses próximos ao encontrado por Abreu *et al.*, (2008) ao estimar o conteúdo de DNA de *C. annuum* var. *annuum* cv. New Mexican. No entanto, conteúdos menores e maiores têm sido reportados na literatura. Bennett e Leitch (1995) estimaram o conteúdo de DNA 1C, variando de 2,8 a 3,8 pg, enquanto Belletti *et al.*, (1998) estimaram o conteúdo de DNA 1C em 3,83 pg, resultado esse quase 15% maior que nos trabalhos anteriores.

Trabalhos, usando a metodologia de citometria de imagem com Feulgen, também foram realizados no gênero *Capsicum*, para as espécies *C. annuum*

forma silvestre e domesticada (1C = 4,00 e 5,4 pg), *C. baccatum* forma silvestre e domesticada (1C = 4,9 e 6,4 pg), *C. chinense* (1C = 5,9 pg) e *C. frutescens* (1C = 6,0 pg) (Bennett e Smith 1976). Mukherjee e Sharma (1990) calcularam o valor de 5,7 pg para *C. annuum* enquanto Moscone *et al.*, (2003) observaram 3,16 pg para mesma espécie, fazendo uso do mesmo padrão *Allium cepa* (1C = 16,75 pg).

Belletti *et al.*, (1998), observaram um conteúdo de DNA, no mínimo, cerca de um terço menor do que o encontrado por Bennett e Smith (1976) para as espécies *C. chinense* (1C = 5,9 pg), *C. frutescens* (1C = 6,0 pg), *C. eximium* (1C = 6,1 pg) e *C. pubescens* (1C = 6,4 pg). Os resultados encontrados por Bennett e Smith (1976) foram, também, maiores do que os encontrados por Moscone *et al.*, (2003), com uma discrepância de, no mínimo, 40% a mais para algumas espécies como *C. annuum* (1C = 4,70 pg), *C. frutescens* e *C. chinense*.

Segundo Belletti *et al.*, (1998), a diferença observada pode ser devido ao padrão usado por Bennett e Smith (1976), *Allium cepa*, cujo conteúdo de DNA (2C = 33,5 pg) difere, radicalmente, do encontrado para o gênero. No entanto, o conteúdo observado por Moscone *et al.*, (2003), usando esse mesmo padrão, foi, praticamente, o mesmo obtido através da citometria de fluxo, com o uso de *Hordeum vulgare* "Ditta", que possui valor 1C de 5,063 pg. Segundo Moscone *et al.*, (2003), essas diferenças não podem ser explicadas.

### 3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.3.1. Material Genético e Condições de Cultivo

Foram utilizadas folhas jovens dos híbridos interespecíficos obtidos anteriormente, dos seus genitores e de outras espécies do gênero *Capsicum* (Tabela 2).

Sementes desses acessos foram, inicialmente, colocadas para germinar em B.O.D. a 27,5°C, em 8 horas de luz e 16 horas de escuro e, posteriormente, plantadas em casa de vegetação em bandejas de isopor com substrato vegetal Vivatto®, sendo cinco plantas por espécies, com exceção dos híbridos

interespecíficos que tiveram número variável de plântulas.

Cerca de dois meses após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 5 L, utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal. As adubações de cobertura e defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças foram empregados de acordo com as recomendações para a cultura (Filgueira, 2000).

Tabela 2. Número de plantas utilizadas para determinação do conteúdo de DNA nuclear em espécies e híbridos de *Capsicum*

Espécies	Número de Plantas Analisadas
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	05
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	05
<i>C. chinense</i>	05
<i>C. frutescens</i>	05
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	05
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	05
<i>C. parvifolium</i>	05
<i>C. chacoense</i>	05
<i>C. frutescens</i> x <i>C. chinense</i>	05
<i>C. frutescens</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	03
<i>C. frutescens</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	01
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> x <i>C. chinense</i>	01
<i>C. chinense</i> x <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	01
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	01

O presente trabalho foi conduzido na unidade de apoio à pesquisa (UAP) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), e todas as análises foram realizadas no Setor de Citogenética Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF.

### 3.2.3.2. Métodos

Visando à liberação dos núcleos, tecidos foliares jovens foram macerados com auxílio de uma lâmina em uma placa de Petri, contendo 500µl de tampão de extração (KIT Partec) por, no máximo, um minuto em temperatura ambiente. O material foi, então, filtrado em telas de 50µm. Posteriormente, as suspensões foram coradas com 2 ml da solução de coloração do mesmo kit, contendo iodeto de propídeo como fluorocromo e RNase por, pelo menos, meia hora em ambiente protegido da incidência de luz.

Para cada acesso e combinação híbrida, foram realizadas cinco repetições e, pelo menos, 10.000 núcleos foram analisados para a quantificação da emissão da fluorescência com o uso do citômetro de fluxo Partec PA II. Como padrão interno, foi utilizada a espécie *Zea mays* com conteúdo de DNA 2C = 5.43pg (Lysak e Dolezel, 1998). Os histogramas foram analisados pelo programa *Flow Max software* (Partec), e o conteúdo de DNA foi calculado de acordo com a seguinte fórmula proposta por Dolezel e Bartos (2005):

**Conteúdo de 2C de DNA da amostra =**

$$\frac{[(\text{média do pico G1 da amostra}) / (\text{média do pico G1 do padrão})] \times \text{Conteúdo 2C de DNA do padrão (pg DNA)}}{1}$$

O tamanho do genoma foi determinado com a conversão de picogramas de DNA em pares de nucleotídeos com base na seguinte fórmula proposta por Dolezel et al., (2003):

$$\text{Tamanho do genoma (pares de base)} = (0.978 \times 10^9) \times \text{Conteúdo de DNA (C) em picogramas}$$

Para o agrupamento das médias das espécies de *Capsicum*, foi utilizado o teste de Scott-Knott, e para as combinações híbridas, foi utilizado o teste Tuckey a 5% de probabilidade com o auxílio do programa Genes (Cruz, 2006).

### 3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises simultâneas das espécies de *Capsicum* e do padrão interno *Zea mays* resultaram na observação de dois picos, correspondendo ao pico G1 de cada espécie (Figura 2) e coeficiente de variação (CV%) médio de 2,9% (Tabela 3).

O CV expressa as variações observadas nas medições do conteúdo de DNA, que são influenciadas pelas metodologias de isolamento dos núcleos e tipo de fluorocromos usados, além da leitura no citômetro de fluxo (Marie e Brown, 1993). Para Marie e Brown (1993), valores entre 1 e 2 % são aceitos para análises de alta qualidade e 3 % como um valor de rotina. Já para Galbraith *et al.*, (2002), valores de CV <5 % são considerados aceitos.

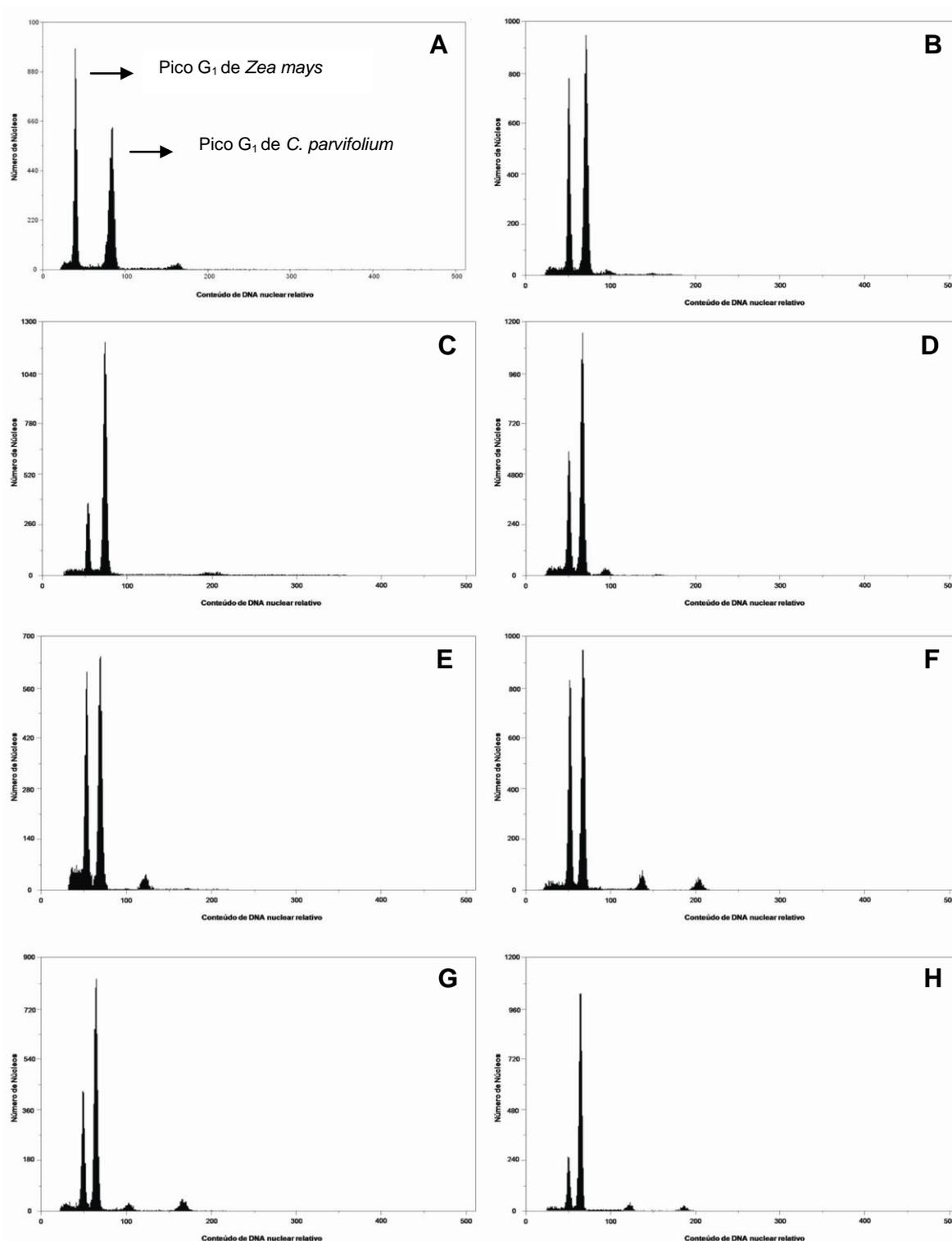


Figura 2. Histogramas gerados pela análise do conteúdo de DNA nuclear das espécies de *Capsicum* estudadas: A) *C. parvifolium*; B) *C. baccatum* var. *pendulum*; C) *C. baccatum* var. *baccatum*; D) *C. annuum* var. *annuum*, E) *C. chacoense*; F) *C. annuum* var. *glabriusculum*; G) *C. chinense*; H) *C. frutescens*.

Os resultados das análises do conteúdo de DNA nuclear 2C nas espécies de *Capsicum* encontram-se sumarizados na tabela 3.

Tabela 3: Conteúdo de DNA, tamanho do genoma em mega pares de base (Mpb) e coeficientes de variação (CVs) observados nas espécies de *Capsicum* analisadas via citometria de fluxo

<b>Acessos</b>	<b>Conteúdo 2C (pg)</b>	<b>Tamanho do Genoma (Mpb)</b>	<b>CVs (%)</b>
<i>C. parvifolium</i>	11,45 a	5599	2,91
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	7,66 b	3745	2,71
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	7,64 b	3735	2,7
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	7,16 c	3501	3,14
<i>C. chacoense</i>	7,10 c	3472	3,38
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	7,04 c	3443	2,95
<i>C. chinense</i>	6,99 d	3418	2,84
<i>C. frutescens</i>	6,87 e	3359	2,91
<b>Média</b>	<b>7,74</b>	<b>3784</b>	<b>2,94</b>

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott

Os histogramas gerados pela citometria de fluxo permitiram determinar o conteúdo de DNA nuclear médio do gênero em 7,74 pg (3785 Mpb) com conteúdos 2C de DNA variando de 6,87 pg (3359 Mpb) em *C. frutescens* a 11,45 pg (5599 Mpb) em *C. parvifolium*.

O teste Scott-Knott, utilizado para o agrupamento de médias, revelou que há diferenças significativas entre o conteúdo de DNA dos genótipos estudados, sendo possível reunir os genótipos semelhantes em cinco grupos, sendo que o primeiro deles foi formado, apenas, pela espécie *C. parvifolium* com conteúdo 2C médio de DNA de 11,45 pg. Das espécies estudadas por Moscone *et al.*, (2003), *C. parvifolium* foi, também, a que apresentou maior genoma (11,54 pg), sendo agrupada com *C. campylopodium* (11,48 pg) (Tabela 4).

Valores muito próximos foram obtidos entre as duas variedades botânicas de *C. baccatum*, que, juntas, formaram o grupo com o segundo maior genoma entre as espécies estudadas. Resultados mostrando valores de conteúdo de DNA

próximos entre essas duas espécies foram, também, obtidos por Belletti *et al.*, (1998) e Moscone *et al.*, (2003) (Tabela 4). Essa estreita relação era esperada, uma vez que *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *pendulum* são formas botânicas de uma mesma espécie e possuem perfis flavonóides (Ballard *et al.*, 1970) e isoenzimáticos quase idênticos (McLeod *et al.*, 1979, 1983). Outra característica que mostra a estreita relação entre as variedades de *C. baccatum* é o índice de sucesso obtido nos cruzamentos entre elas, com progênies exibindo viabilidade de 50 a 89% (Pickersgill, 1971; McLeod *et al.*, 1979).

O terceiro grupo foi formado pelos acessos representantes das espécies *C. annuum* var. *annuum*, *C. chacoense* e *C. annuum* var. *glabriusculum*. O tamanho do genoma da espécie *C. annuum* tem sido o mais estudado; no entanto, valores discordantes, variando de 5,52 (Galbraith *et al.*, 1983) até 7,65 pg (Belletti *et al.*, 1998), têm sido observados com o uso da citometria de fluxo. Os resultados, apresentados aqui, foram cerca de 5,8% e 3,8% maiores do que o encontrado para *C. annuum* var. *annuum* por Moscone *et al.*, (2003) e Abreu *et al.*, (2008), respectivamente e cerca de 6% maior e 7,8% menor do que o encontrado para *C. chacoense* por Moscone *et al.*, (2003) e Belletti *et al.*, (1998) respectivamente (tabela 4).

Diferenças nessa magnitude podem ser explicadas por diferenças na metodologia como o uso de diferentes corantes e padrões utilizados pelos autores. Assim como no presente trabalho, os trabalhos citados acima utilizaram o mesmo fluorocromo (Iodeto de propídeo), no entanto os padrões internos foram diferentes, sendo utilizadas as espécies *Hordeum vulgare* (Moscone *et al.*, 2003) e *Pisum sativum* (Belletti *et al.*, 1998; Abreu *et al.*, 2008). Segundo observado por Dolezel *et al.*, (1998), o uso de diferentes padrões dão origem a diferentes estimativas de conteúdo de DNA.

*C. chacoense* tem sido considerada como a espécie mais primitiva do gênero *Capsicum* por meio de estudos isoenzimáticos (McLeod *et al.*, 1982; Eshbaugh *et al.*, 1983) e citogenéticos (Moscone *et al.*, 2007), e, em concordância com os resultados encontrados na presente pesquisa, estudos sobre conteúdo de DNA têm mostrado a semelhança dessa espécie com *C. annuum* (Moscone *et al.*, 2003; Belletti *et al.*, 1998) (tabela 4).

Segundo Moscone *et al.*, (1995, 2003, 2007), além de possuírem menor conteúdo de DNA, as espécies em questão são relacionadas, pois possuem

pouca heterocromatina do tipo rico em GC e uma ou duas regiões organizadoras de nucléolo por conjunto cromossômico. No entanto, apesar dos resultados citogenéticos mostrarem a estreita relação entre *C. chacoense* e *C. annuum*, estudos de perfis isoenzimáticos e sequências de DNA têm sugerido uma maior aproximação de *C. chacoense* com *C. baccatum* e suas variedades (McLeod *et al.*, 1983; Walsh e Hoot, 2001).

As espécies *C. chinense* e *C. frutescens* foram as que apresentaram menor tamanho do genoma, 3418 e 3359 Mpb, respectivamente. Os resultados obtidos para quantidade de DNA, no presente trabalho, foram, apenas, cerca de 2,2% e 0,4% maiores do que os valores observados por Moscone *et al.*, (2003) para *C. chinense* e *C. frutescens* respectivamente (tabela 4).

Essas duas espécies são, morfológicamente, semelhantes, sendo a principal diferença entre elas a presença de uma constrição anular no cálice, característica da espécie *C. chinense* (IPGRI, 1995). Apesar de trabalhos de análise morfológica (Pickersgill *et al.*, 1979), enzimática (Jensen *et al.*, 1979) e citogenética (Egawa e Tanaka, 1984) não permitirem a determinação de *C. chinense* e *C. frutescens* como espécies distintas, Baral e Bosland (2004), investigando a morfologia, cruzabilidade e o polimorfismo do DNA de acessos dessas duas espécies, concluíram que elas representam duas espécies distintas. De forma semelhante, a estimativa do conteúdo de DNA do presente trabalho também foi capaz de separar as espécies em grupos distintos.

As espécies *C. annuum* e *C. baccatum* pertencem a complexos gênicos diferentes, e, segundo Casali (1970), Kumar *et al.*, (1987), Pickersgill (1991) e Zijlstra *et al.*, (1991), há uma evidente distância genética entre essas espécies, que, quando em cruzamento, resulta em uma reduzida viabilidade dos grãos de pólen e, conseqüentemente, em baixo percentual na formação de sementes. No presente trabalho as espécies ficaram em grupos diferentes sendo possível o agrupamento delas conforme a classificação em complexo *annuum* e *baccatum*.

Tabela 4. Conteúdo de DNA nuclear 2C (pg) relatados para algumas espécies de *Capsicum* via citometria de fluxo

Espécies	Galbraith <i>et al.</i> , (1983)	Arumuganathan e Earle (1991)	Bennett e Leitch (1995)	Belletti <i>et al.</i> , (1998)	Moscone <i>et al.</i> , (2003)	Abreu <i>et al.</i> , (2008)	Martins (2014)
<i>C. annuum</i>	5,52	6,72 – 7,51	5,6 – 7,5	7,65	6,76	6,90	7,16 (domesticada); 7,04 (semidomesticada)
<i>C. frutescens</i>	-	-	-	7,94	6,80	-	6,87
<i>C. chinense</i>	-	-	-	8,04	6,84	-	6,99
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	-	-	-	8,43	7,42	-	7,64
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	-	-	-	8,4	7,4	-	7,66
<i>C. chacoense</i>	-	-	-	7,7	6,7	-	7,10
<i>C. parvifolium</i>	-	-	-	-	11,54	-	11,45

O conteúdo 2C de DNA nuclear médio dos parentais e dos respectivos híbridos interespecíficos encontra-se sumarizado na Figura 3. A média dos coeficientes de variação observados nos histogramas variou de 2,68 % (*C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum*) a 3,39 % (*C. frutescens* x *C. chinense*) (Figura 4).

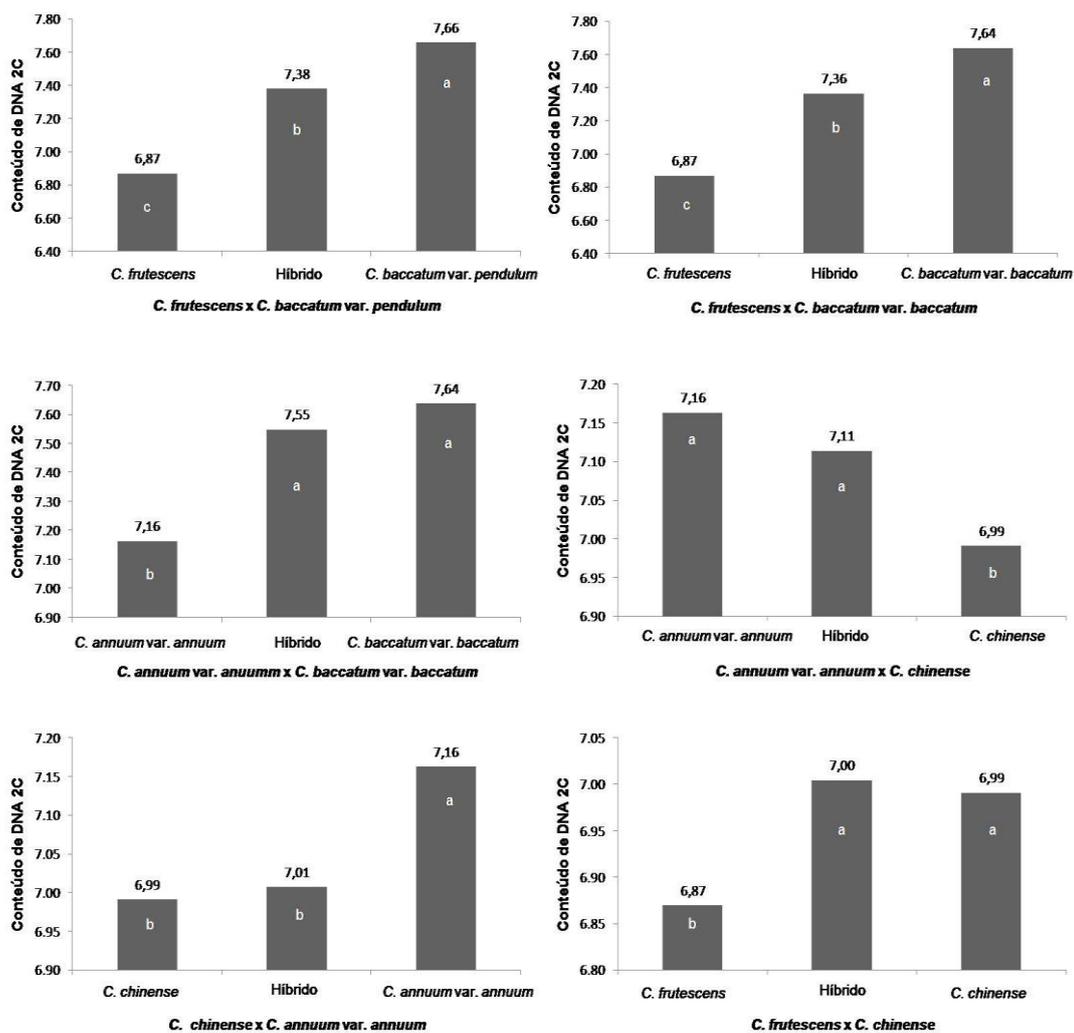


Figura 3: Valores médios do conteúdo de DNA nuclear observados nos parentais e híbridos interespecíficos. Letras iguais nas colunas indicam ausência de diferença pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

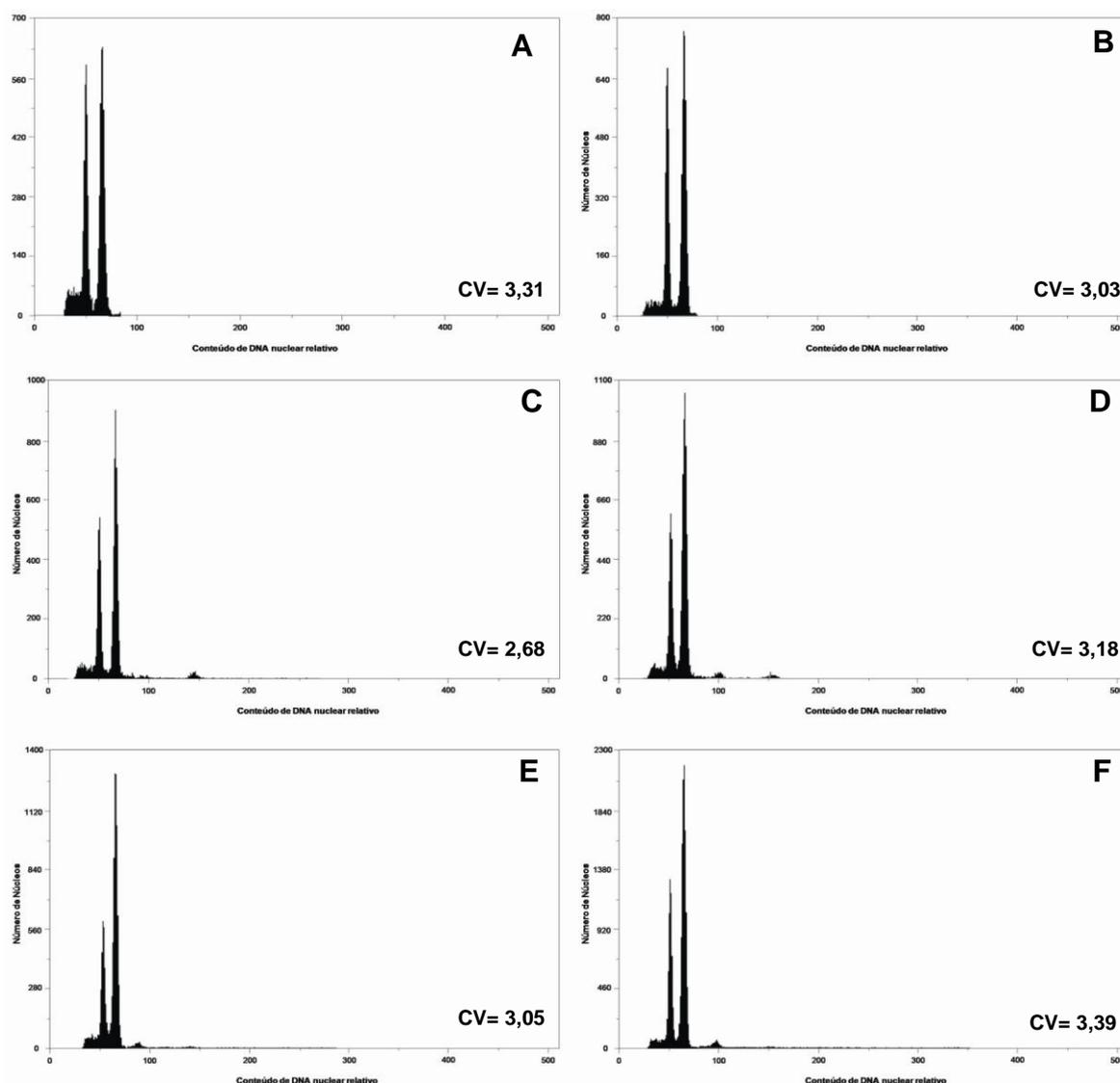


Figura 4: Histogramas gerados pela análise do conteúdo de DNA nuclear dos híbridos  $F_1$  obtidos entre espécies de *Capsicum*: A) *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*; B) *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum*; C) *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum*; D) *C. annuum* var. *annuum* x *C. chinense*; E) *C. chinense* x *C. annuum* var. *annuum*; F) *C. frutescens* x *C. chinense*.

Nos cruzamentos *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *baccatum*, três grupos significativamente diferentes foram formados (*C. frutescens*, híbridos interespecíficos, *C. baccatum*) (Figura 3). Percebe-se que, em ambos os cruzamentos, o tamanho do genoma das combinações híbridas diferiram em relação aos parentais, mostrando a utilidade da aplicação da citometria de fluxo na identificação de possíveis híbridos formados entre as espécies estudadas.

Na combinação *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*, pode-se observar que o híbrido interespecífico obteve um conteúdo de DNA (7,55 pg), que não diferiu, estatisticamente, da espécie *C. baccatum* var. *baccatum*, usada como genitor masculino e que possuía o conteúdo de DNA mais elevado. Ao contrário do observado nessa combinação híbrida, Bures *et al.*, (2004), estimando a variação do genoma em espécies de *Cirsium* da Europa Central, observaram que o conteúdo de DNA dos híbridos, geralmente, ficava mais próximo das espécies com o menor genoma.

O híbrido resultante do cruzamento *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*, além de possuir conteúdo de DNA estatisticamente igual ao do genitor masculino, também apresentava corola branca com manchas esverdeadas como o genitor masculino, o que confirma a natureza híbrida da planta (Figura 5)



Figura 5: Cor da corola nos genitores e híbrido F<sub>1</sub>: A) Corola branca em *C. annuum* var. *annuum* (genitor feminino); B) Corola com manchas em *C. baccatum* var. *baccatum* (genitor masculino); C) Corola com manchas no híbrido F<sub>1</sub> *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*.

Nos cruzamentos recíprocos entre *C. chinense* e *C. annuum* var. *annuum*, os híbridos interespecíficos obtidos também apresentaram conteúdo de DNA com valores que não diferiam, significativamente, de um dos parentais. Na combinação *C. annuum* var. *annuum* x *C. chinense*, o híbrido resultante possuía tamanho do genoma maior do que a média dos pais, sendo agrupado com o genitor de maior conteúdo de DNA. No cruzamento recíproco, o híbrido obtido possuía tamanho de genoma menor do que a média do conteúdo de DNA dos pais, no entanto, apesar de não diferir, estatisticamente, da planta mãe, o híbrido, morfologicamente, apresentou diferenças em relação à mesma, como a cor vermelha dos frutos,

característica do genitor masculino, indicando que o mesmo não é proveniente de uma autofecundação.

Por fim, na última combinação híbrida, pode-se observar que, de forma semelhante à maioria dos outros cruzamentos, o híbrido possuía tamanho do genoma que não diferia, significativamente, do genitor com maior conteúdo de DNA. No entanto, de acordo com as características morfoagronômicas, os híbridos em questão possuíam características intermediárias aos dos genitores, como cor das anteras, peso, comprimento, largura e espessura do fruto.

### 3.2.5. CONCLUSÕES

✓ O tamanho do genoma das espécies estudadas é, em média, de 3784 Mpb, variando de 3359 Mpb em *C. frutescens* a 5599 Mpb em *C. parvifolium*;

✓ O tamanho do genoma dos híbridos foi variável conforme as espécies genitoras que os compõem, sendo que o híbrido com menor conteúdo foi proveniente da combinação *C. frutescens* x *C. chinense*, e o de maior conteúdo 2C de DNA foi *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *baccatum*.

✓ Para o tamanho do genoma ser um identificador de híbrido, é necessário que os genitores sejam contrastantes em relação ao conteúdo de DNA.

### **3.3. EFEITO DA TEMPERATURA NA VIABILIDADE POLÍNICA DE ESPÉCIES DE *Capsicum* COM BASE NA GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN *in vitro***

#### **3.3.1. INTRODUÇÃO**

O quinto relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), com base na revisão de milhares de pesquisas realizadas nos últimos cinco anos, mostra que a temperatura do planeta poderá aumentar até 4,8°C neste século, o que deve gerar grande impacto nos ecossistemas de todo o planeta.

Em 2013, o Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC) divulgou o sumário executivo de seu primeiro Relatório de Avaliação Nacional (RAN1). O documento, feito nos mesmos moldes do relatório do IPCC, indica que, no Brasil, o aumento de temperatura, até 2100, será entre 1°C e 6°C, em comparação à registrada no fim do século 20. Como consequência, deverá diminuir, significativamente, a ocorrência de chuvas em grande parte das regiões central, norte e nordeste do país (Fapesp, 2013).

As últimas três décadas têm sido, sucessivamente, mais quentes (IPCC, 2013), e o estresse térmico gerado pelo aumento da temperatura é um problema agrícola em muitas áreas do mundo. Altas temperaturas causam uma variedade de mudanças morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas, que afetam o crescimento e desenvolvimento vegetal e podem levar à redução drástica na produção econômica (Wahid *et al.*, 2007).

A temperatura constitui importante fator abiótico determinante da distribuição, da adaptabilidade e da produtividade das plantas (Larcher, 2003). As altas temperaturas não só provocam uma perda excessiva de água, como também inativam enzimas indispensáveis para a manutenção da vida (Taiz, 2004), além de provocar mudanças na fluidez das membranas, na estrutura dos ácidos nucleicos, assim como nas concentrações de metabólitos (Wang *et al.*, 2003 a; Howarth, 2005; Chinnusamy *et al.*, 2007). Em temperaturas altas, lesões celulares graves e, até mesmo, a morte celular pode ocorrer em questões de minutos (Schoffl *et al.*, 1999).

Alguns exemplos têm mostrado o efeito que o aquecimento global exerce sobre a produtividade de algumas culturas. O milho e a soja, no centro-oeste dos Estados Unidos, por exemplo, tiveram uma queda de 17% na produção de grãos (Lobell e Asner, 2003), enquanto o arroz teve uma redução de 15%, nas Filipinas, para cada aumento de 1°C na temperatura, durante a estação de crescimento (Peng, 2004).

Os dados indicam que o estresse da temperatura, sofrido durante o desenvolvimento do gameta, a fase entre a polinização e o desenvolvimento do zigoto e a fase do desenvolvimento do embrião, reduz a frutificação e o número de sementes (Hedhly *et al.*, 2008).

Durante o processo reprodutivo, cada condição climática desfavorável impõe um limite sobre o número de gametas que participam do processo de fertilização (Srinivasan *et al.*, 1999). Em especial, o desenvolvimento reprodutivo masculino é muito sensível a estresses abióticos; em particular, estresses ocasionados por altas e baixas temperaturas resultam em uma menor produção de sementes devido à esterilidade em muitas culturas (Endo *et al.*, 2009)

Os efeitos adversos causados pelo estresse da temperatura podem ser atenuados através do desenvolvimento de cultivares com melhor tolerância ao calor, usando várias abordagens genéticas. No entanto, para isso, uma compreensão completa das respostas fisiológicas das plantas a temperaturas elevadas, dos mecanismos de tolerância ao calor e possíveis estratégias para melhorar essa tolerância é imperativo (Wahid *et al.*, 2007).

Diferentes ferramentas estão disponíveis e esses estudos, incluem a avaliação do estigma e a receptividade do óvulo, bem como a germinação do pólen e o comportamento do tubo polínico e sua influência sobre a subsequente

frutificação (Hedhly *et al.*, 2008).

Devido ao seu papel fundamental no processo de fertilização, o tubo polínico tem sido objeto de vários estudos com o objetivo de estudar o efeito da temperatura sobre seu crescimento e germinação. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico, bem como determinar as temperaturas máxima, mínima e ótima para as espécies estudadas.

### 3.3.2. REVISÃO

#### 3.3.2.1. O grão de pólen

O grão de pólen é um corpúsculo que abriga o gametófito masculino tanto de angiospermas quanto das gimnospermas (Moore e Webb, 1978), constituindo-se em um elo entre cada geração e estando, portanto, envolvido com a reprodução e perpetuação das espécies. A reprodução sexual das plantas com flores começa com a entrega do núcleo espermático ao óvulo. Esse processo tem início com a deposição do grão de pólen, seja por insetos, vento ou outros meios, no estigma da planta (Krichevsky *et al.*, 2007).

A formação do grão de pólen ocorre dentro das anteras e compreende dois eventos: a microsporogênese e a microgametogênese (Mascarenhas, 1992; Horner e Palmer, 1995). Durante esses dois processos independentes, a célula-mãe do grão de pólen ou microsporócito presente nos sacos polínicos sofre meiose após a citocinese, dando origem a quatro micrósporos ou aos grãos de pólen jovens (microsporogênese) (Rodrigues *et al.*, 2004). O micrósporo sofre, então, uma divisão mitótica, resultando em dois núcleos, o reprodutivo e o germinativo. Posteriormente, ocorre a segunda divisão mitótica, que envolve, apenas, o núcleo germinativo. Essa divisão dá origem a duas células alongadas e em forma de meia-lua, denominadas células espermáticas (microgametogênese) (Santos e Zanettini, 2002).

De acordo com Mascarenhas (1992) e Horner e Palmer (1995), a

literatura relata vários genes que atuam durante a pré-meiose, a meiose e a pós-meiose, e qualquer anormalidade, durante o processo de formação dos grãos de pólen, pode resultar no surgimento de pólenes anormais ou inviáveis.

Existem dois tipos de grãos de pólen, os binucleados e os trinucleados. Grãos de pólen binucleados contêm uma célula generativa e uma vegetativa, e, nesse caso, a célula generativa se divide durante o crescimento do tubo polínico, dando origem a dois gametas masculinos. O grão de pólen trinucleado é formado quando a divisão da célula generativa ocorre antes do crescimento do tubo polínico (Brewbaker, 1957).

O tubo polínico é um prolongamento celular do grão de pólen formado após a germinação, no estigma da flor. A função do tubo polínico é transmitir os gametas do pólen até o ovário, permitindo que isso ocorra a longas distâncias, vários centímetros em alguns casos (Cresti *et al.*, 1992).

Em 70% das famílias de plantas, como é o caso da família *Solanácea*, a segunda divisão mitótica da célula generativa, que dá origem a duas células espermáticas, ocorre quando o tubo polínico cresce através do pistilo feminino (McCormick, 1993).

### **3.3.2.2. Viabilidade polínica**

A germinação e viabilidade do grão de pólen têm recebido considerável atenção devido à sua aplicação no melhoramento de plantas, na conservação e no entendimento da resposta fisiológica durante a fertilização (Khan e Perveen, 2006). Os programas de melhoramento genético vegetal estão fundamentados na obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no germoplasma de determinada espécie, e dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas, destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende, diretamente, da viabilidade do pólen (Techio *et al.*, 2006).

A capacidade de germinação do pólen pode interferir na taxa de frutificação (Mondal e Ghanta, 2012), visto que qualquer falha do grão de pólen para germinar e, posteriormente, para fertilizar um óvulo significa um resultado mal sucedido de um evento de polinização (Dafni, 1992). Assim, a viabilidade polínica é, geralmente, considerada como indicativo da capacidade do grão de

pólen de realizar sua função de liberar as células espermáticas no saco embrionário, permitindo que ocorra a fertilização (Shivanna *et al.*, 1991)

Considerando-se a função do grão de pólen no ciclo de vida de uma planta, uma maneira de testar a viabilidade polínica seria realizar a polinização e, posteriormente, analisar a frutificação. No entanto, devido ao tempo que essa atividade leva, outros métodos são, frequentemente, usados (Karakaya, 2011). Existe uma grande variedade de técnicas que podem ser usadas para a avaliação da viabilidade do grão de pólen (Oliveira *et al.*, 2001). Os métodos diretos incluem a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro*, e os indiretos são baseados em parâmetros citológicos, como a reação a corantes e fluorocromos (Shivanna e Johri, 1989; Dafni, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992, Kearns e Inouye, 1993).

Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos, que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Dentre esses testes, destacam-se os testes com lugol, carmim acético e a solução tripla de Alexander (Pagliarini e Pozzobon, 2004). O uso de corantes é um método mais rápido e, geralmente, mais utilizado pelos pesquisadores. Entretanto, nesse método, a viabilidade pode ser superestimada, pois, algumas vezes, grãos de pólen inviáveis podem ser corados, devido à presença suficiente de enzimas, amido ou outras substâncias (Rodriguez-Riano e Dafni, 2000).

Apesar dos testes de coloração serem procedimentos simples, eles não fornecem informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser avaliado através de testes de germinação *in vitro* (Techio *et al.*, 2006). Esse tipo de teste é considerado um dos melhores como indicativo da viabilidade (Shivanna *et al.*, 1991) e consiste em fazer germinar uma amostra de pólen em um meio de cultivo e observar, ao microscópio, a porcentagem de grãos que originam tubos polínicos (Stanley e Linskens, 1974). Os testes de germinação são considerados métodos seguros, pois partem do pressuposto de que o grão de pólen é capaz de germinar e produzir um tubo polínico *in vitro* e fertilizar o óvulo (Dafni, 1992).

### **3.3.2.3. Germinação *in vitro***

O teste de germinação *in vitro* tem, por princípio, a reprodução das condições naturais do estigma e estilete, nas quais o pólen germina, visto que, em condições naturais, o estilete supre o grão de pólen com água, açúcares e

aminoácidos, promovendo a germinação do tubo polínico (Kearns e Inoue 1993).

Os métodos de germinação *in vitro* são úteis em estudos sobre a fisiologia, bioquímica da germinação dos grãos de pólen, programas de melhoramento e armazenamento do pólen (Mercado *et al.*, 1994). No entanto, a taxa de germinação do pólen *in vitro* depende da determinação de um meio ótimo, que deve ser considerado como critério para viabilidade (Heslop-Harrison *et al.*, 1987).

Existe uma correlação entre a citologia do pólen e a perda da sua viabilidade (Brewbaker, 1957). Os grãos de pólen trinucleados perdem a viabilidade rapidamente e, dificilmente, germinam em meio artificial, ao contrário dos grãos de pólen binucleados.

Alguns fatores podem afetar a manutenção da capacidade germinativa do grão de pólen, como a umidade relativa, a temperatura ambiente (King, 1961; Gill *et al.*, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992), o vigor e o estágio fisiológico da planta e a idade da flor (Johri e Vasil, 1961; Shivanna e Johri, 1989). Em muitas espécies, baixas temperaturas e baixa umidade são favoráveis para a longevidade do pólen (Adhikari e Campbell, 1998).

Os grãos de pólen de algumas espécies podem germinar em água ou soluções aquosas sem aditivos (Gudadhe e Fhoran, 2012), no entanto diferentes espécies requerem uma variedade de meios de crescimento (Dafni, 1992), como água, açúcar, sais inorgânicos e vitaminas para uma germinação bem sucedida (Stanley e Linskens, 1974).

Segundo Mercado *et al.*, (1994), apesar da grande utilidade do método de germinação *in vitro* dos grãos de pólen, em *Capsicum*, não têm sido feitos muitos esforços nessa direção, a despeito de problemas, tais como baixa frutificação devido a um efeito negativo das baixas temperaturas sobre a fertilidade do pólen. Os métodos de germinação *in vitro* possuem grande importância; no entanto, o desenvolvimento desse método sofre influência de vários fatores, entre eles os constituintes utilizados no meio de cultura (Camolesi *et al.*, 2010). Açúcares, elementos nutrientes e algumas substâncias de crescimento e vitaminas têm sido usados para germinação do pólen de diferentes espécies vegetais (Gudadhe e Dhoran, 2012).

Os grãos de pólen das angiospermas precisam de uma fonte de carbono, de boro e de outros nutrientes para germinar (Galleta, 1983), sendo a sacarose e

o ácido bórico os constituintes básicos utilizados (Miranda e Clement, 1990).

Os carboidratos são os principais nutrientes que suportam o desenvolvimento do pólen (Pacini, 1996), enquanto a germinação requer açúcares simples como suas principais substâncias metabólicas (Stanley, 1971). Segundo Stanley e Linskens (1974), o açúcar promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, além de fornecer energia para o desenvolvimento do tubo polínico.

A sacarose constitui-se na melhor fonte de carboidrato para germinação e crescimento do tubo polínico para a maioria das espécies vegetais estudadas, podendo ser usada na avaliação da taxa de germinação do grão de pólen, como um indicativo da viabilidade polínica (Tupy, 1960 e Hrabetova e Tupy, 1964).

O papel do boro consiste no estímulo do crescimento do tubo polínico e na diminuição da probabilidade de rompimento dos mesmos (Franzon e Raseira, 2006). A adição do boro aumenta a eficiência da sacarose na germinação e no crescimento do tubo polínico (Almeida *et al.*, 1987), formando um complexo ionizável açúcar-borato, que reage de maneira mais rápida com as membranas celulares (Askin *et al.*, 1990). Segundo Brewbaker e Kwack (1963), juntamente com o cálcio, o boro é elemento essencial para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro*. Vários trabalhos realizados em diferentes culturas têm mostrado que a adição de boro ao meio tem melhorado a germinação dos grãos de pólen.

#### **3.3.2.4. Temperatura e a reprodução sexual**

As mudanças climáticas, especialmente o aumento na concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e os aumentos de temperatura associados, terão um significativo impacto sobre a produção das culturas (Prasad *et al.*, 2006).

Como um organismo sésil, as plantas estão, frequentemente, à mercê de fatores ambientais, como seca, frio, salinidade e altas temperaturas, que podem afetar, significativamente, o sucesso dos processos de reprodução (Giorno *et al.*, 2013). Em relação ao aquecimento global, efeitos imediatos já são observáveis, tanto em populações naturais como nos sistemas agrícolas (Hedhly *et al.*, 2008), sendo o desenvolvimento reprodutivo mais afetado do que o vegetativo (Sato *et al.*, 2006). Esses efeitos dizem respeito, principalmente, ao início precoce do

desenvolvimento sexual reprodutivo, dependendo das regiões e espécies em estudo, a expansão das plantas cultivadas e mudanças na distribuição geográfica de populações naturais para latitudes mais altas (Hedhly *et al.*, 2008).

Dados recentes de processos fisiológicos que são afetados pelo aumento das temperaturas parecem reforçar a susceptibilidade do processo de reprodução a mudanças climáticas (Hedhly *et al.*, 2008), e consequências diretas das mudanças de temperatura sobre a reprodução têm sido documentadas (Porter, 2005).

As altas temperaturas podem ocasionar desnaturação protéica, aumento da fluidez dos lipídeos da membrana, inativação das enzimas dos cloroplastos e mitocôndrias, inibição da síntese protéica e perda da integridade das membranas (Howarth, 2005). Além disso, o estresse, por altas ou baixas temperaturas, pode inibir a fotossíntese através de danos no fotossistema II (Zinn *et al.*, 2010) e a indução da produção de espécies reativas de oxigênio que, em níveis elevados, resultam em danos oxidativos e consequente morte celular (Apel e Hirt, 2004).

Os órgãos reprodutivos das plantas são mais vulneráveis a altas temperaturas antes e durante a época de floração (Reddy e Kakani, 2007). Essa sensibilidade é dependente do estágio do crescimento da flor e do genótipo utilizado (Kafizadeh *et al.*, 2008) e, quando ocorre durante o desenvolvimento dos gametas, feminino e masculino, afeta a reprodução das plantas a curto e longo prazo (Hedhly *et al.*, 2008).

O estresse gerado por altas e baixas temperaturas pode ter vários efeitos sobre os tecidos reprodutivos, que acabam por contribuir com a baixa produção de sementes. Entre essas consequências, estão: (1) o florescimento tardio ou precoce; assincronismo no desenvolvimento reprodutivo masculino e feminino; (2) defeitos nos tecidos parentais (corolas, carpelos e estames), como deformidades e redução de números e tamanho dos órgãos florais; (3) defeitos nos gametas masculinos e femininos, como esterilidade, deformidade nos ovários e redução do número de óvulos (Zinn *et al.*, 2010).

Como a maior parte da nossa alimentação é resultante da reprodução sexual das plantas com flores, a compreensão de como as diferentes espécies lidam com o estresse durante seus estágio reprodutivo é fundamental para o futuro da produtividade agrícola (Zinn *et al.*, 2010).

Aumentos na temperatura podem acelerar o florescimento, o que pode

fazer com que ocorra a reprodução antes que as plantas acumulem recursos adequados como a biomassa para destinar ao desenvolvimento das sementes (Zinn *et al.*, 2010). Além disso, durante a germinação das sementes, altas temperaturas podem retardar ou inibir, totalmente, a germinação, dependendo da espécie e da intensidade do estresse (Wahid *et al.*, 2007), e um curto período de temperaturas elevadas, durante o estágio reprodutivo, pode levar ao aborto dos botões florais (Guilioni *et al.*, 1997).

Devido a essa importância da temperatura sobre a reprodução sexuada e à observação de que o desenvolvimento do pólen possa ser o processo reprodutivo mais termossensível (Hedhly *et al.*, 2008; Zinn *et al.*, 2010), vários estudos têm investigado a resposta, ao estresse de temperatura, da germinação e do crescimento do tubo polínico como as temperaturas cardinais (máxima, ótima e mínima) em várias culturas (Sukhvibul *et al.*, 2000; Prasad *et al.*, 2011; Sakata *et al.*, 2000; Reddy e Kakani, 2007; Peet *et al.*, 1998; Sorkheh *et al.*, 2011) e, em menor escala, sobre o desenvolvimento reprodutor feminino (Saini *et al.*, 1983; Whittle *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 1999).

A reprodução sexual em espécies do gênero *Capsicum*, também, é suscetível aos estresses ambientais, sendo a temperatura o principal fator ambiental, influenciando a frutificação em pimentas, uma vez que condições de altas temperaturas, geralmente, causam abscisão das flores e aborto das sementes devido a falhas de polinização (Wien, 1997; Aloni *et al.*, 2001).

### **3.3.2.5. Efeito da temperatura nos grãos de pólen**

A fase reprodutiva das plantas é altamente sensível tanto ao calor quanto ao frio. Apenas um único dia muito quente ou uma única noite muito fria podem ser fatais para o sucesso do processo reprodutivo (Zinn *et al.*, 2010). Dados indicam que o estresse da temperatura, sofrido durante o desenvolvimento do gameta, a fase entre a polinização e o desenvolvimento do zigoto e a fase de desenvolvimento do embrião, reduz a frutificação e o número de sementes (Hedhly *et al.*, 2008).

Alguns processos são afetados, negativamente, pelas altas temperaturas como: a meiose; o desenvolvimento do endotécio na antera, resultando na

redução da deiscência da antera e liberação do pólen; o número de grãos de pólen retidos no estigma; a germinação do pólen; o crescimento do tubo polínico; a viabilidade do óvulo; o processo de fertilização e pós-fertilização; e o crescimento do endosperma e o do embrião (Kinet e Peet, 1997), sendo alguns estágios mais sensíveis do que outros (Giorno *et al.*, 2013)

O desenvolvimento reprodutivo masculino é altamente organizado e mais sensível a vários estresses ambientais, incluindo altas temperaturas (Endo *et al.*, 2009). Trabalhos abordando o efeito da temperatura sobre a morfologia dos grãos de pólen, deiscências das anteras (Koti *et al.*, 2005), composição química e metabolismo do grão de pólen (Aloni *et al.*, 2001) têm sido realizados. Além disso, testes de viabilidade em plantas expostas a estresse de temperatura podem ser usados para uma triagem de tolerância ao calor, permitindo uma diferenciação entre plantas suscetíveis e tolerantes ao calor (Gaur *et al.*, 2013).

Young *et al.*, (2004) demonstraram a maior suscetibilidade do pólen a altas temperaturas, em relação aos órgãos reprodutivos femininos, ao realizar cruzamentos recíprocos em *Brassica napus*. Os autores observaram que a frutificação foi reduzida em 88% quando as plantas doadoras de pólen foram submetidas a altas temperaturas, enquanto que a redução foi, apenas, de 37% quando as plantas receptoras foram tratadas com altas temperaturas.

Um dos mais suscetíveis estádios fenológicos a altas temperaturas é o estágio de polinização (Hatfield, 2013), visto que, embora diferentes genótipos não respondam de forma igual a esse estresse, trabalhos têm demonstrado que a falta de viabilidade do pólen é o principal fator para a não frutificação (Kafizadeh *et al.*, 2008).

Em geral, as altas temperaturas causam macho-esterilidade em muitas espécies de plantas (Sakata e Higashitani, 2008). Em arroz (*Oryza sativa* L.), a viabilidade polínica e a produção declinam quando a temperatura máxima do dia excede 33 °C e vai a zero quando exposto a temperaturas acima de 40°C (Kim *et al.*, 1996), já tomates, sob estresse de temperatura, são incapazes de produzir pólenes viáveis, o que reduz a frutificação (Sato *et al.*, 2000). Kumar *et al.*, (2013), trabalhando com grão de bico, observaram um declínio na viabilidade polínica, na germinação do pólen, no crescimento do tubo polínico e na receptividade do estigma com o aumento da temperatura.

As falhas na produção de frutos têm, principalmente, sido atribuídas à alta

sensibilidade do desenvolvimento das anteras e do grão de pólen em certas fases do desenvolvimento (Giorno *et al.*, 2013). As células esporogênicas se diferenciam em células mãe de grãos de pólen e entram em meiose. Enquanto isso, as células da parede da antera são degradadas durante a maturação do pólen, e, após sua deiscência, o pólen maduro é liberado (Sakata e Higashitani, 2008).

Endo *et al.*, (2009) testando o efeito de altas temperaturas em plantas de arroz, obtiveram resultados que sugerem que nem todos os genes do tapete são inibidos com temperaturas elevadas e que nem o próprio tapete é degradado; no entanto, as altas temperaturas podem interromper algumas das suas funções que são requeridas para adesão do pólen e germinação sobre o estigma.

Em trigo, o estresse pelo calor pode induzir a degradação do tapete, tecido que nutre as células mães de grão de pólen durante a microsporogênese, e isso pode levar à esterilidade do pólen (Sakata *et al.*, 2000), já que os micrósporos não podem completar a primeira mitose ou, em alguns casos, mesmo completando a mitose I, não conseguem se dividir novamente (Saini *et al.*, 1984). Já em tomate e arroz, altas temperaturas causam má deiscência das anteras, reduzindo a dispersão de grãos de pólen (Matsui e Omasa, 2002; Sato *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos, comparando genótipos com diferente tolerância ao estresse térmico, têm sido realizados (Craufurd *et al.*, 2003; Reddy e Kakani, 2007; Acar e Kakani, 2010). Nesses trabalhos, as temperaturas cardinais (temperatura mínima, ótima e máxima) têm sido determinadas. A temperatura limite de uma espécie se refere a um valor de temperatura média diária, na qual começa uma redução detectável do crescimento. A temperatura mínima é aquela na qual, abaixo dela, o crescimento ou desenvolvimento da planta é interrompido, já a temperatura máxima é aquela acima da qual o crescimento é interrompido (Wahid *et al.*, 2007).

### **3.3.2.6. O gênero *Capsicum* e o efeito da temperatura**

Devido à maior sensibilidade do gametófito masculino e ao fato de que o efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen é variável e dependente da espécie ou cultivar estudada (Sukhvibul *et al.*, 2000), Reddy e

Kakani (2007) buscaram determinar o efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen e identificar diferenças entre espécies/genótipos em *Capsicum*. Para isso, os autores determinaram as temperaturas cardinais dos genótipos estudados e diferenciaram aqueles tolerantes (*C. annuum*– México), intermediários (*C. chacoense* - Argentina e Guatemala) e sensíveis (*C. frutescens* - China, *C. annuum* - Coreia do Sul, e *C. pubescens* - Guatemala) a altas temperaturas. Os genótipos tolerantes poderão ser utilizados em programas de melhoramento, visando ao desenvolvimento de novos genótipos que sejam capazes de suportar condições de altas temperaturas.

Kafizadeh *et al.*, (2008) estudaram o efeito do calor sobre os grãos de pólen de *C. annuum*. Flores foram retiradas e colocadas a 38°C (tratamento) e 25°C (controle), por 8 horas, e, posteriormente, foram observados a viabilidade polínica, o crescimento do tubo polínico e o crescimento dentro do estilete. Os autores observaram que tanto a viabilidade quanto o crescimento do tubo polínico foram, consideravelmente, reduzidos a 38°C.

Gajanayake *et al.*, (2011) analisaram parâmetros polínicos e fisiológicos, visando observar a tolerância de pimentas ornamentais (*C. annuum*) a altas e baixas temperaturas. A germinação do pólen *in vitro* e o crescimento do tubo polínico de 12 cultivares foram mensurados em diferentes temperaturas (10 a 45°C), sendo estimadas as temperaturas cardinais (máxima, ótima e mínima). Foi, também, mensurado, durante o florescimento a termo-estabilidade da membrana, o índice de estabilidade da clorofila e a viabilidade do pólen. Os autores observaram que existiu uma diferença significativa entre as cultivares em todos os parâmetros analisados, sendo distinguidas cultivares com alta sensibilidade, intermediárias e tolerantes a altas temperaturas. Além disso, as cultivares foram classificadas em sensíveis e moderadamente sensíveis ao frio e tolerantes e moderadamente tolerantes ao frio. A identificação de cultivares tolerantes ao frio e ao calor são potenciais candidatas em programas de melhoramento, visando ao desenvolvimento de novos genótipos para tolerância ao frio e ao calor.

Além de afetar a germinação do pólen, o crescimento do tubo polínico e a fertilização, as altas temperaturas, durante a época de florescimento, também afetam as flores e os frutos de pimentas. Alguns trabalhos, envolvendo a observação da produção de pimentas em ambientes de campo e controlados, mostram que ocorre aborto dos botões florais quando as temperaturas do dia são

maiores que 34°C ou as temperaturas noturnas são maiores que 21°C por longos períodos de tempo (Erickson e Marhart, 2002).

Erickson e Marhart (2002) submeteram botões florais de pimentão (*C. annuum* var. *annuum*) em quatro diferentes estádios de desenvolvimento (pré-meiose até meiose das células mãe de grão de pólen; formação e dissolução da tétrade; micrósporos jovens; micrósporos maduros) à temperatura de 33°C por 6, 48 ou 120 horas, sendo o controle mantido à temperatura de 25/21°C (dia e noite). Como resultado, os autores observaram que o primeiro e último estádio, submetidos a 33°C, reduziram a frutificação, mostrando que o pimentão é sensível à exposição de temperatura durante a microsporogênese e antese. O exame morfológico mostrou que os meiócitos iniciaram a formação das tétrades, mas, após a dissolução, os micrósporos permaneceram pequenos e agregados sem uma exina espessa.

O desenvolvimento e germinação polínica dependem da captação e metabolismo de açúcar do pólen (Karni e Aloni, 2002). Pensando nisso, Aloni *et al.*, (2001) investigaram a forma como as altas temperaturas afetam as mudanças no conteúdo de carboidratos nos pólenes de pimentão (*C. annuum*). Nesse trabalho, a germinação *in vitro* dos grãos de pólen das plantas submetidas à alta temperatura (32/26°C) foi muito reduzida. No entanto, quando essas plantas foram submetidas à concentração de CO<sub>2</sub> elevada, ocorreu uma restauração da germinação, o que não ocorreu com as plantas não tratadas.

Nos grãos de pólen submetidos ao estresse da temperatura, ocorreu um aumento na concentração de sacarose e amido quando comparado às plantas não tratadas. Isso sugere que, sob condições de estresse térmico, existiu uma redução na utilização de sacarose e amido nos grãos de pólen, resultando em concentrações mais altas, possibilidade que é suportada pelo fato de que as concentrações foram menores em plantas submetidas ao estresse e CO<sub>2</sub> do que em plantas, apenas, submetidas ao calor. A concentração elevada de CO<sub>2</sub> diminuiu a inibição do metabolismo, aumentando a utilização do amido e da sacarose para germinação do pólen sob condições de estresse de temperatura (Aloni *et al.*, 2001).

Karni e Aloni (2002) investigaram as mudanças na atividade da frutoquinase (FK) e hexoquinase (HK) em flores de pimentão, durante seu desenvolvimento e estudaram o possível papel dessas enzimas na determinação

da capacidade de germinação sob altas temperaturas e concentrações de CO<sub>2</sub>. A sacarose acumulada durante o desenvolvimento do grão de pólen (Aloni *et al.*, 2001) é hidrolisada, liberando frutose e glicose que são, rapidamente, metabolizadas no início da germinação, iniciando com a sua fosforilação pelas FK e HK (Karni e Aloni, 2002).

Os resultados de Karni e Aloni (2002) mostraram o efeito da elevação da temperatura sobre essas duas enzimas, uma vez que promoveu a atividade da FK no pólen maduro. Já com altas concentrações de CO<sub>2</sub>, a atividade da FK foi elevada. Isso sugere que a FK possa ter um papel na regulação da germinação do pólen, visto que, com altas temperaturas, a germinação foi reduzida. É possível que a FK forneça frutose-6-fostato para glicólise ou participe da conversão UDP-glicose para suportar a biossíntese do material da parede celular para o crescimento do tubo polínico. A atividade da HK não mudou durante o desenvolvimento do pólen (Karni e Aloni, 2002).

O efeito das altas temperaturas, em frutos de pimenta (*C. annuum*), foi investigado por Pagamas e Nawata (2008). Plantas foram submetidas a temperaturas de 38/30°C (dia/noite), durante diferentes períodos de desenvolvimento, após a antese. Esse estresse por calor afetou, negativamente, o crescimento dos frutos e a produção e qualidade das sementes. Entre os dados gerados, pode-se citar uma redução no período de crescimento, na largura, na massa e comprimento dos frutos, além da redução na produção de sementes. Ocorreu, também, um aumento na proporção de sementes anormais por frutos, além da inibição do acúmulo de carboidratos, afetando a germinação e o vigor das sementes.

Segundo os autores, uma redução no número de sementes por fruto pode ter sido, parcialmente, responsável por uma redução no tamanho dos frutos. Além disso, a literatura reporta que altas temperaturas promovem um amadurecimento mais rápido dos frutos como um mecanismo de adaptação a condições de estresse, permitindo que as plantas dispersem suas sementes mais rápido (Pagamas e Nawata, 2008). Os resultados mostraram que as altas temperaturas, na fase de pós-antese, causam efeitos adversos no desenvolvimento do fruto e da semente. Além disso, o estágio de desenvolvimento exposto a esse estresse é importante para o crescimento dos frutos e das sementes (Pagamas e Nawata, 2008).

Além das altas temperaturas, também tem sido reportado que o frio produz efeitos sobre a morfologia e função das flores em pimentas (Shaked *et al.*, 2004), causando danos à polinização e à fertilização, levando à redução do número e da viabilidade de grãos de pólen (Pressman *et al.*, 1998) e a formação de frutos partenocárpicos que tendem à abscisão (Usman *et al.*, 1999).

Shaked *et al.*, (2004) submeteram quatro cultivares de pimentas a baixas temperaturas noturnas ( $10 \pm 2$  °C) e a temperaturas diurnas que não excederam 24°C. Essas condições causaram um decréscimo no número de grãos de pólen e uma redução na sua germinação, em comparação com plantas controles. Análises dos conteúdos de carboidratos, nos últimos estádios de desenvolvimento do pólen, mostraram que ocorreu uma redução na concentração de amido, antes da antese e uma diminuição na concentração de sacarose e da glicose e frutose na antese. Isso sugere que temperaturas baixas impedem o funcionamento do pólen em pimentas ao interferir no acúmulo de amido, diminuindo, assim, a concentração de açúcar solúvel nos pólenes maduros. Além disso, os autores observaram a presença de frutos menores, sem sementes e disformes.

Pressman *et al.*, (2006) observaram que plantas de duas cultivares de pimenta (*C. annuum*), quando submetidas a baixas temperaturas noturnas (10°C) e moderada temperatura diurna (25°C), exibiram crescimento retardado, redução do número de folhas e frutos deformados com pouca ou nenhuma semente. Além disso, ocorreu uma redução no número e qualidade dos grãos de pólen, esta última característica associada à redução do acúmulo de amido e decréscimo de mais do que duas vezes no total de açúcares solúveis nos pólenes maduros. No entanto, os autores observaram que todos esses sintomas não ocorreram com a exposição das plantas a altas temperaturas (36°C) durante o dia.

### **3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.3.1. Materiais**

No presente estudo, foram utilizadas amostras de grãos de pólen da

variedade Casca Dura Ikeda (*C. annuum*) e de mais três acessos do gênero *Capsicum*, que fazem parte da coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF): UENF 1559 (*C. annuum* var. *glabriusculum*), UENF 1636 (*C. frutescens*), UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*) e UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*).

Os genótipos foram, inicialmente, colocados para germinar em B.O.D., a 27,5°C, em 8 horas de luz e 16 horas de escuro e, posteriormente, cultivados em vasos de cinco litros, sendo dez plantas por espécie.

Os testes de germinação foram todos realizados no setor de Citogenética do laboratório de melhoramento genético vegetal da UENF.

### **3.3.3.2. Métodos**

#### **3.3.3.2.1. Determinação de meio de cultura adequado para germinação dos grãos de pólen**

Foram testadas três concentrações de sacarose (0, 5, 10%) e quatro de ácido bórico (0; 7,5; 15ppm; 30 ppm), em arranjo fatorial com 12 tratamentos (3x4) e duas repetições. Flores recém-abertas foram coletadas pela manhã, entre 08 e 09 horas, e suas anteras foram misturadas e colocadas sob lâmpadas incandescentes, visando à deiscência das mesmas. No momento do preparo das lâminas, os grãos de pólen foram distribuídos sobre lâminas, contendo 100 µl das diferentes concentrações testadas, e as mesmas foram colocadas em câmara úmida e deixadas à temperatura ambiente (~25° C).

As avaliações de germinação do pólen foram realizadas cinco horas após sua distribuição nas lâminas, através da razão entre o número de pólenes germinados e o número total de pólenes observados, ao acaso, na lâmina. Foram feitas duas lâminas por tratamento, sendo contabilizados 150 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 300 grãos de pólen por genótipo, por tratamento. Foram considerados germinados os grãos de pólen cujo comprimento do tubo polínico foi superior ao diâmetro do grão de pólen.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas via teste Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Genes (Cruz, 2006) e análise de regressão com auxílio do programa SigmaPlot.

Para a realização desse experimento, as espécies utilizadas foram *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda'), *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495). As demais espécies não chegaram a ser testadas para a determinação do melhor meio de cultura, visto que o meio que proporcionou maior porcentagem de germinação dos grãos de pólen foi o mesmo para as três espécies. Portanto, esse meio de cultura foi, também, utilizado no estudo do efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos de pólen nos demais acessos. Os grãos de pólen do acesso UENF 1785 (*C. chinense*) não germinaram com nenhum dos meios de cultura, não sendo, portanto, utilizados nos atuais experimentos.

### 3.3.3.2.2. Efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos de pólen

Flores foram coletadas pela manhã, e, após a deiscência das anteras, os grãos de pólen foram distribuídos sobre lâminas, contendo 100µl do meio de germinação determinado no experimento anterior (10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico). As lâminas foram, então, colocadas em câmaras úmidas e submetidas a temperaturas controladas de 15 a 40°C, em intervalos de 5°C.

Em cada genótipo, foram feitas cinco lâminas por tratamento, sendo contabilizados 500 grãos de pólen por lâmina, perfazendo um total de 2500 grãos de pólen por tratamento.

Os dados de germinação *in vitro*, em resposta à temperatura, foram submetidos à análise de regressão. O ajuste de cada equação de regressão, descrevendo a resposta da germinação do pólen à temperatura, foi comparado pela variação explicada pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e pelo erro padrão. O mais alto  $R^2$  e o menor erro padrão foram utilizados para selecionar o modelo de regressão mais adequado aos dados.

As temperaturas cardinais mínima ( $T_{min}$ ), ótima ( $T_{otm}$ ) e máxima ( $T_{max}$ ) foram estimadas de acordo com o modelo de regressão. Como o modelo que mais se ajustou aos dados foi o quadrático, o mesmo foi transformado em uma equação de segundo grau, onde foram obtidas duas raízes, a raiz de menor valor indicou a temperatura mínima de germinação e a raiz de maior valor, a temperatura máxima. A temperatura ótima foi determinada através da estimativa do vértice da parábola, o qual indica, exatamente, onde a curva deixa de ser

côncava e passa a ser convexa.

$$\text{Germinação do grão de pólen} = a + bx + cx^2 = 0$$

$$T_{\text{ótima}} = \frac{-b}{2c}$$

$$T_{\text{mínima}} = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2c}$$

$$T_{\text{máxima}} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2c}$$

### 3.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.4.1. Determinação de meio de cultura adequado para germinação dos grãos de pólen

O teste de normalidade realizado com os dados de germinação indicaram que os resultados seguem uma distribuição normal (dados não mostrados). De acordo com os resultados observados para os três acessos, houve efeito significativo para ácido bórico e para interação entre os fatores estudados (sacarose x ácido bórico) (Tabelas 1, 2 e 3), indicando que o efeito do ácido bórico, na presença ou ausência da sacarose, é, significativamente, distinto do seu efeito isolado. Já na espécie *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), houve efeito significativo, também, para sacarose.

O açúcar promove o equilíbrio osmótico entre o pólen e o meio de germinação, além de fornecer energia para o desenvolvimento do tubo polínico (Stanley e Linskens, 1974). Os grãos de pólen das pimentas acumulam sacarose durante sua maturação e após sua hidrólise, a glicose e a frutose liberadas são, rapidamente, metabolizadas no início da germinação (Karni e Aloni, 2002). O papel do boro consiste no estímulo do crescimento do tubo polínico, uma vez que,

na ausência de uma fonte de boro, ocorre a inibição do crescimento do tubo, podendo, também, ocorrer ruptura do mesmo (Wang *et al.*, 2003 b). Segundo Almeida *et al.*, (1987), a combinação do boro com a sacarose aumenta a eficiência desta última em promover a germinação e o crescimento do tubo polínico

Tabela 1. Resumo da análise de variância para germinação dos grãos de pólen de *C. frutescens* (UENF1636) submetidos a diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

<b>Causas de Variação</b>	<b>GI</b>	<b>Quadrado Médio (%)</b>	<b>F</b>
Ácido Bórico	3	3032,0205	10,14946*
Sacarose	2	743,07334	2,48738
Sacarose x Ácido Bórico	6	298,73717	7,08368*
Resíduo	12	42,1726	
Total	23		
<b>Média Geral</b>		27	
<b>C.V (%)</b>		24,05	

\*Significativo a 5% de probabilidade

Tabela 2. Resumo da análise de variância para germinação dos grãos de pólen de *C. annuum* var *annuum* ('Casca Dura Ikeda') submetidos a diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

<b>Causas de Variação</b>	<b>GI</b>	<b>Quadrado Médio (%)</b>	<b>F</b>
Ácido Bórico	3	6072,04112	92,06584*
Sacarose	2	70,07696	1,06252
Sacarose x Ácido Bórico	6	65,95325	12,49377*
Resíduo	12	5,27889	
Total	23		
<b>Média Geral</b>		40,9	
<b>C.V (%)</b>		5,61	

Tabela 3. Resumo da análise de variância para germinação dos grãos de pólen de *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) submetidos a diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

<b>Causas de Variação</b>	<b>GI</b>	<b>Quadrado Médio (%)</b>	<b>F</b>
Ácido Bórico	3	4265,4593	39,33*
Sacarose	2	754,2712	6,95*
Sacarose x Ácido Bórico	6	108,4355	11,20*
Resíduo	12	9,6814	
Total	23		
<b>Média Geral</b>		34,36	
<b>C.V (%)</b>		9,05	

\*Significativo a 5% de probabilidade

Nas Tabelas 4, 5 e 6, estão apresentadas as médias da porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *C. frutescens* (UENF 1636), *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), respectivamente, submetidos a diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico. Nas condições testadas, foram encontradas diferenças significativas na germinação dos grãos de pólen entre as combinações, dentro de cada acesso trabalhado.

O percentual de germinação em *C. frutescens* (UENF1636) variou de 0% no tratamento com 5 ou 10 % de sacarose e 0ppm de ácido bórico, a 78,66%, na combinação 10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico (Tabela 4 e Figura 1).

Tabela 4. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *C. frutescens* (UENF1636) em diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

Sacarose (%)	Percentagem de Germinação (%)			
	Ácido Bórico (ppm)			
	0	7,5	15	30
0	0,33 Ab	5,67 Bb	33,33 Aa	29 Ca
5	0 Ac	20 Ab	39,67 Aa	50,66 Ba
10	0 Ac	33 Ab	33,66 Ab	78,66 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade.

O percentual de germinação em *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') variou de 0% no tratamento com 0 ou 5 % de sacarose e 0ppm de ácido bórico, a 75,33%, na combinação 10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico (Tabela 5 e Figura 1).

Tabela 5. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') em diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

Sacarose (%)	Porcentagem de Germinação (%)			
	Ácido Bórico (ppm)			
	0	7,5	15	30
0	0 Ad	33,33 Ac	51,67 Bb	67 Ba
5	0 Ac	29,33 Ab	69,33 Aa	64,66 Ba
10	0,33 Ad	31,67 Ac	68,33 Ab	75,33 Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade.

Em *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), a percentagem de grãos de pólen germinados variou de 0% nos tratamentos com 0, 5 e 10% de sacarose e 0ppm de ácido bórico, a 69,67%, na combinação 10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico (Tabela 6 e Figura 1).

Tabela 6. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) em diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico

Sacarose (%)	Porcentagem de Germinação (%)			
	Ácido Bórico (ppm)			
	0	7,5	15	30
0	0,00Ab	8,33Bb	43,00Ca	45,33Ca
5	0,00Ac	33,00Ab	54,33Ba	54,33Ba
10	0,00Ac	38,33Ab	66,00Aa	69,67Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tuckey a nível de 5% de probabilidade.

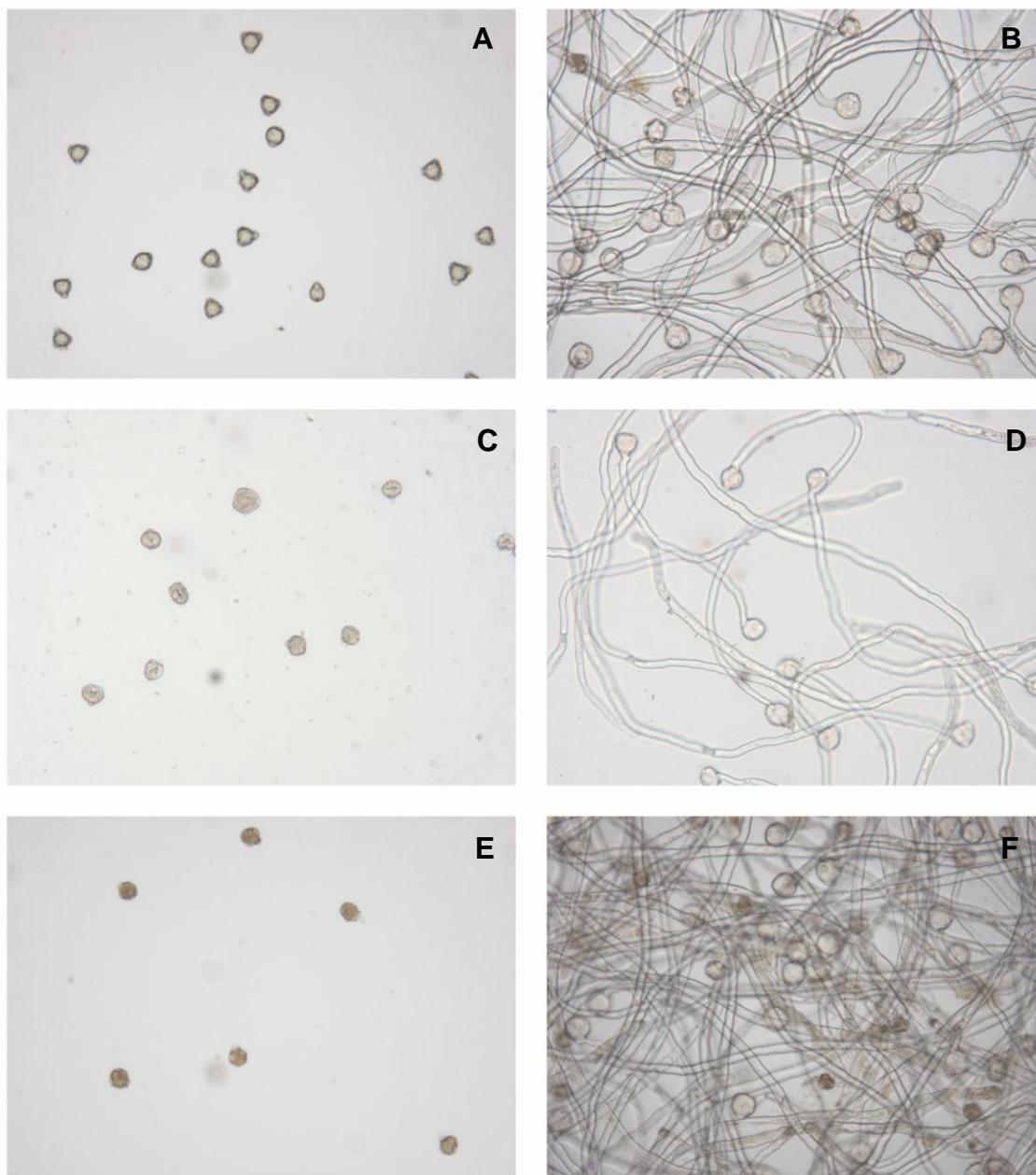


Figura 1. Germinação *in vitro* de grãos de pólen e crescimento dos tubos polínicos submetidos a diferentes concentrações de sacarose (S) e ácido bórico (AB): A) *C. annuum* var. *annuum* (0% S; 0ppm AB); B) *C. annuum* var. *annuum* (10% S; 30ppm AB); C) *C. frutescens* (0% S; 0ppm AB); D) *C. frutescens* (10% S; 30 ppm AB); E) *C. baccatum* var. *baccatum* (0% S; 0 ppm AB); F) *C. baccatum* var. *baccatum* (10% S; 30 ppm AB).

Devido ao efeito significativo do ácido bórico nos três genótipos estudados, foi observado seu efeito isolado através da análise de regressão. Também foi observado o efeito isolado da sacarose em *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) (Figura 2). Pode-se observar que, com a elevação na concentração do ácido bórico, houve um aumento na porcentagem de grãos de pólen germinados em todos os genótipos; no entanto, em *C. annuum* var. *annuum* e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), o aumento na concentração de 15ppm de ácido bórico para 30ppm não aumentou a germinação de forma expressiva (Figura 2). Segundo Brewbaker e Kwack (1963), juntamente com o cálcio, o boro é elemento essencial para o início do prolongamento da intina e formação do tubo polínico *in vitro*.

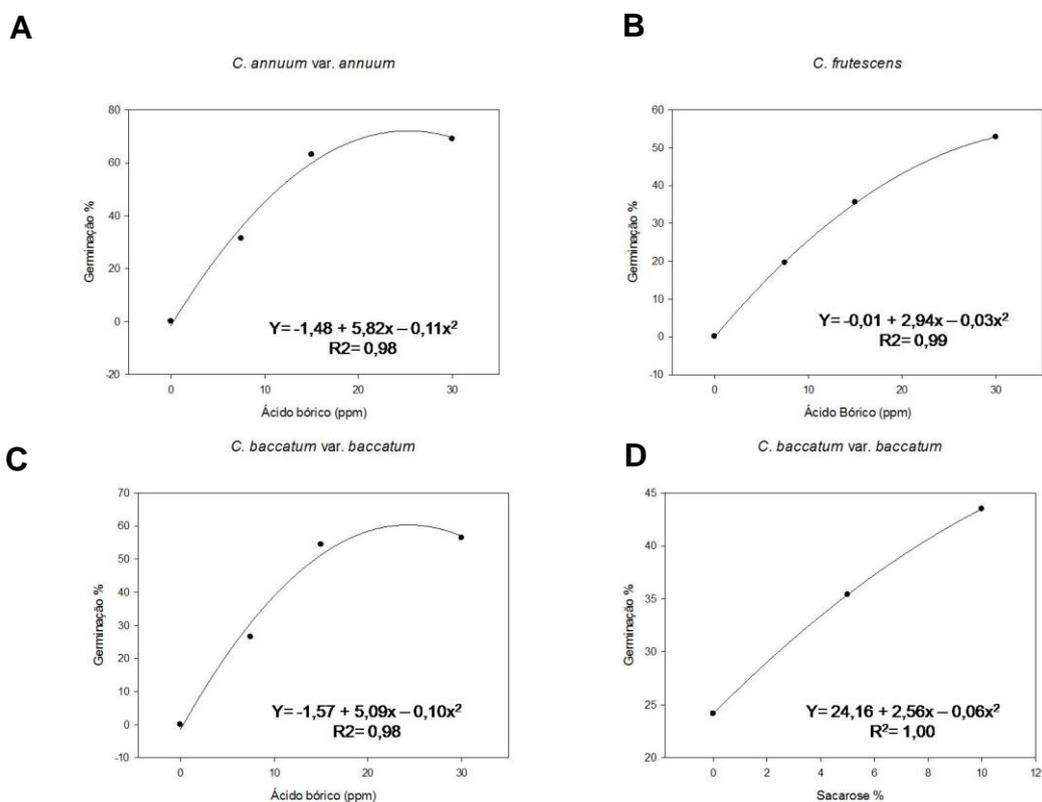


Figura 2. Porcentagem de grãos de pólen germinados *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose e ácido bórico em *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') (A), *C. frutescens* (UENF 1636) (C) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) (C,D).

Vários trabalhos realizados em diferentes culturas têm mostrado que a adição de boro ao meio tem melhorado a germinação dos grãos de pólen. Mercado *et al.*, (1994), ao observar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen em

*C. annuum*, observaram que a adição de ácido bórico ao meio foi essencial para promover a germinação do pólen, mostrando-se como o componente mais eficaz na promoção da germinação, enquanto que, em contrapartida, os grãos de pólen foram capazes de germinar mesmo em meio sem sacarose.

Em *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), observa-se que, na ausência do ácido bórico, o percentual de germinação foi aumentado gradativamente, à medida que a concentração de sacarose foi sendo elevada, mostrando que a concentração de 10% de sacarose foi a que propiciou o maior número de grãos de pólen germinados. De acordo com Mondal e Ghanta (2012), o suprimento extra de sacarose mantém a pressão osmótica e atua como um substrato para o metabolismo do grão de pólen.

Assim, o meio que possibilitou maior índice de germinação foi o constituído por 10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico para ambas as espécies.

#### **3.3.4.2. Efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos pólenes**

A máxima percentagem de germinação foi de 87,4% em *C. annuum* var. *annuum* a 30°C; 39,64% em *C. annuum* var. *glabriusculum* a 20°C; 42,76% em *C. baccatum* var. *pendulum* a 20°C; 68,64% em *C. baccatum* var. *baccatum* a 20°C; e 96,08% em *C. frutescens* a 25°C (Tabela 7). Em todos os genótipos, a média de germinação, na temperatura de 40°C, foi bastante reduzida, sendo quase nula para a maioria dos genótipos, com exceção de *C. frutescens*, que apresentou o maior valor (16,48%). Já na menor temperatura testada (15°C), a resposta dos genótipos foi muito diversificada, com média de percentagem de germinação variando de 5,88% (*C. annuum* var. *annuum*) a 61,48% (*C. frutescens*).

Tabela 7. Médias da percentagem de germinação dos grãos de pólen dos genótipos de *Capsicum* submetidos a diferentes temperaturas

Genótipos	Temperaturas					
	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	5,88	67,56	69,4	87,4	78,48	0,32
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	30,8	39,64	35,44	34,92	8,52	0,00
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	30,52	42,76	35,08	29,2	29,08	1,00
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	40,08	68,64	50,76	39,12	19,68	8,04
<i>C. frutescens</i>	61,48	66,92	96,08	49,84	31,44	16,48

O estudo da germinação *in vitro*, usando modelos de regressão como o quadrático, tem sido realizado, visando à determinação das temperaturas cardinais mínima, ótima e máxima de germinação (Acar e Kakani *et al.*, 2010; Salem *et al.*, 2007). No presente trabalho, o modelo quadrático se ajustou bem aos dados de germinação do grão pólen das espécies de *Capsicum*, com R<sup>2</sup> variando de 0,77 a 0,92. As temperaturas cardinais (T<sub>min</sub>, T<sub>otm</sub> e T<sub>max</sub>) encontram-se na tabela 8.

Tabela 8. Temperaturas cardinais das diferentes espécies de *Capsicum*

Genótipos	Temperaturas		
	Mínima	Ótima	Máxima
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	14,58	27,63	40,63
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	4,41	22,83	41,25
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	5,00	23,41	41,82
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	2,21	22,57	42,92
<i>C. frutescens</i>	3,42	23,3	43,17
Média	5,29	23,94	41,95

O efeito que a temperatura e o clima têm sobre o cultivo das diferentes espécies de *Capsicum* é de grande importância. De acordo com Viñals *et al.*,

(1996), a distribuição geográfica do gênero *Capsicum* ocorreu em concordância com os três complexos gênicos formados de acordo com a cruzabilidade entre as espécies. Essa distribuição está associada às condições climáticas favoráveis a cada um dos complexos gênicos. O complexo *C. annuum*, possivelmente, originou-se nas regiões tropicais baixas da América do Sul e Central, devido à sua afinidade com os ambientes mais úmidos. O complexo *C. baccatum* possui características relacionadas a ambientes secos e, por isso, pode ter se originado na região Centro-sul da Bolívia, enquanto as espécies de *C. pubescens* encontram-se nas regiões altas dos Andes, estendendo-se pelo Norte da América Central e pelo México.

A temperatura ótima para germinação dos grãos de pólen variou de 22,57°C em *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) a 27,63°C em *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda'), sendo a média encontrada de 23,9 °C. As pimentas evoluíram em regiões da América do Sul e Central e, por isso, requerem climas tropicais e subtropicais para se desenvolver. Altas temperaturas são necessárias para o seu desenvolvimento inicial, durante a germinação. Em plantas jovens antes da floração, a temperatura diurna ótima é entre 24 e 29°C, com uma temperatura noturna de 10 a 16°C. Já no momento em que as plantas começam a florescer, a melhor temperatura para a frutificação é entre 18 e 27°C. A frutificação não ocorre em períodos de tempo quente prolongado (McCormack, 2005).

Mudanças na temperatura podem afetar uma grande variedade de funções fisiológicas e o desenvolvimento morfológico (Mateos *et al.*, 2013). Além de afetar a germinação do pólen, o crescimento do tubo polínico e a fertilização, as altas temperaturas, durante a época de florescimento, também afetam as flores e os frutos de pimentas (Erickson e Marhart, 2002; Pagamas e Nawata, 2008; Polowick e Sawheney, 1985).

A figura 3 mostra a variação da germinação dos grãos de pólen de *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') e *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559) em resposta às diferentes temperaturas testadas.

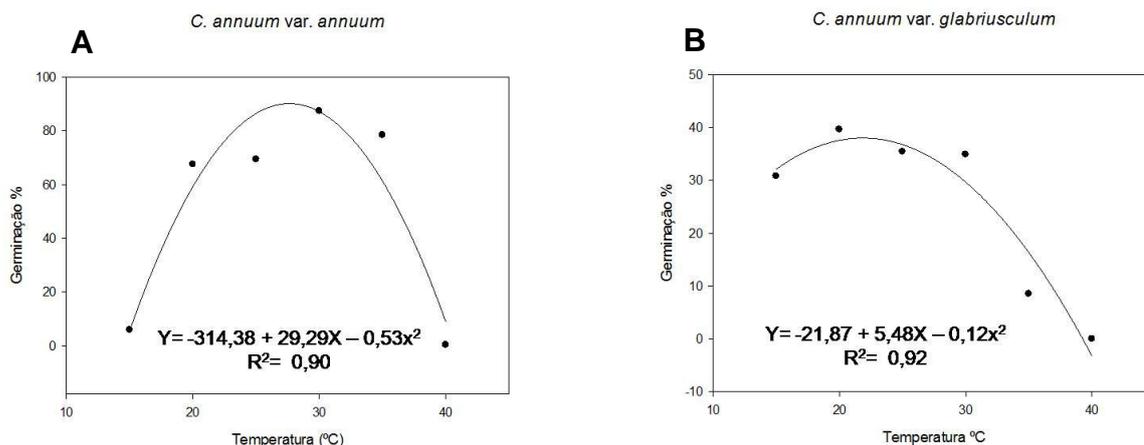


Figura 3. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen em resposta a variações de temperatura em *C. annuum* var. *annuum* (A) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (B).

Em *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda'), observa-se um aumento no percentual de germinação até por volta de 30°C; após essa temperatura, o índice de germinação decresceu. Com o resultado das temperaturas cardinais, a temperatura mínima obtida foi de 14,58°C, enquanto a temperatura máxima foi de 40,63°C.. Isso mostra que, abaixo de 14,58°C e acima de 40,63°C, a germinação dos grãos de pólen pode não ocorrer, enquanto, na temperatura de 27,63°C, o grão de pólen atinge o máximo de germinação.

Resultados semelhantes foram obtidos por Reddy e Kakani (2007), que, observando a resposta da germinação e do crescimento do tubo polínico de diferentes espécies de *Capsicum* à variação da temperatura, obtiveram valores de temperatura mínima para *C. annuum* de 14,8°C, temperatura ótima de 30,8 e 29,1°C e temperatura máxima de 40,0 e 43,7 para dois genótipos.

Mercado *et al.*, (1997), estudando o efeito das baixas temperaturas sobre a morfologia e fertilidade do pólen de pimentão (*C. annuum* var. *annuum*), observaram que temperaturas noturnas de 10 a 15°C diminuíram a viabilidade polínica, estimada por germinação *in vitro*, coloração com carmim acético e pelo decréscimo no número de sementes por fruto. Além disso, grãos de pólen que se desenvolveram em baixas temperaturas (25/14°C, dia/noite) mostraram-se menores e com uma exina diferente, que era mais fina que a dos grãos de pólen desenvolvidos no regime de temperatura de 30/20°C.

Aloni *et al.*, (2001) observaram que, em plantas submetidas a temperaturas diurnas e noturnas de 32°C e 26°C, respectivamente, a germinação do pólen *in vitro* foi muito reduzida. Resultados semelhantes foram obtidos por Kafizadeh *et al.*, (2008), que observaram uma redução drástica na germinação polínica em plantas cultivadas à temperatura de 38°C em comparação com as plantas crescidas a 25°C. Efeitos negativos, também, têm sido reportados em plantas de pimentão submetidas a baixas temperaturas. Polowick e Sawhney (1985) relataram que plantas submetidas a condições de baixas temperaturas (18°C de dia e 15°C à noite) produziram pólen inviáveis.

Para a espécie *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559), uma pimenta ornamental, os valores obtidos de temperatura mínima, ótima e máxima foram de 4,41°C, 22,83°C e 41,25°C, respectivamente. Pode-se perceber que a variação de temperatura suportada por esse genótipo ( $T_{\max} - T_{\min} = 36.84^{\circ}\text{C}$ ) foi maior que a observada em *C. annuum* var. *annuum* ( $T_{\max} - T_{\min} = 26.05^{\circ}\text{C}$ ), mostrando uma maior adaptabilidade a variações climáticas. Segundo Stummel e Bosland (2007), as pimentas ornamentais (*C. annuum*) além de serem tolerantes ao calor, à medida que crescem, passam a suportar baixas temperaturas.

Nos genótipos de *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), entre as temperaturas testadas, a maior percentagem de germinação ocorreu com 20°C (Tabela 7). Nas temperaturas de 15, 25, 30 35 e 40°C, a germinação diminuiu em ambos os genótipos. A temperatura ótima encontrada foi de 23,41°C para *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624) e 22,57°C para *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495); no entanto, pode-se perceber que os acessos possuem uma ampla variação de temperatura (36,82°C para *C. baccatum* var. *pendulum* e 40,71 para *C. baccatum* var. *baccatum*), na qual os grãos de pólen, ainda, podem germinar (Figura 4 e Tabela 8).

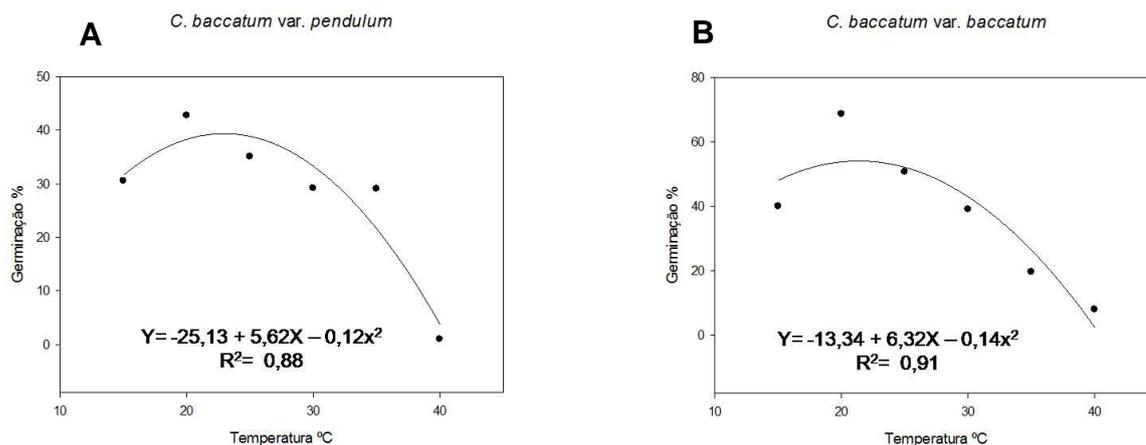


Figura 4. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen em resposta a variações de temperatura em *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624) (A) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) (B).

A espécie *C. baccatum* possui uma ampla distribuição geográfica na América do Sul, indo desde a costa leste à costa oeste da Colômbia no norte, ao Chile no sul, tendo se tornado a pimenta de escolha na Bolívia, Equador, Peru e Chile (Bosland e Votava, 2000).

Albrecht *et al.*, (2012), estudando a diversidade genética da coleção de germoplasma de *C. baccatum* da USDA, utilizando dados de distribuição geográfica, morfológicos e de DNA, observaram que os acessos de *C. baccatum* cobrem uma ampla área geográfica e são adaptados a condições ecológicas divergentes na América do Sul, que vão desde as áreas frias dos Andes até à floresta tropical Amazônica. Segundo os autores, existem acessos que são nativos de regiões com temperaturas médias anuais, variando de 5°C a 27°C, com uma média de 20°C para formas domesticadas e silvestres.

Em *C. frutescens* (UENF 1636), a porcentagem de germinação dos grãos de pólen aumentou conforme a elevação das temperaturas utilizadas, sendo o maior número de grãos de pólen germinados obtido na temperatura de 25°C (Tabela 7 e Figura 5). Com respeito às temperaturas cardinais, a temperatura ótima foi de 23,3°C (Tabela 8), e, dos acessos estudados, UENF 1636 foi o que apresentou a maior porcentagem de germinação na temperatura de 40°C, tendo sido obtida temperatura máxima de 43,17°C, o que mostra uma maior tolerância a temperaturas elevadas. Isso pode estar relacionado com sua distribuição geográfica, já que *Capsicum frutescens*, dentro do território brasileiro, é mais encontrada na região Norte, sendo também encontrada nas regiões Centro-Oeste

e Nordeste (Carvalho e Bianchetti, 2008). A cultivar Tabasco é a única representante dessa espécie, comumente cultivada fora dos trópicos (Heiser Jr., 1976).

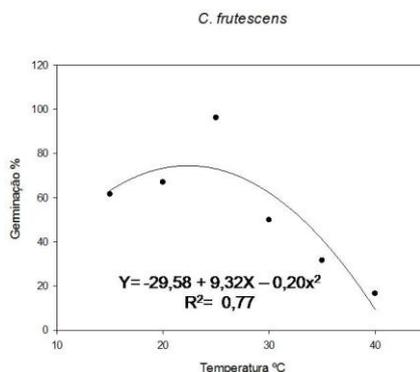


Figura 5. Porcentagem de germinação dos grãos de pólen de *C. frutescens* (UENF 1636) em resposta a variações de temperatura.

A semelhança do que foi observado por Reddy e Kakani (2007), a resposta da germinação *in vitro* apresentada pelos diferentes acessos de *Capsicum* foi semelhante, com temperaturas ótimas variando de 22,57 a 23,41, com exceção de *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda'), que apresentou temperatura ótima de 27,63°C. Essa resposta similar dos genótipos pode estar correlacionada à sua origem, já que, com exceção do acesso *C. frutescens* (UENF 1636), que é proveniente do Estado do Mato Grosso, todos os demais acessos, são provenientes do Estado do Rio de Janeiro.

Temperaturas elevadas, além de afetar a germinação do pólen, podem afetar o crescimento do tubo polínico, sendo esses os principais fatores apontados para a baixa frutificação em diferentes culturas com o aumento da temperatura (Wahid *et al.*, 2007; Zinn *et al.*, 2010; Hedhly *et al.*, 2008).

Pode-se perceber, pela figura 6, que mostra os grãos de pólen de *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') submetidos a diferentes temperaturas, que, na menor (15°C) e na maior (40°C) temperaturas testadas, o comprimento do tubo polínico foi muito reduzido em relação aos grãos de pólen crescidos nas demais temperaturas. Em *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559), o comprimento dos tubos polínicos foram maiores nas temperaturas de 25 e 30°C. A partir dessa temperatura, ocorreu uma diminuição visível no crescimento dos tubos polínicos, até que, em 40°C, nenhum tubo polínico foi observado.

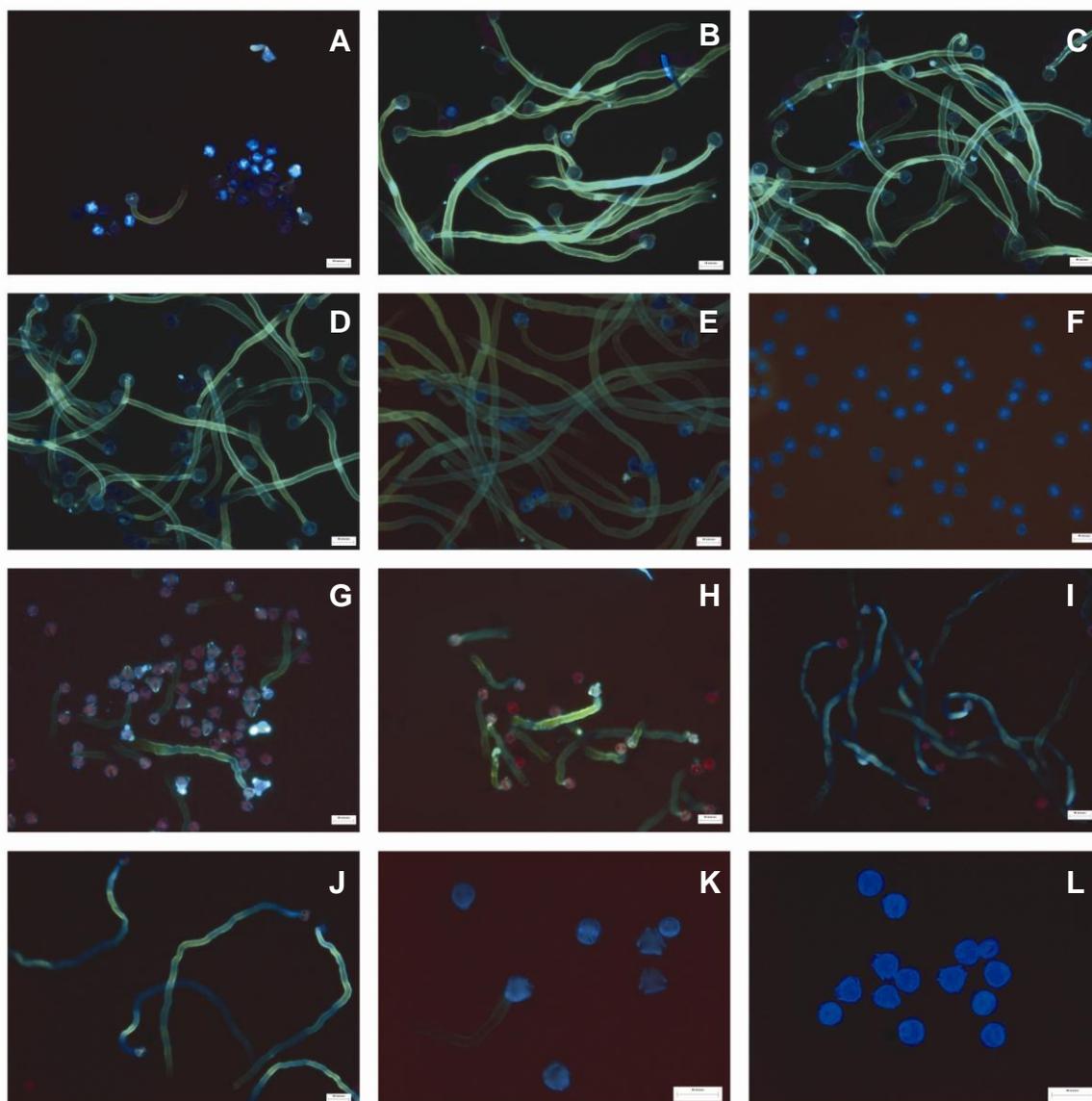


Figura 6. Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de *C. annuum* var. *annuum* ('Casca Dura Ikeda') (A-F) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559) (G-L). A) Grãos de pólen incubados a 15°C, B) Grãos de pólen incubados a 20°C, C) Grãos de pólen incubados a 25°C, D) Grãos de pólen incubados a 30°C, E) Grãos de pólen incubados a 35°C, F) Grãos de pólen incubados a 40°C, G) Grãos de pólen incubados a 15°C, H) Grãos de pólen incubados a 20°C, I) Grãos de pólen incubados a 25°C, J) Grãos de pólen incubados a 30°C, K) Grãos de pólen incubados a 35°C, L) Grãos de pólen incubados a 40°C. Barra = 40 microns.

Em *C. frutescens* (UENF 1636), assim como a germinação dos grãos de pólen, o alongamento dos tubos polínicos foi afetado pelas diferenças nas temperaturas, ocorrendo um aumento no crescimento até 25°C e uma diminuição em temperaturas mais elevadas (Figura 7).

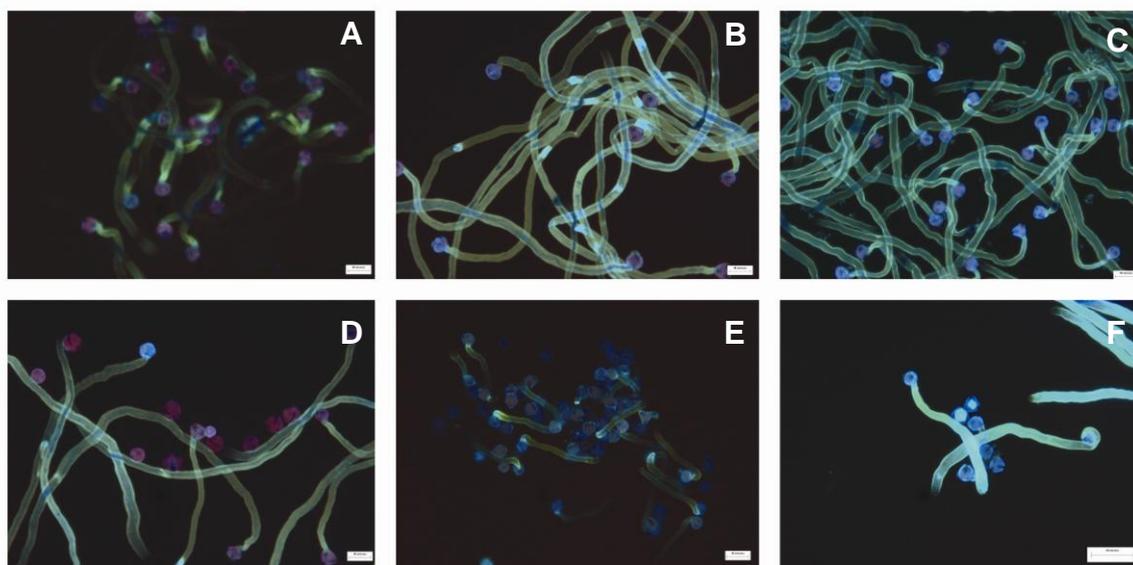


Figura 7: Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de *C. frutescens* (UENF 1636): A) Grãos de pólen incubados a 15°C, B) Grãos de pólen incubados a 20°C, C) Grãos de pólen incubados a 25°C, D) Grãos de pólen incubados a 30°C, E) Grãos de pólen incubados a 35°C, F) Grãos de pólen incubados a 40°C. Barra = 40 microns.

Já em ambos os acessos representantes das espécies de *C. baccharum*, tubos polínicos mais desenvolvidos foram observados nas temperaturas de 20 e 25°C. Nas demais temperaturas testadas, ocorreu uma grande diminuição no alongamento desses tubos (Figura 8).

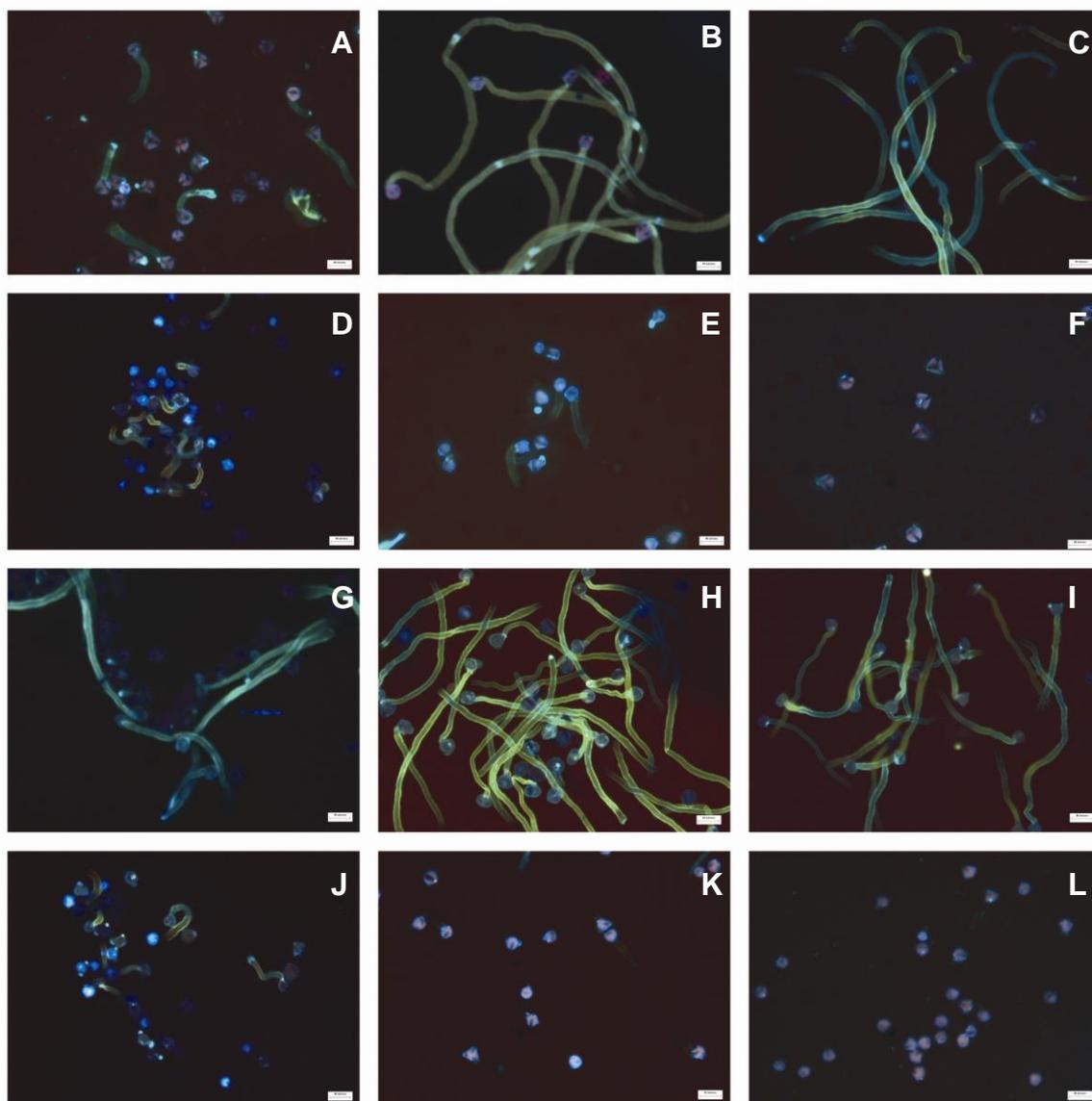


Figura 8: Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de grãos de pólen de *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624) (A-F) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) (G-L). A) Grãos de pólen incubados a 15°C, B) Grãos de pólen incubados a 20°C, C) Grãos de pólen incubados a 25°C, D) Grãos de pólen incubados a 30°C, E) Grãos de pólen incubados a 35°C, F) Grãos de pólen incubados a 40°C, G) Grãos de pólen incubados a 15°C, H) Grãos de pólen incubados a 20°C, I) Grãos de pólen incubados a 25°C, J) Grãos de pólen incubados a 30°C, K) Grãos de pólen incubados a 35°C, L) Grãos de pólen incubados a 40°C. Barra = 40 microns.

Observa-se que, em todas as espécies estudadas, as temperaturas que proporcionaram menores percentagens de germinação, também, promoveram um menor crescimento dos tubos polínicos. Trabalhos na literatura têm mostrado resultados semelhantes, pontuando a estreita relação entre germinação e crescimento do tubo polínico. Reddy e Kakani (2007) observaram valores médios de temperatura ótima semelhantes para ambos, germinação (30,7°C) e crescimento do tubo polínico (31,2°C). O mesmo foi, também, observado por Gajanayake *et al.*, 2011, trabalhando com pimentas ornamentais.

Kafizadeh *et al.*, (2008) estudando o efeito de temperaturas elevadas sobre o grãos de pólen de pimentas, observaram que temperatura de 38°C, além de diminuir a germinação, também reduziu o crescimento do tubo polínico e afetou sua estrutura. Segundo os autores, temperaturas acima de 34°C, durante a germinação do pólen, resultam em uma redução na percentagem de germinação e no crescimento do tubo polínico, sendo esse dano significativo quando os grãos de pólen são obtidos de flores que cresceram sob altas temperaturas.

### 3.3.5. CONCLUSÕES:

✓ O melhor meio de germinação foi o constituído por 10% de sacarose e 30 ppm de ácido bórico para ambas as espécies. O ácido bórico teve um papel fundamental na germinação, uma vez que, com o aumento gradativo na sua concentração, aumentou-se o número de grãos de pólen germinados em todos os genótipos.

✓ Baixas temperaturas não apresentam efeito negativo à germinação dos grãos de pólen de *Capsicum*. Em contrapartida, temperaturas acima de 40°C são limitantes para a germinação das espécies.

✓ Existiu uma relação entre a germinação e o crescimento do tubo polínico, ocorrendo um maior alongamento dos tubos nas temperaturas que proporcionaram maiores percentagens de germinação. Isso indica que a temperatura afeta tanto a germinação quanto o desempenho dos tubos polínicos em *Capsicum*.

✓ As temperaturas cardinais ( $T_{\min}$ ,  $T_{\text{otm}}$ ,  $T_{\max}$ ) obtidas foram de 14,58, 27,63 e 40,63°C para *C. annuum* var. *annuum*; 4,41, 22,83 e 41,25°C para *C. annuum* var. *glabriusculum*; 5,00, 23,41 e 41,82°C para *C. baccatum* var. *pendulum*; 2,21, 22,57 e 42,92°C para *C. baccatum* var. *baccatum* e; 3,42, 23,3, 43,17°C para *C. frutescens*, sendo *C. annuum* var. *annuum* a espécie mais sensível à variação de temperatura ( $T_{\max} - T_{\min} = 26,05^{\circ}\text{C}$ ) e *C. baccatum* var. *baccatum* a mais sensível ( $T_{\max} - T_{\min} = 40,71^{\circ}\text{C}$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, I.S., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2008) Chromosomal DNA content of sweet pepper determined by association of cytogenetic and cytometric tools. *Plant Cell Report*, 27:1227–1233.
- Acar, I., Kakani, V.G. (2010) The effects of temperature on *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia* spp. *Scientia Horticulturae*, 125:569–572.
- Adhikari, K.N., Campbell, C.G. (1998) *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. *Euphytica*, 102: 87–92.
- Albrecht, E., Zhang, D., Mays, A.D., Saftner, R.A., Stommel, J.R. (2012) Genetic diversity in *Capsicum baccatum* is significantly influenced by its ecogeographical distribution. *Genetics*, 13: 1-15.
- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted non aborted pollen. *Satain Techonology*, 44: 117-122.
- Almeida, F.C.G., Silva, J.F., Alves, J.F., Silva, F.P., Almeida, F.A.G. (1987) Estudo da germinação do pólen do algodão, *Gossypium hirsutum* L. *in vitro*: II, efeitos do ácido bórico e do sulfato de manganês. *Ciência Agrônômica*, 18: 117-123.

- Aloni, B., Peet, M.M., Pharr, M., Karni, L., 2001. The effect of high temperature and high atmospheric CO<sub>2</sub> on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiol Plant*, 112: 505–512.
- Andrews, J. (1995) *Peppers: the domesticated Capsicum*. University of Texas Press. 274 p.
- Apel, K. Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. (1991) Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 229-233.
- Askin, A., Hepaksoy, S., Ozcagiran, R. (1990) Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. *Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise*, 27:105-116.
- Ballard, R.E., McClure, J.W., Eshbaugh, W.H., Wilson, K.G. (1970) A chemosystematic study of selected taxa of *Capsicum*. *American Journal of Botany*, 57: 225-233.
- Bapa Rao, N., Sri Valli, T., Lakshmi, N. (1992) Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L, *C. frutescens* L. and its progeny. *Euphytica*, 59: 135-140.
- Baral, J.B., Bosland, P. W. (2004) Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): A multiple evidence approach using morphology, molecular analysis and sexual compatibility. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129: 826-832.
- Belletti, P., Marzachi, C., Lanteri, S. (1998) Flow cytometry measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 209:85–91.

- Bennett, M.D., Smith, J.B. (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B*, 274: 227-274.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*, 76: 113–176.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J. (2012) Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012). Disponível em: <http://www.kew.org/cvalues>.
- Bomblies, K., Weigel, D. (2007) Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nature Reviews Genetics*, 8: 382-393.
- Bosland, P.W. (1992) Chiles: A diverse Crop. *HortTechnology*, 2: 7-10.
- Bosland, P.W. (1996) *Capsicum*: innovative uses of ancient crop. In: Janick, J. (eds.) *Progress in New Crop*. Ashs Press, Arlington, Virginia, p. 479-487.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2000) *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p.
- Bosland, P.W., Baral, J.B. (2007) 'Bhut Jolokia'—the world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *Hortscience*, 42: 222–224.
- Brewbaker, J.L. (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*, 48:271-77.
- Brewbaker, J.L., Kwack, B.H. (1963) The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50: 859-865.
- Buitendijk, J.H., Boon, E., Ramanna, M.S. (1997) Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany*, 79: 343-353.

- Bures, P., Wang, Y., Horová, L., Suda, J. (2004) Genome size variation in central european species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids. *Annals of Botany*, 94: 353–363.
- Camolesi, M.R., Martins, A.N., Souza, L.D., Saconi, C.G. (2010) Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. *Ciência e Agrotecnologia*, 34: 1446-1451.
- Campos, K.P. (2006) *Obtenção, caracterização morfológica e reprodutiva de híbridos interespecíficos entre espécies domesticadas de Capsicum L.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Bustamante, P.G.; Silva, D.B. (2003) *Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (Capsicum spp.) da Embrapa Hortaliças*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 49 p.
- Carvalho, S.I.C., Ribeiro, C.S.C., Porto, I.S. (2005) Características agronômicas e industriais de pimentas *Capsicum* spp. do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças. Disponível em: <200.210.234.180/HORTA/Download/Biblioteca/46\_0218.pdf>. Acesso em 15/01/2014.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B. (2008) Botânica e Recursos Genéticos. *In*: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. (ed.) *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p 39-54.
- Casali, V.W.D. (1970). *Cruzamento interespecífico no gênero Capsicum*. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Viçosa - MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 58p.
- Casali, V.W.D., Couto, F.A.A. (1984) Origem e botânica de *Capsicum*. *Informe Agropecuário*, 10: 8-18.

- Charlo, H.C.O., Castoldi, R., Fernandes, C., Vargas, P.F., Braz, L.T. (2009) Cultivo de híbridos de pimentão amarelo em fibra da casca de coco. *Horticultura Brasileira*, 27:155-159.
- Cheng, Zhi-Fang, Quian, Chun-Tao, Chen, Xue-Jun, Chen, Jin-Feng (2007) Interspecific hybridization and identification of hybrid in *Capsicum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34: 883-888.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12: 444-451.
- Choong, C.Y. (1998) *DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in Capsicum*. Tese (Doutorado) - University of Reading.
- Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa, M., Silva, M., Leão, C. (2002). Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, 71:19-33.
- Costa, L.V., Lopes, R., Lopes, M.T.G., Figueiredo, A.F., Barros, W.S., Alves, S.R.M. (2009) Cross compatibility of domesticated hot pepper and cultivated sweet pepper. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 37-44.
- Craufurd, P.Q., Prasad, P.V.V., Kakani, V.G., Wheeler, T.R., Nigam, S.N. (2003) Heat tolerance in groundnut. *Field Crops Research*, 80: 63–77.
- Cresti, M., Blackmore S., Van Went J.L. (1992) *Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants*, Springer, Berlin, 249p.
- Cruz, C.D. (2006) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Disponível em: [www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm).
- Cruz, D.O., Campos, L.A.O. (2007) Biologia floral e polinização de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L. Solanaceae): um estudo de caso. *Acta*

*Scientiarum Biological Sciences*, 29: 375-379.

- Csilléry, G. (2013) Introducing a collection of generative organ pepper mutants. *In: Lanteri, S., Rotino, G.L. (eds.) Proceedings of the XV EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*, Torino, p. 215-222.
- Dafni, A. (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 250 p.
- Debbrema, C., Khanna, V.K., Tyagi, W., Rai, M., Meetei, N.T. (2013) Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Capsicum*. *Agrotechnology*, 11:003.
- DeWitt, D., Bosland, P.W. (1993) *The pepper garden-From the sweetest bell to the hottest habanero*. California: Ten Speed Press, Berkeley.
- Dolezel, J., Sgorbati S., Lucretti, S. (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum*, 85: 625-631.
- Dolezel, J., Dolezelova, M., Novak, F.J. (1994) Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36: 351-357.
- Dolezel, J. (1997a) Flow cytometry, its application and potencial for plant breeding. *In: Lelley, T. (ed.) Current topics in plant cytogenetics related to plant improvement*. Viena: WUV-Universitatsverlag, p. 80-90.
- Dolezel, J. (1997b) Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38: 285–302.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S. (1998) Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82: 17-26.

- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmays, H., Greilhuber, J. (2003) Letter to the editor. *Cytometry*, 51: 127-128.
- Dolezel, J., Bartos, J. (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99–110.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (eds.) *Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 41-65.
- Dolezel, J., Greilhuber, J. (2010) Nuclear genome size: are we getting closer? *Cytometry Part A*, 77: 635- 642.
- Dolnicar, P., Bohanec, B. (2000) Ploidy and morphological characteristics of *Solanum tuberosum* x *Solanum phureja* hybrids. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 439: 9-11.
- Eeckhaut, T., Leus, L., Huylenbroeck, J.V. (2005) Exploitation of flow cytometry for plant breeding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27: 743-750.
- Egawa, Y., Tanaka, M. (1984) Cytogenetical relationships among three species of chili peppers, *Capsicum chinense*, *C. frutescens* and *C. baccatum*. *Japanese Journal of Breeding*, 34: 50-56.
- Egawa, Y., Tanaka, M. (1986) Cytogenetical study of the interespecific hybrid between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*. *Japanese Journal of Breeding*. 36:16-21.
- Embrapa (2012) Hortaliças em número. Produção de hortaliças no Brasil. Disponível em: [http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas\\_em\\_numeros/producao\\_hortalicas\\_brasil\\_2000\\_2011.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/producao_hortalicas_brasil_2000_2011.pdf) Acesso em: 10/01/2014.

- Endo, M., Tsuchiya, T., Hamada, K., Kawamura, S., Yano, K., Ohshima, M., Higashitani, A., Watanabe, M., Kawagishi-Kobayashi, M. (2009) High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiology*, 50: 1911–1922.
- Erickson, A.N., Markhart, A.H. (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell and Environment*, 25: 123–130.
- Eshbaugh, W.H., Guttman, S.I., McLeod, M.J. (1983) The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species. *Journal of Ethnobiology*, 3: 49-54.
- Eshbaugh, W.H. (1993) Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J., J.E. Simon (eds.). *New Crops*. New York: Wiley and Sons, Inc., p. 132-139.
- FAPESP (2013) Agência de notícias da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/17944>. Acesso em: 15/10/2013.
- Filgueira, F.A.R. (2000) *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: Editora UFV, 402p.
- Franzon, R.C., Raseira, M.C.B. (2006) Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (MYRTACEAE). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28: 18-20.
- Gajanayake, B., Trader, B.W., Reddy, K.R., Harkess, R. (2011) Screening ornamental pepper cultivars for temperature tolerance using pollen and physiological parameters. *HortScience*, 46:878-884.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, J.M., Sharma, D.P., Firoozabady, E. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissue. *Science*, 220: 1049-1051.

- Galbraith, D.W., Lambert, G.M., Macas, J., Doležel, J. (1998) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *In*: Robinson, JP, Darzynkiewicz, Z, Dean, PN, Dressler, LG, Orfao, A, Rabinovitch, PS, Stewart, CC, Tanke, HJ, Wheelless, LL, (eds.). *Current protocols in cytometry*. New York: John Wiley & Sons, p. 7.6.1-7.6.2.
- Galbraith, D., Lambert, G., Macas, J., Doležal, J. (2002) Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *In*: Robinson, J., Azmi, A. e Tutois, S. (eds.). *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley & Sons, Inc. p.761-762.
- Galleta, G.J. (1983) Pollen and seed management. *In*: Moore J.N., Janick J. (eds.) *Methods in fruits breeding*. Purdue University Press, Indiana, p. 23-47.
- Gill, M.S.N., Malik, C.P. (1992) Pollen biotechnology storage and viability. *In*: Malik, C.P. (ed.). *Pollen Physiology and Biotechnology. Today and tomorrow's*. New Delhi, India: Printer and Publisher.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Rieu, I. (2013) Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2: 489-506.
- Grattapaglia, D., Bradshaw, H.D., Jr. (1994) Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Canadian Journal of Forest Research*, 24: 1074-1078.
- Greenleaf, W.H., Martins, J.A., Lease, J.G., Sims, E.T., VanBlaricom, L.O. (1970) Greenleaf Tabasco, a new tobacco etch virus resistant "Tabasco" pepper variety (*Capsicum frutescens* L.). Alabama Agricultural Experiment Station Alabama, Auburn Univ. Ala.
- Gudadhe, S.P., Dhoran, V.S. (2012) Observations on pollen viability, *in vitro* pollen germination and pollen tube growth in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.

and *Asparagus officinalis*, L. *International Journal of Current Research*, 4: 022-027.

Guilioni, L., Wery, J., Tardieu, F. (1997) Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? *Annals of Botany*, 80: 159–168.

Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*, 156: 1-13.

Harlan, J.R, De Wet J.M.J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20: 509-517.

Hatfield, J.L. (2013) Climate change: Challenges for future crop adjustments. *In*: Tuteja, N.; Gill, S.S. (eds.) *Climate change and plant abiotic stress tolerance*. Wiley Blackwell. 1208 p.

Hedhly, A., Hormaza, J.I., Herrero, M. (2008) Global warming and plant sexual reproduction. *Trends in Plant Science*, 14:30-36.

Heiser JR, C.B. (1976) Peppers, *Capsicum* (Solanaceae). *In*: N.W. Simmonds. (ed.). *The evolution of crop plants*. London: Longman Press, p. 256- 268.

Heslop-Harrison, J. (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Review of Cytology*, 107: 1-78.

Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. (2011) Organization of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal*, 66: 18–33.

Hirsch, A. M., Testolin, R., Brown, S., Chat, J., Fortune, F.D., Bureau, J.M., De Nay, D. (2001) Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia* (kiwifruit). *Plant Cell Reports*, 20: 508-516.

- Horner, H.T., Palmer, R.G. (1995) Mechanisms of genetic male sterility. *Crop Science*, 35: 1527-1535.
- Howarth, C.J. (2005) Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: Ashraf, M., Harris, P.J.C., (eds.) *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. New York: Haworth Press Inc., p. 277–300.
- Hrabetova, E., Tupy J. (1964) The effect of  $\beta$ -D-fructofuranose in the molecules of sucrose and raffinose in relation to their specific action on growth and respiration of apple tree. Pollen tubes: *Biology Plant*, 5: 216-220.
- IPCC (2013) Climate change 2013: the physical science basis. Summary for policymakers. Disponível em: [http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI\\_AR5\\_SPM\\_brochure.pdf](http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI_AR5_SPM_brochure.pdf). Acesso em 15/12/2013.
- IPGRI (1995) *Descriptors for Capsicum (Capsicum spp)*. Roma: IPGRI, 51p.
- Jansky, S. (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125: 1-12.
- Jarret, R.L., Dang, P. (2004) Revisiting the waxy locus and the *Capsicum annum* L. complex. *Georgia Journal of Science*, 62: 117-133.
- Jensen, R.J., McLeod, M.J., Eshbaugh, W.H., Guttman, S.I. (1979) Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxon*, 28: 315-327.
- Johnston, J.S., Bennett, M.D., Rayburn, A.L., Galbraith, D.W., Prince, H.J. (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86: 609–613.

- Johri, B.M., Vasil, I.K. (1961) Physiology of pollen. *Botany Review*, 27: 326-368.
- Kafizadeh, N., Carapetian, J., Kalantari, K.M. (2008) Effects of heat on pollen viability and pollen tube growth in pepper. *Research Journal of Biological Sciences*, 3: 1159-1162.
- Karakaya, D. (2011) Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Journal of Science and Technology*, 1: 43-47.
- Karni, L., Aloni, B. (2002) Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): Possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO<sub>2</sub> enrichment. *Annals of Botany*, 90: 607-612.
- Kato, J., Mii, J.K. (2012) Production of interspecific hybrids in ornamental plants. *Methods in Molecular Biology*, 877: 233-245.
- Kearns, C.A., Inoué, D. (1993) *Techniques for pollinations biologists*. Niwot: University Press of Colorado.
- Keller, E.R.J., Schubert, I., Fuchs, J., Meister, A. (1996) Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 92:417-424.
- Khan, S.A., Perveen, A. (2006) Germination capacity of stored pollen of *abelmoschus esculentus* L. (Malvaceae) and their maintenance. *Pakistan Journal of Botany*, 38: 233-236.
- Kim, H.Y., Horie, T., Nakagawa, H., Wada, K (1996) Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration and high temperature on growth and yield of rice. II. The effect of yield and its component of Akihikari rice. *Japanese Journal of Crop Science*, 65: 644-651.

- Kinet, J.M., Peet, M.M. (1997) Tomato. In: H.C. Wien (ed.). *The physiology of vegetable crops*. Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International. p. 207–258.
- King, J.R. (1961) The freeze drying of pollen. *Economic Botany*, 15: 91-98.
- Koti, S., Reddy, K.R., Reddy, V.R., Kakani, V.G., Zhao, D. (2005) Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany*, 56: 725–736.
- Krichevsky, A., Kozlovsky, S.V., Tian, Guo-Wei, Chen, Min-Huei, Zaltsman, A., Citovsky, V. (2007) How pollen tubes grow. *Developmental Biology*, 303: 405–420.
- Kumar, O.A., Panda, R.C., Rao, K.G.R. (1987) Cytogenetic studies of the F<sub>1</sub> hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. *Theoretical and Applied Genetic*, 74: 242-246.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J.A., Gaur, P., Nayyar, H. (2013) Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59: 823-843.
- Lanteri, S., Pickersgill, B. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. e *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica*, 67: 155-160.
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, 513 p.
- Lobell, D.B., Asner, G.P. (2003) Climate and management contributions to recent trends in US agricultural yields. *Science*, 299: 1032.
- Lopes, C.A. (2008) Ardume, picância e pungência. In: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A.,

Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa hortaliças, p 25-30.

Loureiro, J.C.M., Santos, C. (2004) Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. *Boletim de Biotecnologia*, 77: 18-29.

Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C., Dolezel, J., Suda, J. (2008) FLOWer: A plant DNA flow cytometry database (release 1.0, May 2008). Disponível em: <http://flower.web.ua.pt/>.

Lysak, M.A., Dolezel, J. (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*, 51: 123-132.

Mahelka, V., Suda, J., Jarolímová, V., Trávníček, P., Krahulec, F. (2005) Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. *Folia geobotanica*, 40: 367-384.

Marie, D., Brown, S.C. (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the cell*, 79: 41-51.

Manara, N.T.F. (1974) Viabilidade dos grãos de pólen em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Centro Ciências Rurais*, 4: 309-316.

Martins K.C, Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Costa, F.R. (2010). Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural*, 40: 1746-1751.

Mascarenhas, J.P. (1992) Pollen gene expression: Molecular evidence. *International Review of Cytology*, 140: 3-18.

Mateos, R.M., Jiménez,A., Román, P., Romojaro, F., Bacarizo, S., Leterrier, M., Gómez, M., Sevilla, F., Río, L.A., Corpas, F.J., Palma, J.M. (2013) Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): involvement in the response to

temperature changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 9556-9580.

Matsui, T., Omasa, K. (2002) Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars tolerant to high temperature at flowering: anther characteristics. *Annals of Botany*, 89: 683–687.

McCormick, S. (1993) Male gametophyte development. *The plant cell*, 5: 1265-1275.

McCormack, J. (2005) Pepper seed production. An organic seed production manual for seed growers in the Mid-Atlantic and South. Versão 1.2. Disponível em: [http://www.gardenmedicinals.com/pdf/pepper\\_sample\\_page.pdf](http://www.gardenmedicinals.com/pdf/pepper_sample_page.pdf)

McLeod, M.J., Eshbaugh, W.H., Guttman, S.I. (1979) A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum*-Solanaceae. In: J.G. Hawkes, R.N. Lester, A.D. Skelding (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London, p. 701-714.

McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H. (1982) Early evolution of chille peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36: 361-368.

McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H., Rayle, R.E. (1983) An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution*, 37:562-574.

Melo, D.M., Charlo, H.C.O., Botelho, A.P., Castoldi, R., Braz, L.T. Cruzamentos interespecíficos entre *Capsicum chinense* e *C. frutescens* (2010). *Horticultura Brasileira*, 28: 2598-2603.

Mercado, J.A., Fernández-Mufioz, R., Quesada, M.A. (1994) In vitro germination of pepper pollen in liquid medium. *Scientia Horticulturae*, 57: 273-281.

Mercado, J.A., Martrigo, M., Reid, M.S., Valpuesta, V., Quesada, M.A. (1997)

Effect of low temperature on pepper pollen morphology and fertility: evidence of cold-induced exine alteration. *Journal of Horticultural Sciences*, 72: 317-326.

Miranda, P.A., Clement, C.R. (1990) Germination and storage of pejobaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. *Revista de Biologia Tropical*, 38: 29-33.

Mondal, S., Ghanta, R. (2012) Effect of sucrose and boric acid on *in vitro* pollen germination of *Solanum Macranthum* Dunal. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 2: 202-206.

Monteiro, C.E.S., Pereira, T.N.P., Campos, K.P. (2011) Reproductive characterization of interspecific hybrids among *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 241-249.

Moore, P.D., Webb, J.A. (1978) *An illustrated guide to pollen analysis*. 1. ed., New York: A Halsted Press Book, 133p.

Moscone, E.A. (1990) Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype analysis in *C. chacoense*. *Brittonia*, 42: 147-154.

Moscone, E.A., Loidl, J., Ehrendorfer, F., Hunziker, A.T. (1995) Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany*, 82:276–287.

Moscone, E.A., Lambrou, M., Ehrendorfer, F. (1996). Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 202: 37-63.

Moscone, E.A., Barany, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F., Hunziker, A. (2003) Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92: 21-29.

Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabielle, 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. *Acta Horticulturae*, 745: 137-169.
- Motley, J., Yokoya, K., Roberts, A.V. (2000) “D-Flowering” – The flow cytometry of plant DNA. In: Diamond, R.A., DeMaggio, S. (eds.). *Living Colo-Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer. Lab Manual. p. 391-420.
- Mukherjee, S., Sharma, A.K. (1990) Intraspecific variation of nuclear DNA in *Capsicum annuum* L. *Plant Science*, 100: 1-6.
- Nascimento, M.F., Rêgo, E.R., Rego, M.M., Nascimento, N.F.F., Araújo, E.R. (2011) Vigor e germinação de sementes híbridas de pimenteiras ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 17: 51-56.
- Nascimento, N.F., Rêgo, E.R., Rego, M.M., Nascimento, M.F., Alves, L.I. (2012) Compatibilidade em cruzamentos intra e interespecíficos em pimenteiras ornamentais. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 18: 57-61.
- Nascimento, W.M., Dias, D.C.F.S., Freitas, R.A.F. (2006) Produção de sementes de pimentas. *Informe agropecuário*, 27: 30-39.
- Nass L.L., Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C. (2001) Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p.
- Nwankiti, O.C. (1976) Cytogenetics of some Nigerian peppers – genus *Capsicum*. II. Hybrid origin of *C. frutescens*. *Nigerian Journal of Science*, 10: 61-75.
- Ochatt, S., Patat-Ochatt, E., Moessner, E. (2011) Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 329-341.
- Ofosu-Anim, J., Offei, S.K., Yamaki, S., (2006) Pistil receptivity, pollen tube growth and gene expression during early fruit development in sweet pepper *Capsicum*

*annuum*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8: 576-579.

- Oliveira, M.S.P., Maués, M.M., Kalume, M. A. (2001) Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de Açaizeiro. *Acta Botânica Brasílica*, 15: 27-33.
- Olszewska, D., Jedrzejczyk, I., Nowaczyk, P. (2011) Biomterical assessment of interespecific hybrids of *Capsicum* genus. *Vegetable Crop Research Bulletin*, 75: 21-30
- Onus, A.N., Pickersgill, B. (2004) Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution. *Annals of Botany*, 94: 289-295.
- Pacini, E. (1996) Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 362–366.
- Pagamas, P., Nawata, E. (2008) Sensitive stages of fruit and seed development of chili pepper (*Capsicum annuum* L. var. Shishito) exposed to high-temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 117: 21–25
- Pagliarini, M.S., Pozzobon, M.T. (2004) *II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.
- Panda, R.C., Kumar, O.A., Raja Rao, K.G. (2004) Cytogenetic studies of some F<sub>1</sub> hybrids between wild and cultivated taxa of *Capsicum* L. *Cytologia*, 69: 203-208.
- Paran, I., Aftergoot, E., Shifriss, C. (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99:167-173.
- Pasqual M., Pio L.A.S., Oliveira, A.C.L., Soares, J.D.R. (2012) Flow cytometry applied in tissue culture. In: Leva A. (ed.) *Recent advances in plant in vitro culture*. InTech, p. 109–122.

- Peet, M.M., Sato, S., Gardner, R.G. (1998) Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant Cell & Environment*, 21: 225–231.
- Peng, S. (2004) Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 9971-9975.
- Pickersgill, B. (1971) Relationship between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 25: 683-691.
- Pickersgill, B., Heiser, C.B., McNeill, J. (1979) Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic, London. p. 679-700.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B*, Amsterdam: Elsevier. p.139-160.
- Pickersgill, B. (1992) Barriers to interspecific gene exchange in *Capsicum* . 8<sup>th</sup> Meeting of Genetics and Breeding on *Capsicum* and *Eggplant* . Rome, Italy. p. 57-60
- Pickersgill, B., (1993) Interspecific hybridization by sexual means. In: Bosemark, M.D, Romagosa, N.O. (eds.) *Plant Breeding Series; Plant Breeding: Principles And Prospects*, p. 63-78.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96: 29-133.
- Polowick, P.L., Sawhney, V.K. (1985) Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae*, 25: 117-127.
- Gaur, P.M., Jukanti, A.K., Samineni, S., Chaturvedi, S.K., Basu, P.S., Babbar, A.,

- Jayalakshmi, V., Nayyar, H., Devasirvatham, V., Mallikajuna, N., Krishnamurthy, L., Gowda, C.L.L. (2013) Climate change and heat stress tolerance in Chickpea. *In: Tuteja, N.; Gill, S.S. (eds.) Climate change and plant abiotic stress tolerance*. Wiley Blackwell. p. 837-856.
- Porter, J.R. (2005) Rising temperatures are likely to reduce crop yields. *Nature*, 436: 174.
- Portugal, J., Waring, M. J. (1988) Assignment of DNA-binding sites for 4',6-Diamidine-2-Phenylindole and Bisbenzimidazole (Hoechst-33258) - a comparative footprinting study. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 949: 158-168.
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T., Bianchetti, L.B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x = 12$  and  $x = 13$  represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 259-269.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen, L.H. (2006) Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139: 237-251.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen Jr., L.H. (2011) Longevity and temperature response of pollen as affected by elevated growth temperature and carbon dioxide in peanut and grain sorghum. *Environmental and Experimental Botany*, 70:51-57.
- Pressman, E., Moshkovitch, H., Rosenfeld, K., Shaked, R., Gamliel, B., Aloni, B. (1998) Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit set. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73: 131-136.

- Pressman, E., Shaked, R., Firon, N. (2006) Exposing pepper plants to high day temperatures prevents the adverse low night temperature symptoms. *Physiologia Plantarum* 126: 618-626.
- Prestes, A.M., Goulart, L. R. (1995). Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 3: 315-363.
- Prince, J.P., Lackney, V.K., Angeles, C., Blauth, J.R., Kyle, M.M. (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, 38: 224-231.
- Prince, H.J., Johnston, J.S. (1996) Analysis of plant DNA content by feulgen microspectrophotometry and flow cytometry. In: Jauhar, P.P. (ed.). *Methods of genome analysis in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 115-131.
- Rayburn, A.L., Biradar, D.P., Bullock, D.G., Mcmurphy, L.M. (1993) Nuclear DNA content in F1 hybrids of maize. *Heredity*, 70: 294-300.
- Reddy, K.R., Kakani, V.G. (2007) Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by *in vitro* pollen germination and pollen tube length. *Scientia horticultrae*, 112:130-135.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília. 113p.
- Ribeiro, C.S.C., Melo, R.A.C. (2005) Hibridação interespecífica entre *Capsicum annuum* e *Capsicum chinense* visando resistência à *Phytophthora capsici*. In: 45º Congresso Brasileiro de Olericultura, *Revista Horticultra Brasileira*, Brasília, p. 368- 368.
- Robinson, J.P., Grégori, G. (2007) Principles of flow cytometry. In: Dolezel, J.; Greilhuber, J.; Suda, J. (eds.) *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. John Wiley & Sons. 479 p.

- Rodrangboon, P., Pongtongkan, P., Suputtitaba, S., Adachi, T. (2002). Abnormal embryo development and efficient embryo rescue in interespecific hybrids. *Breeding Science*, 52: 123-129.
- Rodrigues, L.R., De Oliveira, J.M.S., Mariath, J.E.A. (2004) Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences*, 2: 159-167.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. (2000) A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12: 241-244.
- Rufino, J.L.S., Penteado, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe agropecuário*, 27: 7-15.
- Russo, V.M. (2012) *Peppers: botany, production and uses*. CABI. 280 p.
- Sabharwal, P.S., Dolezel, J. (1993) Interspecific hybridization in *Brassica*: Application of flow cytometry for analysis of ploidy and genome composition in hybrid plants. *Biologia Plantarum*, 35: 169-177.
- Saini, H.S., Sedgley, M., Aspinall, D. (1983) Effect of heat-stress during floral development on pollen-tube growth and ovary anatomy in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*, 10: 137–144.
- Saini, H.S., Sedgley, M., Aspinall, D. (1984) Developmental anatomy in wheat of male sterility induced by heat stress, water deficit or abscisic acid. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 243–253.
- Sakata T, Takahashi H, Nishiyama I, Higashitani A. (2000) Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. *Journal of Plant Research*, 113: 395–402.
- Sakata, T., Higashitani, A. (2008) Male sterility accompanied with abnormal anther

development in plants-genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2: 42-51.

Salem, M.A., Kakani, V.G., Koti, S., Reddy, R. (2007) Pollen-Based Screening of Soybean Genotypes for High Temperatures. *Crop Science*, 47: 219–231.

Santos, E.K., Zanettini, M.H.B. (2002) Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, 32: 165-173.

Sato, S., Peet, M.M., Thomas, J.F. (2000) Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environment*, 23: 719-726.

Sato, S., Peet, M.M., Thomas, J.F. (2002) Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1187-1195.

Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., Ikeda, H. (2006) Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, 97: 731–738.

Schifino-Wittmann, M. (2001) Determinação da quantidade de DNA nuclear em plantas. *Ciência Rural*, 31: 897-902.

Schoffl, F., Prandl, R., Reindl, A. (1999) Molecular responses to heat stress. In: Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Austin, Texas: Landes Co. p. 81-98.

Shaked, R., Rosenfeld, K., Pressman, E. (2004) The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of

pepper in relation to their number and functioning. *Scientia Horticulturae*, 102: 29–36.

Shivanna, K.R., Johri, B.M. (1989) *The angiosperm pollen, structure and function*. John Wiley and Sons.

Shivanna, K.R., Linskens, H.F., Cresti, M. (1991) Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 38–42.

Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. (1992) *Pollen biology. A laboratory manual*. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 210p.

Singh, R.J. (2002) *Plant Cytogenetics*. CRC Press. 2<sup>a</sup> ed. 463p.

Sisko, M., Ivancic, A., Bohanec, B. (2003) Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo rescue technique. *Plant Science*, 165: 663-669.

Smith, P.G., Heiser, C.B. (1951) Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany*. 38: 362-368.

Smith, P.G., Heiser, C.B. (1957) Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 84: 413-420.

Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Khodambashi, M., Wolukau, J.N., Ercisli, S. (2011) Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of almond (*Prunus dulcis* Mill.) to temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 749–757.

Srinivasan, A., Saxena, N.P., Johansen, C. (1999) Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Research*, 60: 209-222.

- Stanley, R.G. (1971) Pollen chemistry and tube growth. In: Heslop-Harrison, J. (ed.), *Pollen: Development and Physiology*. London: Butterworths, p. 131-155.
- Stanley, R.G., Linskens, H.F. (1974) *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. New York: Springer-Verlag.
- Stummel, J.R., Bosland, P. (2007) Ornamental pepper *Capsicum annuum*. In: Anderson, N.O. (ed.). *Flower breeding and genetics: Issues, challenges, and opportunities for the 21<sup>st</sup> century*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. P. 561-599.
- Subramanya, R. (1982) Relationship between tolerance and resistance pepper mottle virus in a cross between *Capsicum annuum* L. x *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica*, 31: 461-464.
- Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Vithanage, V., Smith, M.K., Doogan, V.J., Hetherington, S.E. (2000) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75:64-68.
- Szczerbakowa, A., Maciejewska, U., Zimnoch-Guzowska, E., Wielgat, B. (2003) Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Reports*, 21: 577-584.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Tanksley, S.D., Iglesias-Olivas, J. (1984). Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinense* in to *Capsicum annuum*. *Euphytica*, 33: 769-777.
- Techio, V.H., Davide, L.C., Pedrozo, C.A., Pereira, A.V. (2006) Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 28: 7-12.

- Teixeira, R. (1996) *Diversidade em Capsicum: análise molecular, morfoagronômica e química*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 81p.
- Tiersch, T.R., Chandler, R.W., Wachtel, S.S.M, Ellias S. (1989) Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content. *Cytometry*, 10: 706-710.
- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109: 71-77.
- Trabelsi, S., Gargouri-Bouزيد, R., Vedel, F., Nato, A., Lakhoua, L., Drira, N. (2005) Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 83: 1-11.
- Tupy, J. (1960) Sugar absorption, callose formation and the growth rate of pollen tubes. *Biology Plant*, 2:169-180.
- Usman, I.S., Mamat, A.S., Mohd, H.S.Z., Aishah, H.S., Anuar, A.R. (1999) The non-impairment of pollination and fertilization in the abscission of chilli (*Capsicum annum* L. Var. Kulai) flowers under high temperature and humid conditions. *Scientia Horticulturae*, 79: 1-11.
- Van Dyke, M.W., Dervan, P.B. (1983) Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding-sites on heterogeneous Deoxyribonucleic-acid - footprinting with (Methidiumpropyl- Edta). *Biochemistry*, 22: 2373-2377.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., GARCIA, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental Experimental Botany*, 61:199-223.

- Walsh, B.M., Hoot, S.B. (2001) Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *International Journal of Plant Sciences*, 162: 1409-1418.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Altman, A. (2003 a) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.
- Wang, Q., Lu, L., Wu, X., Li, Y., Lin, J. (2003 b) Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiology*, 23: 345-351.
- Whittle, C.A., Otto, S.P., Johnston, M.O., Krochko, J.E. (2009) Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. *Botany-Botanique*, 87: 650–657.
- Wien, H.C. (1997) Peppers. In: Wien, H.C. (ed.). *The physiology of vegetable crops*. CAB International, Wallingford, p. 259–293.
- Yazawa, S., Suetome, N., Okamoto, K., Namiki, T. J. (1989). Content of capsaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with “CH-19 sweet” as a parent *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 58: 601-607.
- Yoon, J.B., Park, H.G. (2005) Trispecies bridge crosses, (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) x *C. baccatum*, as an alternative for introgression of anthracnose resistance from *C. baccatum* into *C. annuum*. *Journal Koreana Society for Horticultural Science*, 46: 5-9.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Wahhng, J.D., Park, H.G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *C. annuum* L and *C. baccatum* L for introgression of Anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56: 31-38.

- Yoon, J.B., Do, J.W., Kim, S.H. Park, H.G. (2009) Inheritance of anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) resistance in *Capsicum* using interespecific hybridization. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 27: 140-144.
- Young, L.W., Wilen, R.W., Bonham-Smith, P.C. (2004) High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *Journal of Experimental Botany* 55: 485-495.
- Zewdie, Y., Bosland, P.W. (2000) Capsaicinoid inheritance in an interspecific hybridization of *Capsicum annuum* x *C. chinense*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125:448–453.
- Zijlstra, S., Purimahua, C., Lindhout, P. (1991) Pollen tube growth in interespecific crosses between *Capsicum* species. *HortScience*, 26: 585-586.
- Zinn, K.E., Tunc-Ozdemir, M., Harper, J.F. (2010) Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1959-1968.