

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E  
REPRODUTIVA DE HÍBRIDOS ENTRE ESPÉCIES DE *Capsicum*.

**KARINA PEREIRA DE CAMPOS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO-UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
SETEMBRO - 2006

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E  
REPRODUTIVA DE HÍBRIDOS ENTRE ESPÉCIES DE *Capsicum*.

**KARINA PEREIRA DE CAMPOS**

“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 Doutor em Produção Vegetal”.

Orientadora: Prof. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES

RIO DE JANEIRO-BRASIL

2006

OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, MORFOLÓGICA E  
REPRODUTIVA DE HÍBRIDOS ENTRE ESPÉCIES DE *Capsicum*.

**KARINA PEREIRA DE CAMPOS**

“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 Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 26 de setembro de 2006

Comissão Examinadora:

---

Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues (DSc., Produção Vegetal) – UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Margarete Magalhães de Souza (D.Sc., Produção Vegetal) – UESC

---

Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF  
... Orientadora

## **A DEUS**

"Bem conheço os desígnios que mantenho para convosco - Oráculo do Senhor - desígnios de prosperidade e não de calamidade, de vos garantir um futuro e uma esperança. Invocar-me-eis e vireis, suplicar-me-eis, e eu vos atenderei. Procurar-me-eis e me haveis de encontrar, porque de todo o coração me fostes buscar". Jeremias 29, 11-13

## **AOS MEUS PAIS JOSÉ ROBERTO E TEREZINHA ( *in memoriam* )**

Meu presente mais generoso. Uma dádiva de amor  
que recebi de Deus.

Com gratidão

**DEDICO**

## **A ANTONIO CARLOS**

Pela presença constante e apoio incondicional.

Com carinho

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas em minha vida.

Aos meus pais, pelas lições de altruísmo, humildade, fé e amor.

A minha família, fonte de apoio e afeto.

A Antonio Carlos, pelo companheirismo, respeito e paciência.

A D. Maria da Glória e Sr. Almerito por todas as orações e carinho dedicados a mim.

A D. Odinéia e Nikki, pelo afeto e amparo que sempre me concederam.

A Faperj, pela concessão da bolsa de estudos.

A UENF, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

A professora Telma e professor Messias, pela orientação, incentivo e disponibilidade durante a realização desse trabalho.

Aos estagiários Carlos e Tatiana, pelo convívio saudável, auxílio e alegria que sempre fizeram parte do nosso trabalho .

Aos Técnicos, Carlos, Jader e José Manoel pela amizade e valiosa ajuda na concretização dessa pesquisa.

A amiga Vitória (Vivi), pelos exemplos de generosidade e dedicação.

As minhas amigas Elizabete (Bete San) e Raquel por festejarem comigo os momentos de alegria, pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao casal Albanise e Zé, pela amizade, convívio agradável e apoio irrestrito.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética, pela consideração, respeito e pelos agradáveis momentos de alegria e convivência.

A todos os funcionários da Produção Vegetal, LMGV, LFIT e Biblioteca pela oportunidade de convivência e preciosa ajuda que sempre me concederam.

Ao Professor Rogério Daher, pela amizade e preciosa contribuição nas análises estatísticas.

Aos professores Henrique e Roberto, pela amizade e constante cooperação prestada.

Aos colegas do LMGV, LFIT, Fisiologia e Recursos Genéticos, pela oportunidade de convívio e amizade.

A Gilson, pela disponibilidade e auxílio fotográfico.

A professora Margarete e professora Rosana, pela participação na Banca de Defesa de Tese.

A todos os funcionários da PESAGRO e UAP/UENF, pelo respeito e consideração com que sempre me trataram.

A todos que de alguma forma participaram deste trabalho, ajudando e apoiando, o meu muito obrigada, e que Deus conceda a cada um, o dobro do bem que a mim fizeram.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	04
2.1 Aspectos Agronômicos .....	04
2.2 Centro de Origem e Espécies Cultivadas.....	06
2.3 Melhoramento Genético .....	08
2.4 Citogenética de <i>Capsicum</i> .....	12
2.5 Hibridação Interespecífica.....	13
2.6 Viabilidade Polínica.....	15
2.7 Crescimento do Tubo Polínico.....	18
2.8 Marcadores Moleculares.....	19
3. TRABALHOS.....	25
3.1 IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM <i>Capsicum</i> ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD.....	26
3.1.1 RESUMO .....	26
3.1.2 ABSTRACT .....	27
3.1.3 INTRODUÇÃO .....	28
3.1.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1.4.1 Material Genético Vegetal.....	30
3.1.4.2 Extração de DNA e Obtenção de Marcadores RAPD.....	31
3.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1.6 CONCLUSÕES.....	39
3.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM <i>Capsicum</i> .....	43
3.2.1 RESUMO.....	43
3.2.2 ABSTRACT .....	44
3.2.3 INTRODUÇÃO .....	45
3.2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.2.4.1 Material Genético Vegetal.....	48
3.2.4.2 Obtenção de híbridos Interespecíficos.....	49
3.2.4.3 Caracterização Morfoagronômica dos Híbridos Interespecíficos.....	50
3.2.5 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	52
3.2.6 CONCLUSÕES.....	68
3.2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
3.3 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Capsicum</i> COM BASE NA VIABILIDADE POLÍNICA.....	73
3.3.1 RESUMO.....	73
3.3.2 ABSTRACT.....	75
3.3.3 INTRODUÇÃO .....	76
3.3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3.3.4.1 Material Genético Vegetal.....	78
3.3.4.2 Metodologia.....	78
3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
3.3.6 CONCLUSÕES.....	90
3.3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
3.4 GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN <i>IN VIVO</i> E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE <i>Capsicum</i> .....	94
3.4.1 RESUMO.....	94
3.4.2 ABSTRACT.....	95
3.4.3 INTRODUÇÃO .....	96
3.4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
3.4.4.1 Material Genético Vegetal.....	98
3.4.4.2 Procedimentos Laboratoriais.....	99



3.4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	100
3.4.6 CONCLUSÕES.....	105
4.RESUMO E CONCLUSÕES.....	109
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
6. APÊNDICE.....	128

## RESUMO

Campos, Karina Pereira de, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Setembro de 2006, Obtenção, caracterização molecular, morfológica e reprodutiva de híbridos entre espécies de *Capsicum* L. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira. Conselheiro: Messias Gonzaga Pereira.

A presente pesquisa teve como objetivos obter híbridos interespecíficos entre as cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, validar a natureza híbrida das combinações obtidas através de marcadores de DNA RAPD, caracterizar morfológicamente e reprodutivamente os híbridos e analisar a razão do insucesso em algumas combinações híbridas. Foram utilizados trinta e seis acessos representantes das cinco espécies cultivadas de *Capsicum* conservadas na coleção de germoplasma da UENF. Cruzamentos recíprocos foram realizados em casa de vegetação e resultaram em cinquenta combinações híbridas. Dessas, quarenta e três confirmaram sua natureza híbrida via análise RAPD. Os resultados demonstraram que algumas combinações entre acessos das diferentes espécies não foram viáveis devido, provavelmente, à existência de barreiras genéticas e que combinações entre *C. pubescens* e demais espécies não foram efetivas, contudo foram obtidos híbridos entre as espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum*, sendo que os cruzamentos entre *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. chinense* x *C. annuum* e *C. chinense* x *C. frutescens* apresentaram resultados consistentes e promissores. No presente estudo constatou-se também que a viabilidade polínica mais baixa (8%) foi observada na combinação híbrida *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum*,

sugerindo que embora esse cruzamento seja possível, o híbrido resultante apresenta baixa fertilidade, afetando, significativamente, o número de frutos provenientes dessa combinação. A combinação híbrida *C. chinense* x *C. annuum* var *annuum* apresentou viabilidade polínica elevada (98,8%), confirmando que as espécies pertencem ao mesmo complexo gênico, o que facilita o cruzamento e influencia na fertilidade do híbrido. As combinações híbridas não efetivas e as autofecundações (controle) foram analisadas quanto à germinação e crescimento do tubo polínico via coloração com anilina, onde observou-se a germinação dos grãos de pólen no estigma e presença de tubos polínicos no estilo e ovário. Os resultados sugerem que a existência de barreiras de pós-fertilização sejam, provavelmente, responsáveis pelo insucesso na formação de sementes híbridas dessas combinações.

## ABSTRACT

Campos, Karina Pereira de, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, September 2006, Hybrids of *Capsicum* L. species characterized in molecular, morphological and reproduction aspects Advisor: Telma Nair Santana Pereira. Committee member: Messias Gonzaga Pereira.

This study had the objectives of establishing interspecific hybrids of five cultivated *Capsicum* species, validate the hybrid nature of the combinations through RAPD markers, characterize the hybrid morphology and reproduction or mating and analyze the reason for the failure of some hybrid combinations in germination and growth tests of the pollen tube in vivo. For this purpose, 36 representative accessions of the five cultivated *Capsicum* species conserved in the germplasm collection of the UENF were used. Reciprocal crosses in a green house resulted in 50 combinations; the hybrid nature of 43 was confirmed by RAPD analysis. Some crosses among accessions were not successful, as the fruits produced no seeds at all, empty seeds or the cross was simply not viable; the reason could be the existence of genetic barriers between the species. Some hybrid combinations did however produce seeds. The crosses *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. chinense* x *C. annuum* and *C. chinense* x *C. frutescens* presented consistent and promising results in this regard. The lowest pollen viability (8%) was observed here in *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum*, indicating that although this cross is possible, the resulting hybrid presents partial sterility due to the low pollen viability, affecting the number of fruits

significantly. The combination *C. chinense* x *C. annuum* var. *annuum* presented high pollen viability (99%), indicating chromosome homology of this species, which must therefore belong to the same gene complex. Pollen grain germination and tube growth of non-viable hybrid combinations and selfings (control) were evaluated through staining with aniline, where pollen grain germination in the stigma and the presence of pollen tubes were observed in the style and ovary. Results suggest the existence of post-fertilization barriers, probably responsible for the failure in the formation of hybrid seeds of these combinations. The main barrier is seed inviability, probably due to endosperm degeneration or the partial sterility of hybrid plants, impairing or hampering the continuity of the hybridization program.

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies hortícolas, diferentemente dos grãos, são cultivadas por grandes, médios e pequenos agricultores, apresentando, de modo geral, grande inserção da agricultura familiar. Estima-se que o cultivo de hortaliças no Brasil ocupe uma área de aproximadamente 720 mil hectares, que produzem cerca de 11 milhões de toneladas, movimentando algo em torno de 2,2 a 2,5 bilhões de dólares/ano. Estes números colocam a atividade em segundo lugar no agronegócio, em termos de valor, sendo superado apenas pela produção de cana-de-açúcar. Em termos de volume, as hortaliças ocupam o quinto lugar, logo após a cana, milho, soja e café, respectivamente (Makishima, 2000).

Espécies de *Capsicum*, constituídas por pimentas e pimentões, são economicamente importantes e ocupam lugar de destaque entre as principais hortaliças consumidas no mundo. No Brasil, dados referentes ao ano de 2003, consideram que, para os próximos anos, a estimativa de área plantada com espécies de *Capsicum* será de cerca de 12 a 13 mil hectares, produzindo aproximadamente 280.000 toneladas de frutos (Carvalho *et al.*, 2003). Apenas a comercialização de sementes de *Capsicum* envolve recursos da ordem de 1,5 milhões de dólares/ano. No âmbito estadual, São Paulo e Minas Gerais são responsáveis por 40-50% do total da área plantada da cultura no País (Reifschneider *et al.*, 1998).

Comparativamente, o pimentão apresenta maior expressividade tanto no plantio, quanto na comercialização e, conseqüentemente, no consumo. Esta hortaliça encontra-se entre as dez de maior importância para o mercado hortigranjeiro brasileiro, ocupando significativa área de plantio (Pereira *et al.*, 2001). Nascimento *et al.* (2004) afirmam que além do consumo *in natura*, a

importância industrial do pimentão deve-se à presença de um concentrado de pigmentos naturais na polpa de seus frutos vermelhos e maduros. Estes pigmentos são basicamente formados por compostos do grupo carotenóides e do grupo flavonóides e têm sido largamente utilizados como corantes em diversas linhas de produtos processados.

Com relação à pimenta (*Capsicum spp.*), a crescente procura do mercado interno e externo provocou a expansão da área cultivada em vários Estados brasileiros, principalmente em iniciativas de agricultura familiar. Além de serem consumidas ao natural, as pimentas abastecem a agroindústria e podem ser processadas e utilizadas em várias linhas de produtos (Ribeiro, 2005). A cultura situa-se como atividade olerícola bastante rentável, tanto para consumo *in natura* como na industrialização de conservas, molhos, geléias, sendo, também, pesquisada para usos medicinais (Blank *et al.*, 1995).

Estudos científicos com pimenta e pimentão encontram-se em estágio bastante avançado no Brasil. Segundo Blank *et al.* (1995), a ocorrência de uma grande diversidade de materiais genéticos dentro do gênero *Capsicum* favorece e possibilita sua utilização em programas de melhoramento, tendo como principal preocupação a produção de frutos de melhor qualidade e a resistência a doenças. De acordo com Silva (2003), a utilização de cultivares resistentes é uma das maneiras mais eficientes de controle de doenças, devido ao baixo custo que representa para os produtores, diminuição da poluição ambiental, por um menor uso de defensivos e melhoria da qualidade final do produto.

O melhoramento genético é uma das alternativas mais viáveis para solucionar alguns problemas relacionados à cultura, principalmente àqueles referentes a doenças. A hibridação interespecífica é uma metodologia muito utilizada para transferência de genes de um genótipo resistente para um suscetível. Entretanto, para que seja bem sucedida é necessário que as espécies 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.

Casali (1970) relatou que frutos híbridos de *Capsicum* podem ser obtidos em qualquer direção que se realize o cruzamento, contudo, sementes híbridas

viáveis são restritas a apenas alguns cruzamentos interespecíficos. Pickersgill (1971) descreveu que o cruzamento entre espécies cultivadas e silvestres oferece maiores chances de obtenção de progênies viáveis e de híbridos férteis do que em cruzamentos entre espécies cultivadas. Para a autora, essa observação pode ser explicada pelo fato de que as espécies cultivadas, após gerações de autofecundação, tornam-se incapazes de tolerar a extrema heterozigosidade produzida em um  $F_1$  interespecífico. Entretanto, Pickersgill (1980) concluiu que nenhuma espécie que estudou provou estar completamente isolada das demais, reprodutivamente, e que há possibilidade de transferência de genes de uma espécie para outra por meio de espécies ponte.

Estudos sobre a origem e diversidade genética das espécies, o número de cromossomos, a incompatibilidade interespecífica e o comportamento cromossômico nas espécies cultivadas e silvestres são pesquisas básicas de apoio aos programas de melhoramento. Para Singh (1993), a identificação de espécies, suas constituições genômicas e as possíveis interações com outras espécies podem ser verificadas através de procedimentos bioquímicos, moleculares e por evidências citogenéticas, tais como, a análise do cariótipo, taxa de cruzabilidade, viabilidade do híbrido e pareamento meiótico.

Desse modo, considerando a coleção de germoplasma de *Capsicum* spp. e o programa de melhoramento conduzido pela UENF, objetivou-se com o presente estudo a obtenção de híbridos interespecíficos entre cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, confirmação da natureza híbrida dos genótipos a partir de marcadores RAPD, além da caracterização, via análise citogenética e morfoagronômica, dos híbridos interespecíficos obtidos.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS AGRONÔMICOS

Espécies de *Capsicum* são representadas por pimentas e pimentões, estes provavelmente originados por uma mutação espontânea (Silva, 2002). Segundo Prince (1995), espécies de *Capsicum* são hortícolas de valor crescente, sendo, também, o condimento de maior importância no mundo. Seu cultivo ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil e pode ser considerado um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração do pequeno agricultor ao mercado.

O pimentão, *Capsicum annuum* L., ocupa papel significativo na olericultura brasileira. Trata-se de uma das hortaliças de maior importância econômica no mercado hortigranjeiro nacional, sendo a terceira espécie mais cultivada da família *Solanaceae*, atrás apenas da batata e do tomate. O crescimento dessa olerícola teve grande impulso a partir da década de noventa quando ocorreu um grande incremento no uso de híbridos comerciais, notadamente no segmento de cultivares de frutos cônicos, cuja produção de sementes é feita basicamente no País (Maluf, 2003).

A importância do pimentão deve-se não somente a seu cultivo para consumo *in natura*, como também para processamento industrial de pigmentos naturais largamente utilizados como corantes em diversas linhas de produtos processados. As variedades mais conhecidas são o pimentão verde, o amarelo e o vermelho, porém existem outras variedades bastante exóticas com relação à coloração. O plantio da cultura ocorre em todo o País, sendo que as maiores áreas de cultivo concentram-se na região Sudeste, principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Moor, 2003).

O agronegócio da pimenta no Brasil é expressivo. Envolve produtores rurais, pequenas fábricas artesanais de conserva e pimentas decorativas, indústrias que fabricam molhos, geléias e até a exportação de páprica por empresas multinacionais. A produção de pimenta, como condimento de mesa e de produtos alimentícios industrializados vem crescendo e caracteriza-se como uma atividade olerícola lucrativa. Sua importância é atribuída principalmente as suas propriedades aprimoradoras de sabor, aroma e cor dos alimentos. Além disso, pesquisas científicas atuais mostram que a mesma substância que confere gosto picante às pimentas - capsaicina - apresenta propriedades terapêuticas ativas no tratamento de algumas enfermidades (Avelar, 2005).

Cinco espécies de *Capsicum* são comumente cultivadas no Brasil e em diferentes partes da América Tropical e são caracterizadas principalmente pela pungência, coloração, formato e tamanho dos frutos (Heiser, 1976). A pungência é uma das características mais evidentes do gênero, sendo produzida por um conjunto de substâncias alcalóides presentes na placenta do fruto denominadas capsaicinóides. São aproximadamente quatorze capsaicinóides existentes, no entanto, os que ocorrem em maior quantidade são capsaicina, diidrocapsaicina e a nordiidrocapsaicina (Moor, 2003).

Uma grande diversidade de cores, formatos e grau de pungência é verificada entre as espécies de *Capsicum* e essa variação pode estar relacionada ao ambiente de cultivo. Bianchetti (1996), explorando a morfologia e a ecologia das espécies brasileiras, observou em seus estudos resultados distintos dos encontrados nos Andes. Segundo o autor, a maioria das espécies dos Andes vegeta em ambientes abertos e secos, com frutos eretos, ovulados, vermelhos e as sementes são claras e dispersadas por pássaros, enquanto que, grande parte das espécies brasileiras vegeta em ambientes fechados e úmidos, apresentando frutos pendentes, globosos, verde amarelados com sementes escuras. Na maioria das vezes, a propagação é feita por sementes, mas em alguns casos, pode ser realizada por estaquia.

É crescente a procura do mercado interno e externo por pimentas pungentes de cores e sabores variados, além de variedades de pimentões coloridos como o amarelo, branco, roxo e laranja. No caso das pimentas, seus frutos podem ser desidratados em flocos (pimenta calabresa), em pó (páprica picante), sendo que a colheita é sempre feita em estágio maturo. Normalmente

em pimentão, os frutos *in natura* representam a maior parte do consumo e a colheita deve ser feita no estágio verde. Trata-se de uma hortaliça bastante exigente nos tratos culturais e, muitas vezes, fortemente prejudicada por pragas e doenças (Reifschneider, 2000).

## 2.2 CENTRO DE ORIGEM E ESPÉCIES CULTIVADAS

O nome científico do gênero *Capsicum* deriva do grego (Nuez *et al.*, 1996) e refere-se a kapso (picar) e a kapsakes (cápsula) e a palavra pimenta deriva do latim *pigmenta* e significa corante.

O gênero *Capsicum*, originário da América do Sul e Central, se encontra difundido por todo o mundo, sendo cultivado tanto em regiões tropicais quanto em temperadas. O sudeste do Brasil é considerado centro secundário de diversidade do gênero (IPGRI, 1995). De acordo com Silva (2002), com exceção de *Capsicum anomalum*, todas as espécies do gênero *Capsicum* são originárias da América tropical, sendo que uma porção importante do gênero se originou numa área principal na Bolívia com subsequente migração dos Andes e terras baixas da Amazônia, acompanhada por dispersão e especiação.

Plantas desse gênero pertencem à divisão Spermatophyta, filo Angiospermae, classe Dicotyledonea, Ramo Malvales-Tubiflorae, ordem Solanales e família Solanaceae, sendo que o gênero possui ampla variabilidade genética (Casali e Couto, 1984). Bosland e Votara (2000) relatam que a taxonomia dentro do gênero *Capsicum* é complexa, devido à grande variabilidade de formas existentes nas espécies cultivadas e à diversidade de critérios utilizados na classificação.

Existem cerca de trinta e três espécies diferentes, sendo cinco cultivadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens*. As demais são classificadas em semi domesticadas e silvestres (Moor, 2003). Algumas espécies silvestres como a *Capsicum praetermissum*, *Capsicum buforum* e *Capsicum schottianum* são nativas do Brasil (Casali e Couto, 1984).

Plantas desse gênero possuem flores hermafroditas com número de pétalas variável, prevalecendo as pentâmeras. O fruto é denominado baga, o caule é herbáceo, geralmente tutorado quando conduzido para fins agrônômicos (Reifschneider, 2000).

A espécie *C. annuum* é a mais cultivada no mundo. Viñals *et al.* (1996) afirmam que todas as formas de pimentão utilizadas pelo homem pertencem à espécie *C. annuum*, sendo que esta apresenta a maior variabilidade genética. Essa espécie tem como centro de origem e diversidade o sul dos EUA até o norte da América do Sul e segundo Heiser Jr. (1979), estudos arqueológicos demonstram que sua domesticação ocorreu na América Central ainda no início da era Cristã. A espécie *C. annuum* var. *annuum* é representada por pimentas e pimentões e apresenta como características flores solitárias, corola branca, anteras azuis, ausência de manchas na corola e de constrição anular na junção do cálice com o pedicelo, enquanto a espécie *C. annuum* var. *glabriusculum* apresenta corola sem a presença de manchas, brancas com borda roxa ou totalmente arroxeadas, além de anteras roxas.

Existe apenas uma única forma domesticada de *C. frutescens*, popularmente chamada de tabasco, cultivada no sudeste dos EUA. Na América do Sul, especialmente no Brasil, formas espontâneas (como a malagueta) são encontradas com relativa frequência. A espécie encontra-se distribuída nas terras baixas do Sudeste brasileiro até a América Central e as Índias Ocidentais, apresentando variabilidade bem menor que as demais espécies cultivadas no Brasil (Reifschneider, 2000). Caracteriza-se por apresentar duas a cinco flores a cada nó, corola branco-esverdeado, anteras variando de azul a roxo (Pickersgill, 1969), frutos extremamente pungentes e o cálice do fruto maduro, sem constrição anular na junção com pedicelo.

A espécie *C. chinense* possui frutos pendentes de diversos tamanhos e uma constrição anular na junção do cálice com o pedicelo (Teixeira, 1996). A distribuição de *C. chinense* é a mesma de *C. frutescens*. De acordo com Ribeiro (1987), a Bacia Amazônica é centro de diversidade de *C. chinense* Jacq., sendo conhecida por pimenta de cheiro, pimenta de bode e pimenta murici. Pickersgill (1966) relatou a estreita relação entre *C. chinense* e *C. frutescens*, fundamentada em estudos de morfologia e hibridação interespecífica. Casali (1970) mostrou que ambas apresentam alto grau de compatibilidade e ressalta que *C. chinense*, possuidora de grande variabilidade genética é um material valioso como fonte de genes para *C. frutescens*, que é uma das espécies mais importantes comercialmente em todo o mundo.

*Capsicum baccatum* apresenta duas formas ou variações: *C. baccatum* var. *pendulum*, que possui corola branca com manchas amareladas e uma única flor por nó, e *C. baccatum* var. *baccatum*, que possui as manchas esverdeadas e duas a cinco flores por nó, é altamente ramificada e a cor da corola é paleácea ou branca esverdeada. A ocorrência de *C. baccatum* abrange o Noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Sudoeste do Brasil, sendo que a forma semidomesticada *C. baccatum* var. *baccatum* apresenta estreita distribuição na parte central do Peru, Bolívia, Norte da Argentina e no Sudeste do Brasil (Reifschneider, 2000).

*Capsicum pubescens* é uma espécie típica de terras altas, relativamente tolerantes ao frio, podendo, contudo ocorrer em altitudes baixas. Possui flores isoladas a cada nó, de corola roxa e, ocasionalmente, com zonas brancas, anteras roxas, frutos com formato de maçã e sementes pretas (Bosland, 1996). O centro primário de diversidade é a Bolívia (Reifschneider, 2000). É a única espécie domesticada que não se encontra naturalmente no Brasil.

As espécies silvestres de *Capsicum* apresentam frutos pequenos, possuindo dispersão zoocórica, tendo os pássaros como agentes de dispersão natural. Muitas espécies silvestres têm distribuição restrita, sendo endêmicas em determinadas regiões (Bosland, 1996). Entre as espécies semidomesticadas e silvestres estão: *C. buforum*, *C. campylopodium*, *C. cardenasii*, *C. chacoense*, *C. coccineum*, *C. cornutum*, *C. dimorphum*, *C. dusenii*, *C. eximium*, *C. glapagoensis*, *C. geminifolium*, *C. hookerianum*, *C. lanceolatum*, *C. leptopodium*, *C. minutiflorum*, *C. mirabile*, *C. parvifolium*, *C. praetermissum*, *C. scolnikianum*, *C. schottianum*, *C. tovarii*, *C. villosum*, *C. anomalum*, *C. breviflorum*, *C. ciliatum*, *C. flexuosum* e *C. eximium* var. *tomentosum* (Eshbaugh, 1964 e Pickersgill *et al.*, 1979).

## 2.3 MELHORAMENTO GENÉTICO

A composição genética atual das diversas culturas é o resultado da domesticação e melhoramento a que elas foram submetidas durante séculos. Dois dos principais fatores da evolução, a recombinação e a seleção, têm sido intensivamente utilizados pelos melhoristas com o emprego de métodos refinados desenvolvidos na primeira metade deste século. As mutações, o terceiro grande fator da evolução, são instrumentos adicionais, capazes de auxiliar os métodos

convencionais de melhoramento para o aumento da variabilidade genética das espécies (Duvick, 1986).

O melhoramento de plantas é uma ciência que vem contribuindo expressivamente com o incremento qualitativo e quantitativo de alimentos, tendo como objetivo o desenvolvimento de novas cultivares com maior potencial de rendimento, qualidade industrial e nutritiva, resistência a doenças, estresses bióticos e adaptabilidade e estabilidade em diferentes regiões fisiográficas, dentre outros (Floss, 2003). Para Borém (1998), o melhoramento de plantas não é uma ciência isolada, mas a aplicação direta de conhecimentos de citogenética, entomologia, fisiologia, botânica, bioquímica, estatística, fitopatologia, recursos genéticos e conhecimentos computacionais.

Uma condição fundamental para que ocorra avanço genético é a existência de diversidade genética. Assim, o melhoramento e a obtenção de plantas de *Capsicum* que combinem características desejáveis pelo consumidor dependem do conhecimento, preservação e do uso de recursos genéticos da espécie. Reifschneider (2000) ressalva que o sucesso no desenvolvimento de novas cultivares está associado principalmente à variabilidade genética dentro de cada espécie.

O sucesso no melhoramento de populações depende fundamentalmente da disponibilidade de variabilidade genética na população original, todavia, outros fatores devem ser cuidadosamente observados, como o método de seleção adotado, a precisão nas avaliações dos genótipos, a correta interpretação dos efeitos do ambiente, as interações genótipos x locais e genótipos x anos, a identificação de efeitos pleiotrópicos e das correlações genéticas e fenotípicas entre caracteres (Miranda Filho, 1984). Para Barbosa Neto e Bered (1998), o melhoramento genético tem contribuído na adaptabilidade e produtividade dos cultivos, entretanto, para a obtenção eficiente de ganhos genéticos é necessário um conhecimento detalhado da constituição e variabilidade genética das espécies. Portanto, a classificação de genitores em grupos heteróticos e a realização de cruzamentos entre tipos geneticamente distintos podem contribuir para a ampliação da variância genética em populações segregantes (Messmer *et al.*, 1993).

Informações relativas ao modo de reprodução das espécies são importantes porque são determinantes na escolha do método de melhoramento a

ser empregado. De acordo com Silva (2002), em *Capsicum* o sistema reprodutivo pode variar consideravelmente de acordo com a espécie. Nas espécies não domesticadas e domesticadas com frutos pequenos, geralmente o estigma se posiciona acima das anteras favorecendo a alogamia. A presença de nectários também favorece esse sistema, mediante polinização entomófila. Nos outros casos, o estilo costuma ser mais curto, favorecendo a autogamia. Saccardo (1992) afirma que as espécies domesticadas desse gênero são preferencialmente autógamas, com taxa de alogamia que pode variar de 3% a 46%. Entretanto, Bosland (1996) acredita que em espécies do gênero *Capsicum* a taxa de fecundação cruzada pode variar de 7 a 91%, sugerindo o termo “alógamas facultativas”. Filho (2002) relata que em populações naturais ocorre a troca de genes entre plantas da mesma espécie ou entre espécies diferentes dentro deste gênero. Segundo o autor, variedades diferentes, plantadas juntas ou perto umas das outras, sofrem cerca de 16,5 % de polinização cruzada, devido à atuação de abelhas e do vento. Como consequência isto faz com que haja uma variabilidade genética e uma diversificação enorme de variedades. Ainda de acordo Saccardo (1992), a taxa de alogamia de uma espécie autógama depende da morfologia floral, da cultivar e da presença e número de insetos polinizadores. Todas as espécies cultivadas são autocompatíveis, entretanto, algumas espécies silvestres são auto-incompatíveis (Filho, 2002).

Nas duas últimas décadas ocorreram notáveis avanços nos programas de melhoramento do pimentão no Brasil, tanto que, nos dias atuais, a maioria dos cultivares disponíveis nos catálogos das companhias de sementes são híbridos  $F_1$ . No entanto, apesar dos sucessos obtidos, ainda são muitos os desafios, que incluem necessariamente uma melhor qualidade e conservação de frutos, maior resistência a doenças, maior produção total e precocidade (Nascimento *et al.*, 2004). De acordo com Oliveira *et al.* (1999), em programas de melhoramento baseados em hibridação, genótipos segregantes superiores são recuperados mais rápido e eficientemente quando a população base para a seleção associa superioridade das características sob melhoramento à ampla variabilidade genética, essa última oriunda da diversidade genética entre os progenitores envolvidos nos cruzamento.

Lins *et al.* (2001) consideram que o cultivo da pimenta e pimentão no Brasil é extenso e demanda novas variedades mais produtivas e resistentes a

doenças e estresses ambientais, bem como por diferentes tamanhos, cores, sabores e pungências dos frutos. Segundo os autores os programas de melhoramento visam atender a essas demandas com base em dados de variabilidade genética obtidos em estudos de caracterização morfológica, citogenética e molecular de acessos cultivados e silvestres de *Capsicum*.

Nascimento *et al.* (1994) relatam que no caso do pimentão, o desenvolvimento de novos materiais genéticos deve obter, entre outros, os seguintes atributos: coloração acentuada e/ou quantidade elevada de pigmentos, boa adaptação às condições edafoclimáticas brasileiras, resistência genética as principais doenças e pragas limitantes da cultura.

Grandes programas de melhoramento como o da Embrapa Hortaliças tem se concentrado principalmente na resistência múltipla a doenças como a murcha de fitóftora (*Phytophthora capsici*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria), murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), mosaico (PVY) e vira-cabeça (TSWV) (Reifschneider, 2000). Normalmente, utiliza-se a hibridação interespecífica para a transferência de genes de resistência de um genótipo resistente para um suscetível.

Os métodos empregados no melhoramento de uma espécie são definidos basicamente em função dos objetivos do programa, da variabilidade genética disponível, da forma de reprodução e das formas alternativas possíveis de propagação (Ferah, 1987). A maioria dos melhoristas utiliza na cultura do pimentão dois métodos clássicos de melhoramento: o retrocruzamento e o método genealógico (Nagai, 1983). Porém, nos últimos anos, também tem se dado ênfase à obtenção de híbridos  $F_1$  (Tavares, 1993; Peixoto, 1995; Innecco, 1995), que podem ser obtidos pelo cruzamento de linhagens (Ikuta, 1971), resultando em cultivares mais produtivas que as comerciais de polinização aberta, além da possibilidade de selecionar linhagens superiores em populações segregantes derivadas de progênies  $F_2$ . A presença e a magnitude da heterose evidenciam a perspectiva para a produção de cultivares híbridos. Além disso, o conhecimento do comportamento dos híbridos  $F_1$  em relação aos seus cultivares parentais permite ao melhorista escolher as melhores combinações genéticas para o caráter considerado (Miranda, 1988).

De acordo com Moor (2003), dentre as cultivares de *Capsicum* desenvolvidas para o mercado existem: híbridos, linhagens e populações de



polinização aberta. Os híbridos comerciais são obtidos por emasculação manual ou utilização de linhagens com macho esterilidade genética e citoplasmática. As linhagens com macho esterilidade genética foram obtidas por mutações espontâneas, enquanto a citoplasmática de linhagens identificadas por Peterson em 1958. A utilização de cultivares híbridas de *Capsicum* é um importante fator para o incremento da produtividade. A principal diferença entre essas cultivares e as tradicionalmente plantadas reside no efeito heterótico expresso nos caracteres diretamente ligados à produtividade e qualidade de frutos (Nascimento *et al.*, 2004).

#### **2.4 CITOGENÉTICA DE *Capsicum* spp.**

Segundo Heiser Jr. (1976), as espécies do gênero *Capsicum* são consideradas de autofecundação e diplóides com  $2n = 2X = 24$  cromossomos, no entanto, um diferente número básico de cromossomos ( $2n = 2X = 26$ ) tem sido encontrado em espécies silvestres distribuídas na América do Sul, entre elas *Capsicum campylopodium* e *Capsicum mirabile*, oriundas do Sul do Brasil; *Capsicum shottianum*, encontrada na Argentina, Sul do Brasil e Sudeste do Paraguai (Moscone *et al.*, 1993) e *Capsicum lanceolatum*, encontrada na Guatemala, Honduras e México (Tong e Bosland, 1997).

Para Pickersgill (1991) os cariótipos das diferentes espécies são muito similares, geralmente têm um par de acrocêntricos e os restantes dos cromossomos são meta ou submetacêntrico. Poucas espécies de pimentas triplóides e tetraplóides têm sido reportadas na natureza, no entanto, espécies haplóides são mais comuns. De acordo com a autora, é relativamente fácil o acréscimo ou decréscimo artificial de ploidia em *Capsicum*. Duplos somáticos podem ser obtidos a partir do tratamento com colchicina. Todavia, autotetraplóides parecem não ter nenhuma vantagem agrônômica em relação aos diplóides. Ainda de acordo com a autora, os homozigotos produzidos por colchicina não têm sido explorados comercialmente para a produção de híbridos, mas têm sido usados para resistência a doenças.

O número de cromossomos e o seu comportamento na meiose trazem informações para o estudo da taxonomia, sistemática, genética e melhoramento genético. Normalmente, a ocorrência de diferentes números cromossômicos nos

genitores, em cruzamentos, pode causar incompatibilidade, aborto de híbridos e esterilidade (Yoon *et al.*, 2006).

## 2.5 HIBRIDAÇÃO INTERESPECÍFICA

A transferência de genes de espécies silvestres para espécies cultivadas via hibridação interespecífica é de grande interesse para a combinação do potencial genético das espécies. As espécies silvestres afins às plantas cultivadas representam verdadeiros reservatórios de genes úteis que podem ser devidamente explorados, se transferidos para as espécies cultivadas. A hibridação interespecífica é uma importante ferramenta para possibilitar a introgressão de novos genes de interesse em variedades cultivadas. Dessa maneira, complementam-se as características comerciais da espécie cultivada, com um ou mais fatores desejáveis provenientes dos materiais silvestres. Outra consideração importante sobre a hibridação interespecífica relaciona-se com a ampla variabilidade genética geralmente obtida nas gerações subseqüentes (Siqueira *et al.*, 1988).

Harlan e De Wet (1971) estabeleceram um sistema conhecido como complexo gênico, que organiza os vários tipos de germoplasma sob a visão do melhorista. Os autores propuseram três categorias de complexo gênico com base na facilidade de cruzamento entre as espécies e fertilidade do híbrido: 1- complexo gênico primário, onde o germoplasma pode ser cruzado facilmente resultando em híbridos com alta fertilidade e conseqüentemente assegurando a transferência do gene. Os limites do complexo gênico primário são considerados congruentes com os limites de uma espécie biológica; 2- complexo gênico secundário, no qual o cruzamento e a transferência gênica são mais difíceis de serem conseguidas, 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, onde embora cruzamentos possam ser feitos com grandes dificuldades, o híbrido resultante é estéril ou inviável.

De acordo com Choong (1998), existe a formação de três grandes grupos entre as espécies de *Capsicum*, onde *C. annuum*; *C. chinense*, *C. frutescens* formam o complexo *annuum*. *C. baccatum* forma um segundo complexo juntamente com *C. pratermissum* e as espécies *C. eximium*, *C. cardenasii* e *C.*

*pubescens* formam o complexo *pubescens*. 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 grupo é tido como possível, o mesmo não acontecendo para cruzamento entre complexos diferentes em que podem ocorrer barreiras de pré e pós-fertilização.

A transferência de genes úteis através da hibridação interespecífica, na maioria das vezes, é limitada por barreiras de pré e pós-fertilização. As barreiras de pré-fertilização podem resultar na falta de germinação dos grãos de pólen e no retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico. Após a fertilização, as principais barreiras são a morte do embrião, devido à degeneração do endosperma, e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Prestes e Goulart, 1995). Guo *et al.* (1994) relatam que em *Phaseolus* a transferência de genes via hibridação interespecífica tem sido limitada por um desenvolvimento anormal do embrião híbrido e pela rápida perda do vigor nas gerações subsequentes. Em suas pesquisas Pickersgill (1997) afirma que em *Capsicum* após a fertilização, o aborto do embrião é uma característica bastante evidente em vários cruzamentos interespecíficos.

Para Mahaewaran *et al.* (1986) um dos mais importantes avanços no melhoramento de plantas é a quebra das barreiras interespecíficas. Hogenboon (1975) cita que, com o intuito de transpor essas barreiras, várias técnicas têm sido utilizadas, como o cultivo de embrião *in vitro*, regeneração de plantas a partir de calos de embriões, cultivo de sementes imaturas, mistura de pólen de vários genótipos da espécie silvestre, seleção de linhagens de plantas silvestres compatíveis com as cultivadas e cruzamentos-pontes.

Diversas pesquisas têm sido realizadas com ênfase na hibridação entre espécies de *Capsicum*. Casali (1970) realizou trabalho com cruzamentos interespecíficos no gênero *Capsicum* com as espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum pendulum*, *C. praetermissum* e *C. microcarpum*. Como resultado geral, o autor obteve baixa germinação de sementes, cruzamento viável em apenas uma direção, baixa fertilidade dos híbridos e plantas normais com alto vigor, dependendo dos genitores utilizados em cruzamento. Filho (2002) afirma que híbridos têm sido obtidos em várias combinações entre as espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. frutescens* e têm apresentado diferentes

graus de fertilidade. *C. pubescens* é, aparentemente, isolada geneticamente das espécies cultivadas, pois é a única em que através dos cruzamentos com as demais espécies não têm sido obtidos híbridos viáveis. De acordo com Smith e Heiser (1957), o cruzamento de *C. pubescens* x *C. frutescens* e com *C. annuum* não são viáveis e cruzamentos entre *C. annuum* x *C. chinense* e *C. frutescens* x *C. chinense* são possíveis em ambas as direções. Comprovou-se ainda, que somente usando cultura de embrião foi possível obter plantas híbridas nos cruzamentos de *C. pubescens* x *C. chinense*.

Segundo Pickersgill (1997), estudos na sistemática de *Capsicum* têm mostrado que os problemas relatados em pesquisas de hibridação interespecífica nessa espécie são similares àqueles encontrados em tomate, tabaco e batata, sendo que a superação das barreiras interespecíficas é um dos mais importantes avanços no melhoramento de plantas, permitindo uma considerável expansão do conjunto gênico da espécie.

## 2.6 VIABILIDADE POLÍNICA

De acordo com Siqueira *et al.* (1988), a hibridação interespecífica é uma importante ferramenta nos programas de melhoramento, pois possibilita a transferência de genes com características de interesse presentes em espécies silvestres para variedades cultivadas. Yoon *et al.* (2006) relataram que em Solanáceas a hibridação interespecífica tem sido usada intensamente para introgressão de genes importantes em espécies cultivadas, particularmente àqueles relacionados à resistência a doenças. Entretanto, o cruzamento entre espécies distintas pode ser incompatível, resultando em problemas como a inviabilidade dos grãos de pólen da planta híbrida. Para Dafni (1992) a avaliação da viabilidade do grão de pólen é o fator primário para que ele venha ter a oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo este um estágio decisivo à fertilização. Souza *et al.* (2000) afirmaram que a capacidade de fertilização dos grãos de pólen é um aspecto importante por estar diretamente relacionada à frutificação e, em última análise, a produtividade, principalmente em se tratando de plantas de importância agrônômica.

Para Oliveira *et al.* (2001) a viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada através da utilização de numerosas técnicas, em citogenética, e bastante empregada no monitoramento de pólen em

armazenamento, de maneira a garantir a fertilidade e com isso, tornar possível o cruzamento entre genótipos de importância econômica. Singh (1993) expôs que a viabilidade ou fertilidade do pólen pode ser averiguada a partir de coloração com carmim acético (1%), onde, de modo geral, grãos de pólen viáveis apresentam-se circulares, com superfície uniforme e coloração vermelho-intenso, enquanto os grãos inviáveis apresentam-se em menor tamanho, superfície irregular, formato não uniforme e coloração amarelo-claro. Uma segunda opção pode ser o uso de iodeto de potássio-solução de Lugol ( $I_2KI$ ), técnica indicada para grãos de pólen amiláceos, maduros e frescos (Dafni, 1992).

O método de Alexander (1969) baseia-se no uso de uma solução tripla composta pelos corantes Laranja G, Fucsina Básica e Verde Malachita em que o núcleo do grão de pólen íntegro e viável reage com a fucsina, corando de rosa os grãos de polens viáveis. Em polens inviáveis, devido à ausência de protoplasma íntegro, a coloração apresenta-se esverdeada, tornando possível correlacionar a coloração do grão de pólen com a viabilidade polínica.

Normalmente uma alta percentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletiriam diretamente um processo meiótico regular. Sharma e Das (1954) explicam o alto percentual de esterilidade do grão de pólen como resultado da ocorrência de irregularidades meióticas. Para os autores, a presença de tétrades anormais é indicativo de um processo meiótico irregular que, conseqüentemente, leva à produção de pólen com reduzida viabilidade. Twell (1995) afirma que a inviabilidade polínica pode ocorrer durante a microsporogênese, em que falhas no comportamento meiótico resultam em gametas com cromossomos desbalanceados ou anucleados, ou ainda durante a microgametogênese, resultando em grãos de pólen com citoplasma retraído.

A literatura relata vários estudos envolvendo a viabilidade dos grãos de pólen como fator determinante para a continuidade de um programa de melhoramento. Smith e Heiser (1957) observaram uma variação de 12 a 72% de pólen fértil nas plantas obtidas do cruzamento entre *C. chinense* x *C. frutescens* e de 1 a 70% no cruzamento de *C. chinense* x *C. annuum*. Eshbaugh (1964) obteve híbridos parcialmente férteis quando realizou os cruzamentos recíprocos de *C. frutescens* x *C. chinense*. Kumar *et al.* (1987) mencionam em seus trabalhos sobre híbridos interespecíficos de *Capsicum* a ocorrência de meiose irregular,

onde o genoma de *C. annuum* difere de *C. chinense* por duas translocações e algumas alterações estruturais e *C. baccatum* por duas translocações, uma única inversão e algumas alterações estruturais secundárias. Kumar *et al.* (1988) realizaram cruzamentos com a espécie silvestre *C. chacoense* e as espécies cultivadas *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* e obtiveram híbridos, variando entre parcialmente férteis a totalmente estéreis.

Rao *et al.* (1992), analisando híbridos  $F_1$  e  $F_2$  e derivados de cruzamentos interespecíficos entre *C. baccatum* e *C. frutescens* L., verificaram que estes exibiram meiose irregular, explicando assim a esterilidade observada nos híbridos. De acordo com os autores, a estrutura dos cromossomos, meiose irregular, genes para esterilidade de pólen, desequilíbrios segregacionais e as recombinações intergenômicas são os principais fatores que podem causar esterilidade nos híbridos.

Lanteri e Pickersgill (1993) estudaram a meiose em híbridos  $F_1$  entre *C. annuum* e *C. chinense* e observaram que os acessos parentais, utilizados como genitores, diferiam em duas permutas cromossômicas. Os autores concluíram que permutas heterozigóticas, resultando freqüentemente em múltiplos de seis ou mais cromossomos são características de híbridos interspecíficos em *Capsicum*. Observaram também, que na meiose de híbridos  $F_1$  entre *C. chinense* e *C. annuum* há presença de uma associação hexavalente, a qual está presente em 18% das amostras coletadas na primavera e verão, mas não foram encontradas associações multivalentes quando coletadas no outono. Yoon (2003) relatou que a esterilidade do híbrido interespecífico é tida como uma das principais barreiras envolvendo cruzamentos entre as espécies *C. baccatum* x *C. annuum*, e que a mesma é devido a anormalidades que ocorrem durante a meiose como formação de associações uni e multivalentes na metáfase I, cromossomos retardatários na anáfase I e formação de micronúcleos na telófase. O autor observou uma viabilidade polínica abaixo de 5% para o híbrido interespecífico.

Por outro lado, fatores extrínsecos como temperatura ambiental e a quantidade de defensivos aplicados na cultura podem também intervir na viabilidade polínica. A interferência do ambiente no comportamento meiótico e conseqüentemente na viabilidade dos grãos de pólen foi observada por Souza *et al.* (2002) em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, sugerindo que variações na temperatura ambiental possam afetar a viabilidade dos grãos de pólen,

interferindo na microsporogênese ou na microgametogênese. Resultados semelhantes foram observados por Barnabas (1985) e Soares Scott *et al.* (1995) em milho (*Zea mays*), onde os autores verificaram que aumento ou diminuição acentuada na temperatura acarreta variações na viabilidade do pólen, podendo, também, inativar o controle do crescimento do tubo polínico.

A influência do uso de defensivos agrícolas na viabilidade e germinação do grão de pólen foi constatada nos trabalhos de Bisara e Prakash (2003), nos quais os autores relatam que o tamanho, viabilidade e germinação dos grãos de pólen de *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.), cultivar 'Jawala', podem ser reduzidos pelo uso de defensivos (chlorflurenol). Observações semelhantes foram feitas por He e Wetzstein (1994), cujo trabalho revela a degeneração do grão de pólen causada pelo uso sistemático de fungicidas.

A análise da fertilidade do pólen é uma condição significativa para o desenvolvimento de programas melhoramento genético clássico. A taxa de viabilidade polínica é importante, pois um número reduzido de grãos de pólen na superfície estigmática pode resultar em uma frutificação irregular. Desse modo, dados sobre a viabilidade são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva de uma determinada espécie, permitindo assim, a obtenção de resultados positivos, tanto em linhagens quanto em cruzamentos interespecíficos.

## **2.7 CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO**

A germinação e o crescimento do tubo polínico devem ser considerados um fator primordial a ser estudado em combinações interespecíficas, uma vez que, em híbridos interespecíficos, a ocorrência de grão de pólen na superfície estigmática não implica necessariamente no seu crescimento através do tubo polínico. Nettancourt *et al.* (1974) afirmam que em alguns cruzamentos interespecíficos, a incompatibilidade é devida ao fracasso da germinação do pólen no estigma ou à falta de desenvolvimento do tubo polínico dentro do filete. Aragão *et al.* (2002), em seu trabalho sobre cultivo de embriões de tomate *in vitro*, visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em *Lycopersicon esculentum*, relatam sobre a incompatibilidade sexual entre espécies e discutem sobre a incapacidade do grão de pólen de *L. esculentum* em germinar no estigma de *L. peruvianum*, enquanto que o pólen de *L. peruvianum* germina normalmente no estigma de *L. esculentum*. De acordo com os autores, mecanismos distintos de

incompatibilidade que pode ser gametofítica ou esporofítica impedem esta hibridação.

Em *Capsicum*, Onus e Pickersgill (2004) observaram que em cruzamentos envolvendo a espécie *C. pubescens* com espécies do complexo *pubescens* e de outros complexos, a germinação do pólen, o crescimento do tubo polínico até sua chegada ao ovário foram verificados em um período de aproximadamente 24 horas. Resultados semelhantes foram observados por Yoon (2006) em híbridos entre *C. baccatum* x *C. annuum*, em que a polinização foi efetiva, mas o híbrido mostrou-se estéril devido ao comportamento anormal dos cromossomos na meiose.

Além dos problemas de incompatibilidade, existem fatores extrínsecos que comprometem o desenvolvimento do tubo polínico. Segundo Silva *et al.* (1999), os resíduos da pulverização de agrotóxicos presentes na superfície da planta, ao entrar em contato com os grãos de pólen ou estigma, podem reduzir e até mesmo inibir a germinação dos grãos de pólen. A mesma observação é feita por Lacerda *et al.* (1994), que afirmam que certos agrotóxicos interferem na viabilidade do grão de pólen e germinação do tubo polínico tanto *in vitro* como *in vivo*.

O estresse térmico também pode ser considerado um fator de interferência à germinação do tubo polínico. Para Stevens e Rudich (1978), a exposição a temperaturas acima de 34°C na época de germinação do grão de pólen de tomate provoca redução na porcentagem de germinação e na taxa de crescimento do tubo polínico. Silva *et al.* (2000), avaliando a viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro, constataram que a germinação do pólen e o comprimento do tubo polínico diminuíram significativamente com o aumento da temperatura.

## **2.8. MARCADORES MOLECULARES**

Os marcadores moleculares são definidos como elementos capazes de prever, mapear e caracterizar um fenótipo (Guimarães e Moreira, 1999). As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados marcadores moleculares, podendo auxiliar o melhoramento de plantas, pois possibilitam acessar diretamente o genótipo de um indivíduo.



De acordo com Milach (2002), os marcadores podem auxiliar no melhoramento de plantas, em termos de variabilidade genética, pois permitem compreender e organizar a variabilidade genética de um programa de melhoramento de forma única, ou seja, acessando a variabilidade do DNA que não é influenciado pelo ambiente. A primeira consequência disso é a possibilidade de planejar os cruzamentos de um programa de forma a maximizar as diferenças genéticas entre os genótipos elites; a segunda é a possibilidade de organizar o germoplasma do programa em complexo gênico, facilitando a escolha e diminuindo o número de combinações a serem feitas pelo melhorista. Ainda de acordo com Milach (2002), marcadores moleculares podem ser empregados também na seleção de características de interesse, sendo necessário primeiro identificar marcadores associados a essas características através do mapeamento molecular.

Os marcadores podem, conforme a metodologia utilizada para identificá-los, ser classificados em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA. O marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é um tipo de marcador codominante que se baseia na hibridização de sondas com DNA genômico cortado por enzimas de restrição (Botstein *et al.*, 1980). Os marcadores RAPD, SCAR, STS, SNP, microssatélite (SSR) e AFLP (Williams *et al.*, 1990; Paran e Michelmore, 1993; Litt e Luty, 1989; Vos *et al.*, 1995) são revelados por amplificação. De acordo com Vos *et al.* (1995), a técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) é uma classe recente de marcadores que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade da amplificação do PCR, apresentando-se como uma ferramenta poderosa na caracterização de genomas e no mapeamento genético. Os Microssatélites também denominados SSR (*Simple Sequence Repeats*) são formados por seqüências de uma a seis bases de comprimento repetidas em “tandem” (Jacob *et al.*, 1991). São altamente polimórficos, multialélicos e extremamente úteis em estudos de genética. Marcadores SCAR (*Sequence characterized Amplified Regions*) são amplificados com “primers” específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (Paran e Michelmore, 1993). Muitos desses “primers” são obtidos da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Brookes (1999) afirma que SNP (*Single nucleotide polymorphism*) é um tipo de marcador molecular capaz

de diferenciar indivíduos através de variações em apenas um nucleotídeo, detectadas em seqüências de DNA que codificam genes ou não.

Os RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) consistem em um dos marcadores moleculares mais usados em estudos genéticos (Oliveira *et al.*, 2001). O polimorfismo dos marcadores RAPD é revelado pela amplificação de locos cromossômicos usando-se iniciadores (*primers*) compostos de seqüências curtas de oligonucleotídeos. Na reação de amplificação, esses iniciadores, quando submetidos a condições apropriadas de temperatura se hibridizam com seqüências genômicas que lhes são complementares.

De acordo com Chaves (2002), marcadores RAPD, em geral, apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, possuem uma boa capacidade multiplex (amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo), identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (dois alelos, amplificado e não amplificado). Apresenta-se como uma técnica de boa aceitação para análises relacionadas à diferenciação de linhagens, estimativa de variabilidade em bancos de germoplasma, estudo de estrutura genética de populações, estimativa de parâmetros genéticos, estudos de duplicação de acessos em bancos de germoplasma, análise de paternidade, entre outras aplicações.

As vantagens desse processo são que os mesmos “primers” podem ser usados em vários organismos, a análise é realizada em gel de agarose, os resultados são rápidos, não requer sondas isoladas, apresentam alta sensibilidade (baixa quantidade de DNA) e baixo custo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). As desvantagens relacionam-se à reprodutibilidade dos resultados, ambigüidade na interpretação das bandas, co-migração de fragmentos de igual ou de tamanho muito próximos e ao caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (Cruz e Milach, 1998; Ferreira e Grattapaglia, 1998). No entanto, em seus estudos sobre marcadores, Oliveira *et al.* (2001) relatam que a questão da baixa reprodutibilidade dos marcadores RAPD é bastante questionável.

Devido a suas vantagens, RAPDs têm sido empregados, com êxito, na maioria das culturas, com as mais diversas aplicações, demonstrando eficácia nos resultados. A literatura relata uma grande diversidade de trabalhos na cultura de *Capsicum*, usando a técnica RAPD. Parte significativa desses trabalhos são

relativos à caracterização da divergência genética e monitoramento da introgressão de genes em programas de hibridação interespecífica.

Em *Capsicum*, os estudos utilizando marcadores têm sido importantes. Kang *et al.* (2001) utilizaram marcadores AFLP e RFLP na construção de um mapa de ligação a partir de uma população de híbridos (*C. annuum* x *C. chinense*). A partir desse estudo, pôde-se inferir sobre a presença de genes responsáveis pela biossíntese de carotenóides e capsaicinóides. Os autores concluíram que este mapa servirá possivelmente como base de estudos sobre metabólicos secundários em *Capsicum*.

Lin *et al.* (2000) utilizaram RAPD para identificar 49 cultivares de *C. annuum*. As pimentas doces e pimentas picantes puderam ser distinguidas pela análise de agrupamento usando a técnica RAPD, com exceção de dois cultivares, 'Peace Star' e 'Group Star'. De acordo com os autores, a variação morfológica observada nas pimentas pôde ser relacionada com a variação detectada pelo RAPD.

Oyama *et al.* (2006) realizaram trabalho sobre o nível de variação na estrutura genética de 15 populações silvestres e três populações domesticadas de *C. annuum* utilizando metodologia RAPD. Para os autores, a considerável distância genética entre cultivares, como também o alto número de bandas diagnosticadas por cultivar, variando de 33 a 126, sugerem que mudanças genéticas associadas a domesticação poderiam ter sido o resultado da seleção artificial, intervindo em diferentes direções.

Lins *et al.* (2001) fizeram análise da diversidade genética entre acessos de *Capsicum* utilizando marcadores moleculares. O trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de variedades cultivadas de pimenta e pimentão conservados no Banco de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. Padrões de amplificação de DNA de diferentes acessos foram analisados em centenas de locos distribuídos ao acaso por todo o genoma através da técnica RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), com isso foi possível classificar eficientemente os acessos do Banco de Germoplasma de *Capsicum*.

Paran *et al.* (1998) estudaram a variação revelada através de marcadores RAPD e AFLP em 34 tipos de pimenta (*C. annuum*), onde foi possível a separação de pimentas doces e pungentes. Rodriguez *et al.* (1999) caracterizaram 134 acessos oriundos de seis espécies de *Capsicum* e

provenientes do banco genético do AVRDC na Ásia a partir de marcadores moleculares RAPD.

Votava *et al.* (2005) trabalharam com marcadores RAPD para comparar a diversidade genética entre pimentas nativas do México e cultivares de valor comercial dos Estados Unidos. Costa *et al.* (2006) avaliaram, utilizando marcadores RAPD, a diversidade genética entre 70 acessos de *Capsicum*, entre e dentro das espécies, com o objetivo identificar os acessos, verificar a presença de duplicatas, além de verificar a concordância dos resultados moleculares de 53 acessos, com os dados botânicos e a caracterização morfo-agronômica obtidas por Sudré (2005). A análise dos resultados revelou a alta variabilidade contida na coleção, permitindo associar o grau de similaridade genética obtido por marcadores de DNA, com a caracterização botânica e morfológica compartilhados entre os acessos.

A ratificação de que determinados cruzamentos interespecíficos obtiveram êxito também se destacam como uma das aplicações efetivas do uso de marcadores moleculares. De acordo com Alzate-Marín *et al.* (1996), a confirmação da fecundação cruzada pode ser feita por meio de características de natureza dominante e de fácil visualização que sejam contrastantes entre as espécies envolvidas (genes marcadores). No entanto, na ausência de tais características, na impossibilidade de avaliação das mesmas rapidamente, ou em determinada fase da planta, marcadores de DNA têm sido utilizados com comprovado efeito.

Estimativas da diversidade genética e grau de parentesco de genótipos de feijão a partir de marcadores RAPD foram obtidas por Skroch e Nienhuis (1995), enquanto Silva *et al.* (2005) estudaram a diversidade genética e identificação de híbridos em feijão-de-vagem, com o mesmo marcador. Alzate-Marín *et al.* (1996) em análise de cruzamentos de soja e feijão, afirmaram que marcadores RAPD mostraram-se eficientes na discriminação e identificação de híbridos.

Tong e Bosland (1999) utilizaram marcadores RAPD para identificar híbridos F<sub>1</sub> provenientes do cruzamento entre *C. baccatum* x *C. tovarri* observando que os marcadores mostraram-se como ferramenta eficiente para distinguir as espécies e confirmar os híbridos interespecíficos pela presença de bandas informativas.

Yoon *et al.* (2006) realizaram cruzamentos interespecíficos entre as espécies *C. annuum* e *C. baccatum*. Os autores identificaram as plantas híbridas através de caracteres morfológicos e através da presença de bandas em análises RAPD. Todas as bandas amplificadas de DNA oriundas do genitor 1 (*C. annuum*) e do genitor 2 (*C. baccatum*) foram, do mesmo modo, claramente amplificadas no híbrido interespecífico.

Em adição, a literatura também cita trabalhos onde marcadores RAPD são usados para teste de pureza em sementes híbridas de pimenta e identificação de genótipos resistentes a determinadas doenças (Arnedo-Andrés *et al.*, 2002). Ballester e Vicente (1998) testaram marcadores RAPD como ferramenta para determinação da pureza de sementes híbridas em *Capsicum*. Cinco híbridos e seus pais foram analisados e foi encontrado um marcador útil para teste de pureza para todos os híbridos estudados. Os autores concluíram que apesar de apresentarem-se como marcadores dominantes, RAPDs podem ser implementados eficientemente no processo de teste de qualidade de sementes híbridas. Mongkolporn e Dokmaihom (2004) determinaram a pureza genética de três pimentas híbridas F<sub>1</sub> usando duas técnicas de marcadores moleculares, RAPD e SSR. Análise de RAPD revelou eficazmente todos os três híbridos F<sub>1</sub>, enquanto SSR revelou somente dois. Os autores afirmam que a possível explicação está relacionado ao fato de RAPDs produzirem maior número de marcadores que o marcador SSR.

Diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação de híbridos, desde as baseadas em caracteres morfológicos, análises bioquímicas com sistemas isoenzimáticos (Abdullah *et al.*, 1979), bandeamento cromossômico (Soares Filho *et al.*, 1997), entre outros. A utilização de todas as técnicas disponíveis tem vantagens e desvantagens para cada tipo de análise. No entanto, os resultados com qualquer técnica baseada em DNA é mais conclusiva do que apenas as características morfológicas, pois estas podem ser afetadas pelo ambiente enquanto os procedimentos baseados em marcadores moleculares não o são. Além disso, com o avanço das técnicas moleculares, os marcadores tornam-se cada vez mais eficientes, com grande precisão de análises e rapidez nos resultados, o que influencia fortemente na escolha dessa metodologia pela maioria dos pesquisadores.

### **3. TRABALHOS**

### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM *Capsicum* ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

#### 3.1.1 RESUMO

Incorporados aos programas de melhoramento a partir dos anos oitenta, os marcadores moleculares têm sido considerados ferramentas poderosas com distintas aplicações, dentre elas, identificação de linhagens, cultivares e híbridos. Este trabalho teve como objetivo validar a natureza híbrida, através de metodologia molecular, de cinquenta combinações resultantes de hibridação artificial envolvendo quatro espécies de *Capsicum* (*annuum*, *baccatum*, *chinense* e *frutescens*). Os marcadores moleculares gerados pelos diferentes *primers* foram analisados quanto à presença ou não de bandas informativas para a confirmação da fecundação cruzada. A detecção de polimorfismo molecular obtido pelo uso do marcador RAPD permitiu a identificação de quarenta e três genótipos híbridos. Os resultados demonstraram que é possível, a partir de marcadores RAPD, a identificação de híbridos interespecíficos, podendo esses serem utilizados como uma ratificação à análise morfológica ou para casos onde a avaliação dos mesmos seja complexa.

### 3.1.2 ABSTRACT

Molecular markers were incorporated in breeding programs in early eighties. The technique has been considered a powerful tool with different applications as the identification of lines, cultivars and hybrids. The objective of this research was to validate, using RAPD markers, fifty genotypes obtained by artificial hybridization among four species of *Capsicum* (*annuum annuum*, *annuum glabriusculum*, *baccatum baccatum*, *baccatum pendulum*, *chinense* and *frutescens*). The molecular bands generated were analyzed for presence or absence of informative bands for the confirmation of hybrids nature of the crosses. The detection of molecular polymorphisms allowed the identification of forty three hybrid plants. The results demonstrate that, it is possible by using RAPD molecular markers to identify interspecific hybrids and they can be used for the confirmation of the identification by morphological markers, or for cases, where the evaluation of the same ones be complex.



### 3.1.3 INTRODUÇÃO

Diversos marcadores moleculares têm sido empregados no melhoramento genético das mais diferentes culturas, permitindo análises mais completas e consistentes de sua natureza genética (Rodríguez *et al.*, 1999). Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso (RAPD) constituem-se como eficientes marcadores, sendo largamente utilizados por serem tecnicamente acessíveis e possuírem ampla capacidade em detectar diferenças entre genótipos relacionados.

Marcadores RAPDs surgiram a partir do emprego de iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio da seqüência. O resultado dessa amplificação é essencialmente a geração de impressões digitais genômicas simples e reprodutíveis para a identificação de genótipos em gel de eletroforese. Lopes *et al.* (2002) relatam que em diferentes espécies, dados experimentais evidenciam que locos RAPD estão dispersos no genoma e que as seqüências internas dos segmentos amplificados abrangem desde cópia única até altamente repetitivas. Ferreira e Gattapaglia (1998) afirmaram que os marcadores moleculares permitem ao pesquisador um adequado conteúdo informativo, que associados aos dados fenotípicos, complementam resultados desejados em estudos relacionados ao melhoramento de plantas.

Técnicas de RAPD têm sido usadas com os mais diversos objetivos, como o monitoramento da introgressão de genes em programas de hibridação interespecífica, caracterização molecular do nível de diversidade genética, estimação da distância genética entre indivíduos relacionados, construção de mapas genéticos, identificação de locos relacionados aos caracteres quantitativos, entre outros (Ferreira e Gattapaglia, 1998).

A identificação de híbridos a partir de tecnologia molecular RAPD tem sido pesquisada por diversos autores e empregada em várias culturas (Skroch e Nienhuis 1995; Magdalita *et al.*, 1997; Faleiro *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005). Especificamente em *Capsicum*, os marcadores mostraram-se como ferramenta eficiente para distinguir as espécies e validar os híbridos interespecíficos pela presença de bandas informativas (Tong e Bosland, 1999; Arnedo-Andrés *et al.*, 2002; Mongkolporn e Dokmaihom, 2004; Yoon *et al.*, 2006). Trata-se de uma metodologia segura, eficaz e altamente conclusiva.

Alzate-Marín *et al.* (1996) relataram que, no caso de genótipos híbridos, a confirmação da fecundação cruzada pode ser feita por meio de características de natureza dominante e de fácil visualização que sejam contrastantes entre as espécies envolvidas (genes marcadores). Porém, na ausência de tais características ou na impossibilidade de avaliação das mesmas rapidamente, ou em determinada fase da planta, marcadores de DNA têm sido utilizados com relevante sucesso.

No presente estudo objetivou-se validar, a partir de dados moleculares gerados via marcadores RAPD, a natureza híbrida de cinquenta genótipos resultantes do cruzamento entre quatro espécies de *Capsicum*.

### 3.1.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.4.1 Material Genético Vegetal

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação localizada na Unidade de Apoio Técnico da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e na Estação Experimental PESAGRO em Campos dos Goytacazes/ RJ.

Os híbridos experimentais foram obtidos a partir de cruzamentos manuais e controlados realizados em estufa. Para isso, flores na antese foram identificadas e no dia seguinte, pela manhã, anteras foram coletadas, os grãos de pólen retirados e com auxílio de um pincel, transferidos para o estigma da planta feminina receptora na qual foi realizada, anteriormente, a emasculação.

Após a polinização, os cruzamentos foram identificados com etiquetas constando o nome das espécies envolvidas. Vinte e quatro a quarenta e oito horas após a polinização, os cruzamentos foram observados para verificar o pegamento. Os frutos procedentes dos cruzamentos manuais foram colhidos maduros e as sementes híbridas foram extraídas manualmente, secas à temperatura ambiente e conservadas em geladeira, sendo posteriormente semeadas conforme recomendação para a cultura.

Foram analisados setenta e cinco genótipos destes, vinte e cinco referentes aos genitores procedentes do banco de germoplasma da UENF (Tabela 1) e os cinquenta restantes são possíveis híbridos resultantes do cruzamento artificial envolvendo as espécies de *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*.

**Tabela 1.** Acessos representantes das espécies de *Capsicum* utilizados como genitores em cruzamentos interespecíficos.

Nº	UENF	Espécie	Variedade/Cultivar	Procedência
1	1562	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
2	1565	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
3	1567	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
4	1569	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
5	1381	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	PESAGRO/Itaguaí
6	1503	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
7	1578	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
8	1575	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta Ornamental	Campos, RJ
9	1559	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	C. Macacu, RJ
10	1576	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	Rio das Ostras-RJ
11	1555	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
12	1585	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Parintins, AM
13	1553	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
14	1495	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
15	1584	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Rio das Ostras, RJ
16	1489	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
17	1492	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
18	1496	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
19	1573	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Duas Barras, RJ
20	1490	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
21	1500	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
22	1425	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos RJ
23	1561	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos RJ
24	1560	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	C Macacu-RJ
25	1557	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Goiânia-GO

### 3.1.4.2 Extração do DNA e Obtenção de Marcadores RAPD

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LMGV/CCTA/UENF) em Campos dos Goytacazes, RJ.

O DNA genômico dos acessos foi extraído usando a metodologia de Doyle e Doyle (1987) com pequenas alterações. Cerca de 15 folhas imaturas de cada material genético foram coletadas, identificadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -70° C. Posteriormente, os acessos foram macerados e transferidos para microtubos Eppendorf de 2,0 mL devidamente identificados. Foram adicionados 1000 µl de tampão de extração (CTAB em concentração final de 1%, NaCl - 1,4M, EDTA - 20mM, Tris-HCl (pH8) - 1%, PVP sólido - 100mM, β-Mercaptoetanol - 0,1% e água), sendo, posteriormente, incubados a 65°C por 40 minutos. Os tubos foram agitados por 10

minutos durante a incubação, resfriados e centrifugados a 14.000 rpm por cinco minutos, transferindo-se o sobrenadante para novos microtubos identificados.

Para executar a desproteinização foram realizadas três extrações orgânicas com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Nas três extrações, acrescentou-se 900 µL de solvente, centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 min e recolheu-se o sobrenadante. O DNA foi precipitado da fase aquosa ao final da extração pela adição de igual volume de álcool isopropílico para uma concentração final de 0,3 M. As amostras foram mantidas em freezer (-20°C) por 12h. A sedimentação foi feita por centrifugação a 14.000 rpm por 10 min. O DNA foi lavado com álcool etílico 70% e 95%, deixados à temperatura ambiente por 20 minutos para secagem e então ressuspensas em 200 µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase na concentração final de 4,0 µL/ml. Incubou-se as amostras a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, adicionou-se 40 µL de NaCl (2,5M) na proporção de 1:10 (NaCl : DNA ressuspensão) e 2/3 de isopropanol gelado aos tubos (160 µL) que foram mantidos a 4°C durante 12 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm, lavadas com etanol, desidratadas e ressuspensas em volume final de 100 µL de água mili Q.

Foram executadas reações de amplificação em volume final de 24µL que continham, em concentração final, água q.s.p - 20 µL, solução tampão TE - 10X, Mg Cl<sub>2</sub> - 2mM, DNTP - 100 µM, enzima Taq DNA polimerase - 1U, DNA genômico - 10ng e 0,4µM de oligonucleotídeos decâmeros de seqüência aleatória (*primers*) da Operon Technologies Biodynamics and Genosys.

As reações foram feitas de acordo com Williams *et al.* (1990), sendo realizadas em termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 com blocos para tubos de 0,5 mL programados para 45 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 36°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão de 10 minutos a 72°C.

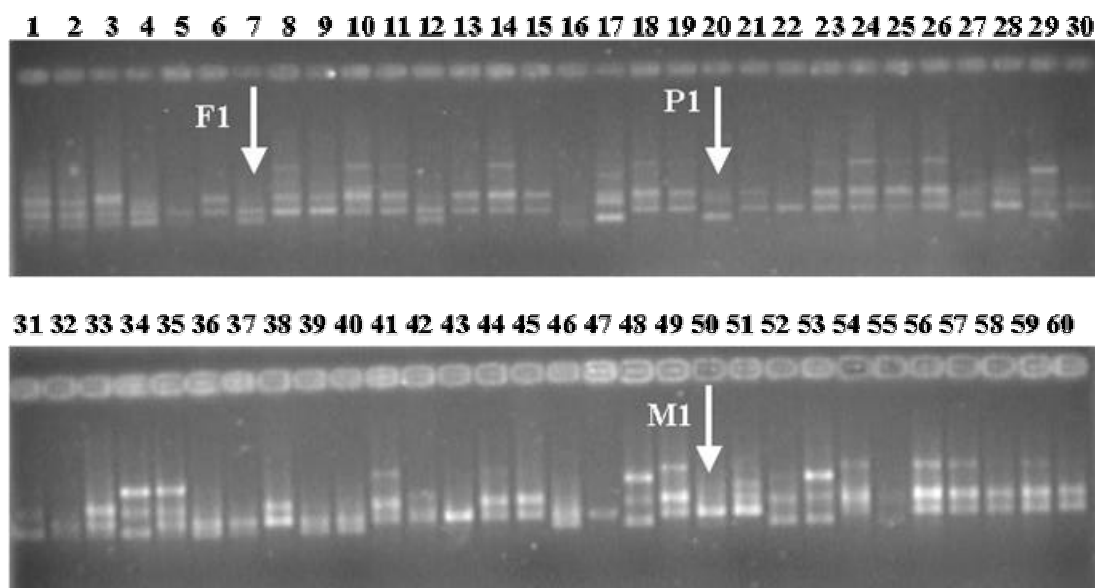
A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese conduzida a uma corrente de 100 v por 2 horas. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5%, que posteriormente foi corado em brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em um sistema de fotodocumentação Eagle Eye II. Os *primers* OPAB01, OPAB02, OPAB03, OPAB04, OPAB05, OPAB06, OPAB07, OPAB09, OPAB10, OPAB11, OPAB12, OPAB13, OPAVO6, OPE01, E06, K06, C12, C13, C14, C15, C18, AE02, AEO3,

AE01, OPV05, OPD20, OPR19, OPB12, OPP13, OPAE05, OPAE06, OPW19 de seqüência arbitrária de dez nucleotídeos da Operon Technologies, Biodynamics and Genosys foram utilizados na amplificação para identificação dos genótipos.

### 3.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para identificação dos híbridos empregou-se a análise dos genótipos (parentais e híbridos) baseando-se na presença (1), ausência (0) ou perda de dados (2) de cada fragmento específico de DNA amplificado, gerado por 15 *primers* da Operon Technologies Inc. (OPAB01, OPAB02, OPAB03, OPAB04, OPAB05, OPAB06, OPAB09, OPB12, OPAV06, OPE01, OPE06, OPK06, OPC14, OPAE02 e OPAEO3) que demonstraram resultados consistentes. Considerou-se como bandas informativas somente aquelas com alta nitidez e ampla intensidade. As bandas informativas representam alelos presentes no genitor masculino e ausentes no feminino, cuja presença nas plantas supostamente híbridas confirmam a fecundação cruzada (Tabela 2). Para todas as cinquenta combinações foi observado se as bandas de DNA amplificadas no genitor materno e no genitor paterno foram também claramente amplificadas no híbrido F<sub>1</sub>. Ausência de fragmentos em um genótipo tido como híbrido caracteriza-se, possivelmente, como autofecundação.

Na análise de marcadores RAPD, os 15 *primers* utilizados geraram produtos amplificados (bandas), com o número de fragmentos produzidos, variando de duas a cinco bandas nítidas. Considerando a presença da marca que identifica os genótipos é possível verificar na Figura 1, a presença de banda que caracteriza o cruzamento entre as espécies *C. baccatum* x *C. frutescens*, sendo o acesso 1489 (*C. baccatum*) o genitor feminino representado na Figura 1 pelo número 50, o acesso *C. frutescens* (1561) doador de pólen, identificado pelo número 20, e o híbrido interespecífico contendo a banda informativa do parental masculino, representado pelo número 7.



**Figura 1.** Produtos de amplificação entre genitores e híbridos gerados pelo *primer* OPAB02. **M1**- genitor materno, UENF1489, N° 50 **P1** - genitor paterno, UENF 1561, N° 20 **F1**-híbrido (UENF1489 X UENF1561), N° 7.

A validação da natureza híbrida a partir de bandas informativas é uma alternativa viável relatada por muitos autores, pois o cruzamento entre diferentes espécies e a introgressão de genes de espécies silvestres em espécies cultivadas apresenta importantes implicações no melhoramento de plantas. Alzate-Marín *et al.* (1996) propuseram uma metodologia para confirmar a fecundação cruzada entre cultivares de feijão e soja com base na amplificação de uma banda RAPD informativa para cada cruzamento. Silva *et al.* (2005) identificaram cruzamentos entre genótipos de feijoeiro através da presença e ausência de fragmentos (bandas) em 150 indivíduos. Yoon *et al.* (2006) realizaram cruzamentos interespecíficos entre as espécies *C. annuum* e *C. baccatum*, identificando plantas híbridas através de caracteres morfológicos e da presença de bandas em análises RAPD. Os autores relataram que todas as bandas amplificadas de DNA de *C. annuum* e de *C. baccatum* foram, do mesmo modo, claramente amplificadas no híbrido interespecífico.

De acordo com Borém (1997), presume-se que cada banda informativa funcione como um gene marcador comumente utilizado pelos melhoristas. Faleiro *et al.* (2003) afirmaram que o uso de um ou dois *primers* ou combinações de *primers* com pelo menos uma banda informativa é suficiente para confirmar ou não a ocorrência de hibridação.



As espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum* proporcionaram cruzamentos efetivos que referiram-se a cinquenta combinações, onde quarenta e três apresentaram caráter híbrido, confirmando a existência de compatibilidade de cruzamentos entre os acessos. Os demais genótipos são provavelmente resultados de uma autofecundação. Nesta análise, observou-se que em dois cruzamentos entre as espécies *C. annuum* e *C. baccatum*, acessos UENF1575 x UENF1573 e UENF1567 x UENF1573, e um entre *C. annuum* x *C. frutescens*, representados pelos acessos UENF1503 e UENF1425, respectivamente, não foram observadas bandas polimórficas, sugerindo que se trata de uma autofecundação (Tabela 2).

Com relação aos cruzamentos realizados entre a espécie *C. frutescens*, genitor feminino e as espécies *C. baccatum* e *C. annuum*, três cruzamentos não foram validados, sendo eles, UENF1425 x UENF1590, UENF1560 x UENF1559 e UENF1425 x UENF1503. Constatou-se também que no cruzamento UENF1553 x UENF1425, entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens*, não foram encontradas bandas informativas com nenhum *primer* testado.

As informações obtidas neste estudo, para os acessos pesquisados, mostraram que a espécie *C. chinense* quando polinizada pelas espécies *C. annuum* e *C. frutescens* não revela problemas de incompatibilidade. Para Eshbaugh (1983), os componentes do grupo *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* mostram-se geneticamente próximos entre si e distintos do grupo *C. baccatum*, o que pode supostamente facilitar ou dificultar determinados cruzamentos.

A ocorrência do cruzamento entre *C. annuum* e *C. frutescens*, em ambas as direções, foi comprovada, mostrando resultados semelhantes à Smith e Heiser (1951), que em suas pesquisas, demonstraram que cruzamentos entre as espécies *C. annuum* e *C. frutescens* são bem sucedidos. De acordo com Choong (1998), as espécies de *Capsicum* foram caracterizadas de acordo com a estrutura dos cromossomos, bandeamento isoenzimático e polimorfismo de DNA cloroplástico, formando complexos distintos. Ainda de acordo com o autor, cruzamentos interespecíficos entre espécies de um mesmo complexo são relativamente fáceis de ocorrer, no entanto, em cruzamentos envolvendo espécies de diferentes grupos, podem ocorrer barreiras de pré e pós-fertilização, inviabilizando o híbrido.

Nesse estudo foi confirmado a possibilidade de cruzamentos interespecíficos entre espécies de complexos distintos, contrariando dados da literatura os quais descrevem que híbridos interespecíficos entre complexos *annuum* e *baccatum*, somente são obtidos usando tratamentos especiais, tais como, técnica de resgate de embrião (Smith e Heiser 1951; Yang, 2001; Yoon *et al.*, 2006). A obtenção de determinadas combinações híbridas em espécies de *Capsicum* e sua confirmação a partir de marcadores moleculares caracteriza-se como um procedimento apropriado para a identificação de acessos parentais que abrigam uma série de características interessantes, particularmente resistência a doenças.

**Tabela 2.** Resultado das ampliações obtidas com a utilização de 15 *primers* decâmeros para marcadores RAPD.

Nº	Acesso Materno	Acesso Paterno	NBP*	Nº	Acesso Materno	Acesso Paterno	NBP
1	1496	1561	4	26	1492	1425	3
2	1496	1562	3	27	1425	1573	3
3	1496	1561	3	28	1585	1557	4
4	1489	1561	7	29	1569	1557	3
5	1500	1576	6	30	1578	1573	3
6	1573	1555	3	31	1560	1559	0
7	1381	1489	3	32	1567	1573	3
8	1565	1489	3	33	1567	1496	3
9	1553	1425	0	34	1569	1557	3
10	1489	1569	3	35	1503	1425	0
11	1425	1503	0	36	1585	1557	5
12	1503	1425	3	37	1567	1496	3
13	1575	1573	0	38	1489	1560	3
14	1567	1573	0	39	1555	1503	3
15	1500	1576	5	40	1425	1490	0
16	1425	1576	3	41	1425	1565	3
17	1496	1562	3	42	1569	1557	3
18	1578	1573	3	43	1489	1560	3
19	1496	1561	3	44	1560	1559	4
20	1495	1575	2	45	1503	1555	4
21	1584	1562	6	46	1489	1561	5
22	1573	1555	3	47	1489	1561	3
23	1425	1490	3	48	1555	1503	3
24	1575	1555	3	49	1578	1553	3
25	1381	1489	2	50	1585	1557	3

\*NBP= Número de bandas polimórficas

Acredita-se que procedimentos moleculares são mais conclusivos do que apenas características morfológicas, pois essas podem ser afetadas pelo

ambiente, descaracterizando os resultados. O fato de uma grande parte dos caracteres morfológicos de diferentes culturas apresentarem herança aditiva e serem poligênicos pode dificultar a identificação dos híbridos em caráter morfológico. Além desse aspecto, em algumas culturas como citrus por exemplo, podem ser obtidos híbridos muito semelhantes ao parental feminino mesmo quando os parentais são distintos morfológicamente o que pode dificultar a interpretação de determinadas avaliações (Ballve *et al.*, 1991).

Portanto, nessa análise, verifica-se que é possível através de dados moleculares, validar a fecundação cruzada entre espécies de *Capsicum*, sendo, portanto, a aplicabilidade de marcadores RAPD em distinguir genótipos híbridos e autofecundados, uma metodologia inequívoca e comprovadamente eficaz.

### 3.1.6 CONCLUSÕES

Comprovou-se que os cruzamentos entre as quatro diferentes espécies, *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* são, para as condições do presente estudo, claramente possíveis, presumindo que em programas de melhoramento é viável a obtenção de sementes férteis F<sub>1</sub>, obtidas inclusive de cruzamentos entre acessos de *C. baccatum* com as espécies *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*.

Os marcadores RAPD mostraram se como uma ferramenta relevante para verificar a ocorrência da fecundação cruzada entre espécies de *Capsicum*, apresentando-se como uma metodologia confiável, rápida, que permite a confirmação da hibridação em estágios iniciais de desenvolvimento, podendo ser utilizada para cruzamentos que não possuam genes marcadores ou para casos onde a análise dos mesmos seja difícil, demorada ou possível em apenas alguma fase da planta.

### 3.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S.; MARTINS FILHO, S.; PAULA JUNIOR, T. J. de.; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E. G. de.; MOREIRA, M. A. (1996). Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. *Brazilian Journal of Genetics*, Ribeirão Preto, v.19, n.4, p.621-623, 1996.

ARNEDO-ANDRES, S.; GIL- ORTEGA, R.; LUIS-ARTEAGA, M.; HORMAZA, I. (2002). Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 105(6-7), p. 1067-1074, Nov.2002.

BALLVE, R.M.L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H. P. M.; SIQUEIRA, W. J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. T.; POMPEU JÚNIOR, J. (1991). Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v. 50, n.1, p.57-76, 1991.

BORÉM, A. (1997). *Melhoramento de Plantas*. Viçosa, UFV. 1997.547p.

CHOONG, C. Y. (1998). DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in *Capsicum*. 1998. PhD Thesis, University of Reading, 1998.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

ESHBAUGH, W. H. (1983). The genus *Capsicum* in Africa. *Bothalia*. v.14, n. 3-4, p. 845-848. mar./abr.1983.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. (2003). Uso de Marcadores Moleculares RAPD e Microssatélites Visando a Confirmação da Fecundação Cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. *Agrotrópica*. Ilhéus, v. 15 (1), p. 41–46, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A. C.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIERA, M. L. C. (2002). Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP) Aspectos Técnicos e Interpretação Genética. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 29, p.23-27, 2002.

MAGDALITA, P.M.; DREW, R.A.; ADKINS, S.W.; GODWIN, I.D.(1997). Morphological, molecular and cytological analyses of *carica papaya* x *C. cauliflora* interespecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 95, p. 224-229, 1997.

MONGKOLPORN O.; DOKMAIHOM Y. (2004). Genetic purity test of F1 hybrid *Capsicum* using molecular analysis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 79, n. 3, p. 449-451(3), May 2004.

RODRÍGUEZ, J. M.; BERKE, T.; ENGLE, L.; NIENHUIS, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 99, p. 147-156, 1999.

SILVA, M. P. da.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F. I.; POSSE, S. C. P.(2005). Genetic diversity studies and hybrid identification in snap bean assisted by RAPD markers. *Acta Science Agronomy*, Maringá, v. 27, n. 3, p. 531-539, July./Sept.2005.

SMITH, P.G. HEISER C. B. (1951). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *C. annuum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany*, Toronto, p. 62-68, 1951

SKROCH, P. W.; NIENHUIS, J. (1995). Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 91, n. 6-7, p. 1078 – 1085, November. 1995.

TONG, N.; BOSLAND, P. W. (1999). *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, Wageningen, v. 109, p. 71-77, agosto.1999.

YANG, D. C. (2001). Interspecific hybridization for the breeding of anthracnose-resistant hot pepper lines. M.s thesis, Seoul National University, Korea, 2001.

YOON, J. B.; YANG, D. C.; DO, J. W.; PARK, H. G.(2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of Anthracnose Resistance. *Breeding Science*, Washington, v. 56, p. 31-38, 2006.

WILLIAMS J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK K. J.; RAFALSKI J. A AND TINGEY S. V (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535, 1990.

## 3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM *Capsicum*.

### 3.2.1 RESUMO

O gênero *Capsicum* é representado por cerca de 33 espécies e classifica-se como uma hortaliça de importância econômica em diversas regiões do mundo. A grande variabilidade do gênero permite sua utilização em programas de melhoramento que, a partir de cruzamentos interespecíficos, possibilita a introgressão de genes que conferem caracteres de importância, em variedades cultivadas. No entanto, para que haja sucesso em cruzamentos interespecíficos é necessário que as espécies sejam geneticamente relacionadas. Cruzamentos, incluindo os recíprocos, foram realizados entre 36 acessos representantes das espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. pubescens*. Resultados demonstraram que cruzamentos entre as espécies *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. annuum* x *C. frutescens* e *C. baccatum* x *C. frutescens* foram as combinações mais efetivas para produção de frutos com sementes viáveis. Os cruzamentos, incluindo os recíprocos, *C. baccatum* x *C. chinense* e *C. frutescens* x *C. chinense* foram os que proporcionaram menor número de frutos híbridos, apresentando ou não sementes viáveis. Em todas as combinações entre *C. pubescens* e as demais espécies não houve a formação de frutos. Os híbridos obtidos tiveram sua natureza híbrida validada por marcadores RAPD e foram caracterizados morfológicamente.



### 3.2.2 ABSTRACT

The genus *Capsicum* with its about 33 species represents an economically important vegetable in different regions of the world. The great variability in the genus allows for breeding programs which, based on interspecific crosses, make the introgression of genes possible that convey traits of importance into cultivated varieties. However, for successful interspecific crosses the species must be genetically related. The crosses, including the reciprocal, were performed with 36 representative accessions of the species *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense* and *C. pubescens*. Results demonstrated that crosses of the species *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. annuum* x *C. frutescens* and *C. baccatum* x *C. frutescens* were the most effective combinations for fruit production with viable seeds. The crosses, including the reciprocal, of *C. baccatum* x *C. chinense* and *C. frutescens* x *C. chinense* provided the lowest number of hybrid fruits, of which some did and some did not produce viable seeds. No fruit formation occurred in any of the combinations of *C. pubescens* with other species. The hybrid nature of the established plants was validated by RAPD markers and characterized morphologically.

### 3.2.3 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae e são cultivadas tanto em regiões de clima tropical como temperado, destacando-se como olerícolas importantes com elevado valor nutricional. Normalmente, além do consumo *in natura*, são usadas como condimentos desidratados, temperos, molhos processados, geléias e conservas. Segundo Moor (2003), seu cultivo é realizado por pequenos, médios e grandes produtores, individuais ou integrados às agroindústrias, e expande-se por todo o território brasileiro.

A variabilidade genética no gênero *Capsicum* é ampla, com vasta distribuição geográfica, compreendendo desde o Sul dos Estados Unidos, México, América Central, Bolívia, Argentina, Uruguai e Brasil. Atualmente existem registros de cerca de trinta e três espécies do gênero, no entanto, somente cinco são cultivadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum* e *Capsicum pubescens*. As demais são classificadas em semidomesticadas e silvestres (Moor, 2003), sendo algumas espécies silvestres como a *Capsicum praetermissum*, *Capsicum buforum* e *Capsicum schottianum*, nativas do Brasil (Casali e Couto, 1984).

A ocorrência de uma grande diversidade genética no gênero possibilita a utilização do germoplasma de *Capsicum* em programas de melhoramento, (Deshpande *et al.*, 1988), tendo como principal objetivo uma elevada produção de frutos, boa qualidade nutricional, adaptação a estresse ambiental e resistência a agentes fitopatogênicos (Bosland, 1996). De acordo com Xavier (1996), a importância da diversidade genética para o melhoramento reside no fato de que cruzamentos que envolvem progenitores geneticamente divergentes são os mais

convenientes para produzir alto efeito heterótico e, também, maior variabilidade genética em gerações segregantes.

Cruz e Carneiro (2003) afirmaram que a hibridação é uma das maneiras mais eficientes de explorar a variabilidade genética existente em muitas espécies. Segundo os autores, a hibridação interespecífica é importante porque permite a introgressão de genes de interesse em variedades ou linhagens, combinando, desse modo, o potencial genético das espécies. Em concordância, Ribeiro e Melo (2003) relataram que a compatibilidade de cruzamentos entre diferentes espécies de *Capsicum* é significativa, porque genes presentes em uma determinada espécie podem ser introduzidos em outras e com relativa facilidade e sucesso. Os autores citam como exemplo a introgressão de genes de resistência à *Phytophthora capsici*, presentes em acessos de *C. annuum*, em espécies domesticadas de *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum*, uma vez que não foram identificadas, até o momento, boas fontes de resistência a essa doença nessas espécies.

As limitações impostas ao desenvolvimento de híbridos dentro do gênero *Capsicum* estão relacionadas, principalmente, à baixa viabilidade de determinados cruzamentos. A literatura cita estudos envolvendo a produção de híbridos interespecíficos de *Capsicum* com diferentes comportamentos. Eshbaugh (1964) obteve híbridos parcialmente férteis quando realizou cruzamentos entre as espécies *C. frutescens* x *C. chinense*. Casali (1970) realizou cruzamentos entre as espécies *C. annuum* x *C. chinense*, *C. annuum* x *C. frutescens*, *C. annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* x *C. frutescens* e *C. chinense* x *C. baccatum* var. *pendulum* e observou que nas combinações *C. annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. chinense* x *C. baccatum* var. *pendulum* houve a formação do fruto, porém não ocorreu a germinação das sementes. Segundo o autor, híbridos obtidos no cruzamento de *C. annuum* x *C. chinense* e *C. annuum* x *C. frutescens* resultaram em plantas com baixa fertilidade, baixa germinação de sementes e morte precoce da planta híbrida. Entretanto, Ribeiro e Melo (2003), em seus estudos sobre a hibridação interespecífica entre *C. annuum* e *C. chinense*, visando à resistência a *P. capsici*, obtiveram híbridos viáveis em ambas direções do cruzamento.

Híbridos interespecíficos estéreis foram obtidos por Rao *et al.* (1992) em cruzamentos envolvendo as espécies *C. baccatum* x *C. frutescens*. Para

Pickersgill (1997), diferentes barreiras são formadas na ocorrência de cruzamentos interespecíficos. O autor afirma que híbridos constituídos pelas espécies *C. annuum* e *C. pubescens* não são viáveis devido à inibição do crescimento do tubo polínico, e que cruzamentos entre as espécies *C. pubescens* e *C. chinense* não ocorrem devido à degeneração do endosperma.

Acredita-se que a transferência de genes é limitada devido a diversos fatores, sendo os principais: incompatibilidade unilateral, aborto pós-fertilização, interações núcleo-citoplasma e macho esterilidade (Pickersgill, 1997). O conhecimento de diferenças em constituições genéticas dentro de grupos ou entre grupos de genótipos e as informações sobre a ocorrência e o efeito dessas barreiras são importantes e devem ser elucidados por auxiliarem no uso dos recursos genéticos existentes, como também na escolha de genitores para cruzamentos viáveis em programas de melhoramento.

Considerando os diferentes comportamentos descritos pela literatura entre cruzamentos de acessos representantes de espécies de *Capsicum*, este trabalho teve como objetivou-se a obtenção de híbridos entre cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, verificando a compatibilidade entre esses cruzamentos e caracterizando morfologicamente os híbridos F<sub>1</sub>.

### 3.2.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2.4.1 Material Genético Vegetal

O presente trabalho foi conduzido em área experimental da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF e na estação experimental da PESAGRO, localizados em Campos dos Goytacazes, região Norte do Estado do Rio de Janeiro.

Foram utilizados trinta e seis acessos de cinco espécies do gênero *Capsicum* que compõem a coleção de germoplasma da UENF: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (Tabela 1). Parte dos acessos foram selecionados com base em indicação de Sudré (2003), nos quais foi estudado a resistência à bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

**Tabela 1** Relação dos acessos provenientes do banco de germoplasma de *Capsicum* da UENF utilizados nos cruzamentos interespecíficos.

Nº	Nº UENF	Espécie	Variedade/Cultivar	Procedência
1	1562	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
2	1565	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
3	1382	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Itaguaí, RJ
4	1567	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
5	1569	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
6	1503	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
7	1381	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	Itaguaí, MG
8	1578	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
9	1502	<i>C. annuum var. annuum</i>	Pimenta	México
10	1575	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta Ornamental	Campos, RJ
11	1559	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	C. de Macacu, RJ
2	1576	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	Rio das Ostras, RJ
13	1497	<i>C. chinense Jacq.</i>	Pimenta	Coleta, RJ
14	1498	<i>C. chinense Jacq.</i>	Pimenta	Coleta, RJ
15	1424	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Campos, RJ
16	1555	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
17	1585	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Parintins, AM
18	1553	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
19	1417	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Lavras, MG
20	1495	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
21	1584	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Rio das Ostras, RJ
22	1489	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
23	1492	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
24	1496	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
25	1573	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Duas Barras, RJ
26	1426	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Campos, RJ
27	1490	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
28	1494	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
29	1500	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
30	1425	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos, RJ
31	1561	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos, RJ
32	1560	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	C. de Macabu, RJ
33	1491	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Coleta, RJ
34	1557	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Goiânia, GO
35	1588	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Parintins, AM
36	1574	<i>C. pubescens</i>	Pimenta	Piracicaba, USP

### 3.2.4.2 Obtenção dos Híbridos Interespecíficos

As sementes dos acessos foram distribuídas em bandejas de isopor e posteriormente transplantadas para vasos de 4,5 litros. Os tratos culturais foram realizados segundo recomendação para a cultura (Filgueira, 2000).

Os híbridos experimentais foram obtidos a partir de cruzamentos manuais e controlados realizados em estufa. Para isso, flores na antese foram identificadas

e no dia seguinte, pela manhã, anteras foram coletadas, os grãos de pólen retirados e com auxílio de um pincel, transferidos para o estigma da planta feminina receptora na qual foi realizada, anteriormente, a emasculação.

Após a polinização, os cruzamentos foram identificados com etiquetas constando o nome das espécies envolvidas. Vinte e quatro a quarenta e oito horas após a polinização, foi verificado o pegamento dos cruzamentos. Os frutos procedentes dos cruzamentos manuais foram colhidos maduros e as sementes híbridas foram extraídas manualmente, secas à temperatura ambiente e conservadas em geladeira, sendo posteriormente semeadas conforme recomendação para a cultura.

O material experimental constituído de 50 frutos obtidos das polinizações interespecíficas foi cultivado em duas localidades, sendo 16 progênies F<sub>1</sub> cultivadas em casa de vegetação na UAP/UENF e 34 em casa de vegetação na Estação Experimental da PESAGRO/Campos dos Goytacazes.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, com três repetições. Cada parcela foi constituída de dois vasos com uma planta, perfazendo um total de seis plantas por combinação. No experimento localizado na Pesagro, totalizaram-se 204 plantas e para os cultivados na UENF, 96 plantas. Utilizaram-se vasos de polietileno rígido, preenchidos com 4,5 litros de substrato, constituído de uma mistura de 1/4 de areia lavada, 1/4 de terra de subsolo e 2/4 de esterco bovino.

### **3.2.4.3 Caracterização Morfoagronômica dos Híbridos Interespecíficos**

Para a caracterização dos híbridos e dos genitores foram avaliados os seguintes descritores recomendados pelo IBPGR (1995).

#### **Sementes**

- Número de sementes por fruto (contagem do número total de sementes por 10 frutos).

-Cor da semente (palha, amarela ou marrom escuro).

#### **Flores**

- Número de flores por axila (uma, duas, três, muitas flores no rácimo, mas cada uma em uma axila individual).
- Posição da flor (pendente, intermediária ou ereta).
- Cor da corola (branco, amarelo claro, amarelo, amarelo esverdeado, roxo com a base branca, branca com a base púrpura, roxa e outra).
- Cor das anteras (branco, amarelo, azul pálido, azul, roxa e outro).

### **Fruto**

- Constricção anular na junção do cálice com o pedicelo (presente e ausente).
- Posição do fruto (declinado, intermediário ou ereto).
- Coloração do fruto no estágio intermediário (branco, amarelo, verde, alaranjado, roxo, roxo escuro e outro).
- Coloração do fruto no estágio maduro (branco, amarelo-limão, amarelo-laranja pálido, amarelo laranja, laranja pálido, laranja, vermelho claro, vermelho, vermelho escuro, roxo, marrom e vinho).
- Forma do fruto (alongado, ovulado, triangular, campanulado, quadrado, e sino).
- Epiderme do fruto (liso, semi-rugoso e rugoso).
- Peso de frutos por planta (somatório do peso de 10 frutos colhidos).
- Colo na base do fruto (presente e ausente).

### **Planta**

- Altura de planta (calculada em centímetros partir da inserção no solo até o ponto mais alto). Esse parâmetro se registra quando inicia-se a maturação dos frutos em 50% das plantas.
- Largura da planta (calculado em centímetros a partir do ponto mais largo).
- Número de dias para início do florescimento (a partir da semeadura – 50% das plantas com pelo menos uma flor aberta).
- Número de dias para frutificação (a partir da semeadura -50% das plantas com frutos).
- Hábito de crescimento (prostado, intermediário, ereto ou outro).
- Cor do caule (verde, verde com estrias roxas, roxo ou outro).



### 3.2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os híbridos obtidos nesse experimento foram validados a partir de análise molecular RAPD, comprovando, assim, a presença de genótipos não híbridos, e legitimando a natureza híbrida de 43 genótipos. Foram efetuados 514 cruzamentos manuais, onde foram obtidos 182 frutos com sementes inviáveis e 76 com sementes supostamente viáveis, sendo que, destes, apenas 50 desenvolveram-se após a semeadura.

Os resultados gerais demonstraram que foram obtidos híbridos em todas as combinações testadas, com exceção daquelas envolvendo a espécie *C. pubescens*. Porém, constatou-se que acessos pertencentes a uma mesma espécie, quando utilizados em cruzamentos interespecíficos, apresentaram graus diferentes de compatibilidade.

A Tabela 2 evidencia os cruzamentos realizados nos quais foi possível a obtenção de frutos com sementes. Analisando os resultados, verifica-se que em algumas combinações houve a produção de frutos com considerável número de sementes, no entanto, essas mostraram-se totalmente inviáveis. Morfologicamente, apresentaram características como a ausência de embrião, degeneração ou total ausência de endosperma, coloração escura e forma e tamanho anormal de acordo com as espécies cruzadas.

**Tabela 2** Cruzamentos interespecíficos entre as cinco espécies de *Capsicum* e percentual de formação de frutos.

<b>Cruzamentos interespecíficos</b>						
<b>Progenitor feminino</b>	<b>Progenitor masculino</b>	<b>Flores polinizadas</b>	<b>Frutos com sementes</b>		<b>Frutos sem sementes/ ou sementes inviáveis</b>	
		N°	N°	%	N°	%
<i>C. annuum</i>	<i>C. baccatum</i>	44	11	25,00	15	34,09
<i>C. baccatum</i>	<i>C. annuum</i>	51	11	21,57	15	29,41
<i>C. annuum</i>	<i>C. frutescens</i>	56	06	10,70	13	23,20
<i>C. frutescens</i>	<i>C. annuum</i>	29	07	24,13	14	48,27
<i>C. annuum</i>	<i>C. chinense</i>	50	05	10,00	11	22,00
<i>C. chinense</i>	<i>C. annuum</i>	29	04	13,79	13	44,82
<i>C. baccatum</i>	<i>C. frutescens</i>	77	10	12,34	17	20,98
<i>C. frutescens</i>	<i>C. baccatum</i>	40	05	12,50	21	52,50
<i>C. baccatum</i>	<i>C. chinense</i>	42	04	8,30	16	33,33
<i>C. chinense</i>	<i>C. baccatum</i>	27	03	11,11	16	59,25
<i>C. frutescens</i>	<i>C. chinense</i>	32	06	22,20	17	62,96
<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>	30	04	16,00	14	56,00
<i>C. pubescens</i>	<i>C. annuum</i>	3	0	0	0	0
<i>C. pubescens</i>	<i>C. baccatum</i>	2	0	0	0	0
<i>C. pubescens</i>	<i>C. chinense</i>	1	0	0	0	0
<i>C. pubescens</i>	<i>C. frutescens</i>	1	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>514</b>	<b>76</b>		<b>182</b>	

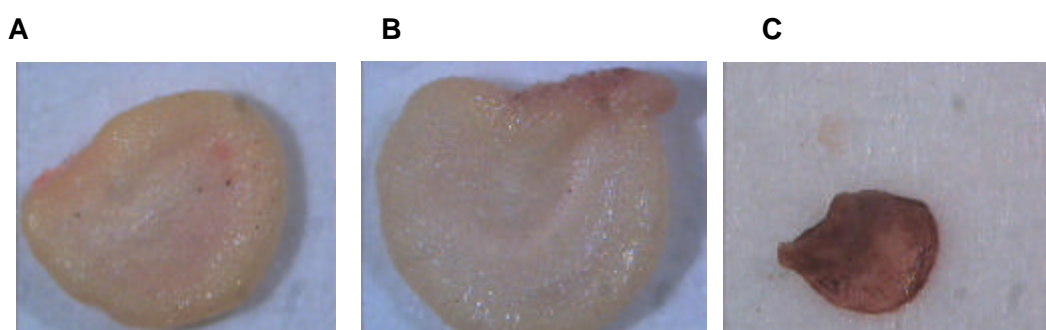
#### **Cruzamentos entre *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum***

No estudo geral da combinação *C. annuum* x *C. baccatum* foram obtidos vinte e seis frutos. Destes, onze produziram sementes viáveis e dez, após o plantio, tornaram-se plantas adultas. Os híbridos que atingiram a maturidade são provenientes dos seguintes cruzamentos: UENF1565 x UENF1489, UENF1567 x UENF1573, e duas combinações entre os acessos UENF1381 x UENF1489, UENF1578 x UENF1573 e UENF1567 x UENF1496.

A formação de híbridos resultantes do cruzamento entre os acessos UENF1578 x UENF1573, comprova que a combinação *C. annuum* var. *annuum* x *C. baccatum* var. *pendulum* pode ser realizada com sucesso. Essa combinação é importante, pois esses acessos apresentam resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Sudré, 2003), podendo ser úteis em programas de melhoramento que visam o controle a essa bactéria

No cruzamento recíproco, onze combinações foram semeadas e sete atingiram a maturidade: UENF1489 x UENF1569, UENF1495 x UENF1575, UENF1584 x UENF1562 e duas combinações entre os acessos UENF1500 x UENF1576 e UENF1496 x UENF1562.

Constata-se que um total de 95 flores foram polinizadas com acessos pertencentes a essas duas espécies, no entanto, em um maior percentual, houve a formação de frutos com sementes inviáveis, com formação deficiente de endosperma e ausência de embrião (Figura 1). Segundo a literatura, a existência de uma distância genética entre essas espécies acarreta problemas como sementes inviáveis, ausência de embrião e baixo percentual de frutos formados (Pickersgill, 1991; Zijlstra *et al.*, 1991, Casali, 1970 e Kumar *et al.*, 1987). Para Yoon (2003), em híbridos interespecíficos de espécies de *Capsicum*, é comum a ocorrência de meiose irregular, com pareamento cromossômico anormal, influenciando diretamente na porcentagem de polens viáveis e, conseqüentemente, em um número reduzido de sementes normais.



**Figura 1** Cruzamento entre *C. annuum* - UENF1575 (A) x *C. baccatum* - UENF 1584 (B) com formação de sementes  $F_1$  inviáveis (C)

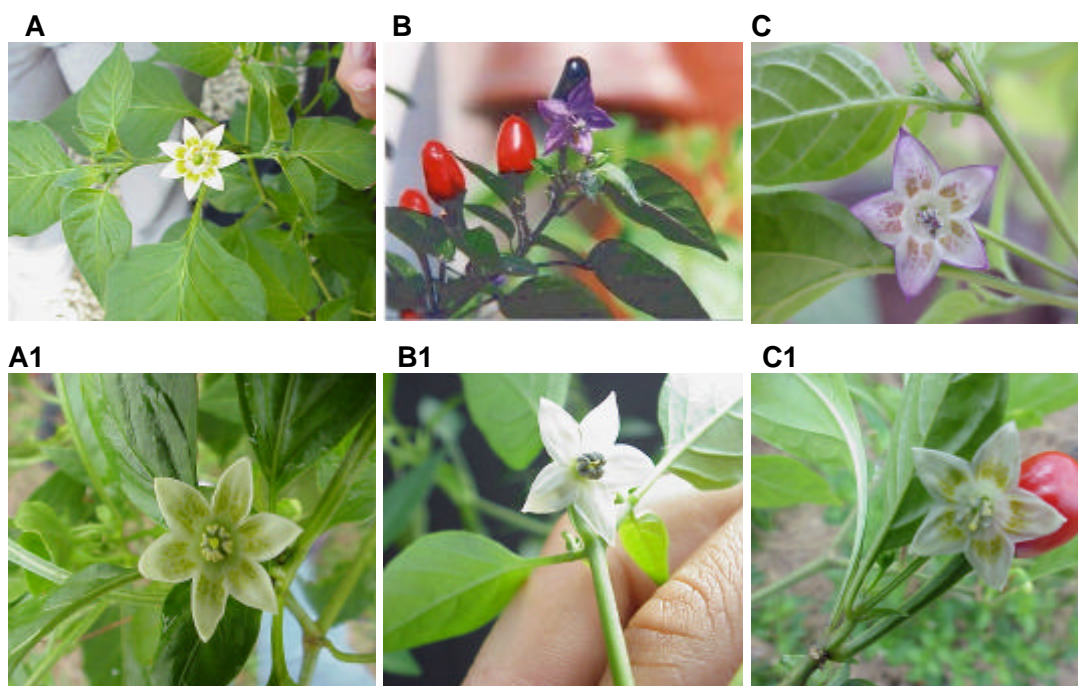
Sudré (2003) indicou o cruzamento entre os acessos UENF1584 (*C. baccatum*) x UENF1576 (*C. annuum*) como uma combinação eficiente em estudos para resistência à mancha bacteriana. Analisando os resultados verifica-se também que, em três combinações viáveis, UENF1584 x UENF1562, UENF1500 x UENF1576 e UENF1496 x UENF1562 ocorre a presença de genitores (UENF1584, UENF1576, UENF1496, UENF1562) com resistência à *Xanthomonas campestris* (Sudré, 2003).

As principais características dos híbridos obtidos no cruzamento entre essas espécies relacionam-se à cor das anteras e à altura das plantas híbridas, que caracterizou-se por ser superior aos pais e a cor da corola das flores (Apêndice). No caso específico da cor da corola, flores de cruzamentos que possuíam como genitor masculino a espécie *C. annuum* apresentaram corola branca, às vezes deformada na maior parte dos híbridos com manchas mais

claras que o genitor e número de pétalas semelhante a espécie *C. annuum*, enquanto flores híbridas com a espécie *C. baccatum*, usada como genitor masculino, apresentaram corola geralmente de tamanho similar ao genitor feminino, branca com estrias quase imperceptíveis ou muito pálidas. Verifica-se que no cruzamento entre um acesso de *C. baccatum* x *C. annuum glabriusculum* (Figura 2) a natureza híbrida foi bastante evidenciada, principalmente pela cor das anteras e presença de estrias nas flores obtidas.

Com relação à cor das sementes, a grande maioria apresentou cor amarela à amarelo claro, com exceção dos cruzamentos entre as espécies *C. baccatum var. baccatum* x *C. annuum annuum*, em que a cor predominante foi bege claro, e das combinações híbridas UENF1565 x UENF1489, UENF1567 x UENF1573 e UENF1567 x UENF1496, onde prevaleceu sementes de cor marrom clara (Apêndice).

Para a característica número de sementes, a média obtida a partir do somatório de 10 frutos, revelou que os valores médios foram sempre menores que os valores médios dos genitores. As combinações entre *C. baccatum var. baccatum* x *C. annuum var. annuum* (UENF1584 x UENF1562 e UENF 1595 x UENF1575), bem como os híbridos *C. baccatum var. pendulum* x *C. annuum var. glabriusculum* (UENF1500 x UENF1576), revelaram um número de sementes por 10 frutos bastante reduzido em relação aos seus genitores (Apêndice), fator este que pode ser relacionado ao menor tamanho do fruto híbrido formado e principalmente à baixa viabilidade polínica constatada nessas combinações, que obtiveram um resultado médio de cerca de 33%.



**Figura 2** Cor de corola e presença de estrias em híbridos entre as espécies *C. baccatum* var. *pendulum* (A) x *C.annuum* var. *glabriusculum* (B) híbrido F<sub>1</sub> (C) e *C. baccatum* var. *baccatum* (A1) x *C.annuum* var.*annuum* (B1) e seu híbrido F<sub>1</sub> (C1).

### **Cruzamentos entre *Capsicum annuum* e *Capsicum frutescens***

Um somatório de quarenta frutos foram obtidos a partir do cruzamento entre as espécies *C. annuum* x *C. frutescens* e seu recíproco, contudo, apenas treze frutos produziram sementes viáveis e, após a semeadura, nove frutos tiveram suas sementes germinadas.

Os genótipos híbridos viáveis restringiram-se às combinações UENF1503 x UENF1425 e três combinações UENF1569 x UENF1557, as quais produziram frutos com sementes viáveis, que após o plantio, atingiram a fase adulta. O resultado da eficácia do cruzamento entre os acessos UENF1503 x UENF1425 é significativo para essa pesquisa, pois a combinação entre esses acessos, além de demonstrar a viabilidade do cruzamento entre espécies de *C. annuum* e *C. frutescens* pode ser útil em programas de melhoramento de *Capsicum*, em que a resistência à mancha bacteriana é tida como fator de estudo.

No cruzamento recíproco, três combinações híbridas atingiram a maturidade UENF1425 x UENF1576, UENF1425 x UENF1565, UENF1560 x UENF1559. Nas combinações UENF1491 x UENF1578 e UENF1588 x

UENF1567, apesar de ocorrer a germinação das sementes, as plantas morreram ainda na fase de formação das folhas cotiledonares. As sementes dos dois frutos das combinações híbridas UENF1561 x UENF1502 e UENF1588 x UENF1503 não germinaram, sendo, provavelmente, um indicativo da baixa compatibilidade do cruzamento entre os acessos das espécies em estudo. Relatos existentes na literatura sobre hibridação interespecífica em *Capsicum* afirmam que melhores resultados são obtidos quando a espécie *C. annuum* é utilizada como genitor feminino (Bosland e Votava, 1999; Ribeiro e Melo 2003), embora para Smith e Heiser (1957) somente foi possível obter hibridação entre essas duas espécies quando se utilizou *C. frutescens* como genitor feminino. Os autores 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. Yazawa *et al.* (1989) relataram que debilidades têm sido comumente observadas em hibridação interespecífica de *Capsicum*, dentre elas, uma espécie de definhamento encontrado geralmente em híbridos interespecíficos de *C. annuum* x *C. chinense* ou *C. frutescens*. A falta de compatibilidade entre os acessos pode ser explicada devido à ocorrência de distúrbios na meiose, como por exemplo, a presença de multivalentes, implicando na existência de diferenças estruturais nos genomas dos parentais, o que pode explicar baixa formação de sementes viáveis

Em algumas combinações entre essas espécies houve a formação de sementes, porém totalmente inviáveis, onde parte da semente encontrava-se contraída ou com deficiência absoluta do endosperma. Para Poysa (1990), em muitos cruzamentos interespecíficos sementes viáveis não são formadas devido ao abortamento do embrião. Segundo o autor, o início da degeneração do embrião híbrido ocorre, aparentemente, devido a um colapso de células endospermicas com conseqüente proliferação de massas de calos endoteliais. Segundo Kapil e Tawar (1978), a ocorrência de uma incompleta singamia, problemas como deficiência de endosperma e proliferação endotelial são características, comumente encontradas em híbridos interespecíficos.

Os híbridos interespecíficos de *C. annuum* x *C. frutescens* normalmente apresentaram características de cor de corola, cor de fruto intermediário e cor do fruto maduro estreitamente ligadas aos genitores femininos, enquanto as características, hábito de crescimento, epiderme do fruto e cor da corola

relacionadas ao genitor masculino (Apêndice). O número de sementes presentes em 10 frutos mostrou que os frutos híbridos da combinação UENF1503 x UENF1425 produziu um número de sementes superior aos genitores em oposto ao híbrido UENF1560 x UENF1559, que produziu, em relação aos genitores, uma quantidade extremamente reduzida de sementes. Porém, cabe enfatizar, que esse valor pode estar relacionado ao tamanho do fruto híbrido que, nesse caso, apresentou-se menor em relação aos pais. Essa característica pode ser evidenciada pelo peso médio dos frutos, 0,903; 1,389; 0,468 respectivamente, para genitor materno, paterno e fruto híbrido, além da baixa viabilidade polínica encontrada para essa combinação (26%).

### **Cruzamentos entre *Capsicum annuum* e *Capsicum chinense***

Foram realizados cinqüenta cruzamentos, tendo como progenitor feminino acessos de *C. annuum* e como progenitor masculino acessos de *C. chinense*. Desse total, dezesseis produziram frutos e cinco combinações tiveram suas sementes germinadas.

Observou-se que apenas três combinações, UENF1575 x UENF1555, UENF1503 x UENF1555 e UENF1578 x UENF1553, atingiram a fase adulta, as duas restantes, UENF1559 x UENF1555 e UENF1576 x UENF1553, não conseguiram formar folhas definitivas, morrendo antes do transplântio.

No caso dos cruzamentos recíprocos, uma combinação híbrida procedentes de dois cruzamentos entre os acessos UENF1555 x UENF1503 atingiram a fase adulta, embora dezessete frutos tivessem sido formados nas polinizações interespecíficas. As combinações UENF1553 x UENF1381 e UENF1585 x UENF1575 foram semeadas, todavia após a germinação as plantas morreram quando possuíam apenas folhas cotiledonares. Para Tanksley e Iglesias-Olivas (1984), normalmente é possível a obtenção de plantas F<sub>1</sub> férteis, porém desbalanços meióticos no cruzamento entre *C. annuum* x *C. chinense* podem acarretar uma baixa produção de sementes viáveis.

Dos acessos que compõem os híbridos viáveis dois foram caracterizados por Sudré (2003) como adequados para uso em cruzamentos que visem resistência à *Xantomonas* (UENF1578) e (UENF1503), entretanto essa característica não foi avaliada no presente estudo.

Híbridos entre as espécies *C. annuum* e *C. chinense* apresentaram a característica altura de planta semelhante ao genitor feminino, o mesmo acontecendo para os atributos hábito de crescimento, cor da corola e forma do fruto. Quanto ao parâmetro forma do fruto constatou-se que os híbridos apresentaram, de modo geral, formato semelhante ao genitor materno, porém o peso médio dos frutos revelou valores muito próximos ao genitor masculino (Apêndice).

Verifica-se que o período necessário para o desenvolvimento de flores nos híbridos é maior que nos pais, porém o tempo necessário à frutificação é muito semelhante. Em apenas uma combinação (UENF1575 x UENF1555) foi verificada a característica cálice do fruto maduro com constrição anular na junção do pedicelo, e nas combinações restantes, essa característica não foi identificada. O caráter posição da flor seguiu para todos os híbridos obtidos, a classificação do genótipo *C. annuum*, tanto quando esse foi empregado como genitor masculino ou feminino (Apêndice).

O caráter número de flores por axila nas plantas híbridas foi similar a espécie *C. chinense*, onde é comum encontrar três ou mais flores por nó. Segundo Tanksley e Iglesias-Olivas (1984), a transferência do caráter múltiplas flores da espécie *C. chinense* para a espécie *C. annuum* pode resultar na produção de variedades de *C. annuum* com maior concentração de frutos por planta, sendo potencialmente mais produtivas. Ainda de acordo com os autores, é improvável que o caráter múltiplas flores seja transferido com toda a sua intensidade para espécies de *C. annuum*, porém é possível produzir em média 1,5 flores por nó, um valor 50% mais alto que todas as variedades de *C. annuum* existentes.

Kumar *et al.* (1987) revelam que híbridos parcialmente férteis são obtidos no cruzamento entre *C. annuum* x *C. chinense* e que, morfológicamente, os híbridos F1 apresentam características intermediárias aos pais. Além disso, foi verificado meiose irregular em 2 híbridos F<sub>1</sub>, revelando que o genoma de *C. annuum* difere de *C. chinense* devido à ocorrência de translocações e alterações estruturais.



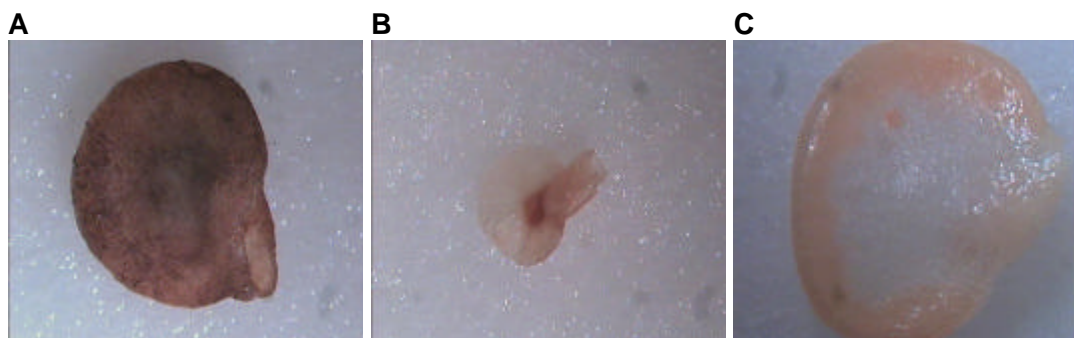
### **Cruzamentos entre *Capsicum baccatum* e *Capsicum frutescens***

Foram realizados cento e dezessete cruzamentos entre essas espécies e obtidas sementes viáveis de quinze frutos interespecíficos (Tabela 1). Após a obtenção dos frutos as sementes foram colocadas em bandejas e apenas quatro combinações não germinaram.

Para os híbridos onde a espécie *C. baccatum* foi utilizada como genitor feminino, as combinações entre acessos utilizados nos cruzamentos que atingiram a fase adulta foram: três híbridos UENF1496 x UENF1561, um híbrido UENF1492 x UENF1425, dois híbridos UENF1489 x UENF1560 e três híbridos UENF 1489 x UENF 1561. Após o plantio, a combinação UENF1492 x UENF1557 teve suas sementes germinadas, porém as folhas cotiledonares apresentaram-se deformadas, com baixo desenvolvimento, acarretando a morte da planta.

Os recíprocos dessa combinação foram obtidos dos cruzamentos: UENF1425 x UENF1490 e UENF1425 x UENF1573. As sementes dos dois frutos obtidos da combinação UENF1560 x UENF1500 e as sementes do híbrido UENF1561 x UENF1494 germinaram, mas apresentaram características morfológicas distintas dos parentais, com poucas folhas, tamanho reduzido e coloração atípica, morrendo alguns dias após o transplante. Segundo Yazawa *et al.* (1989), um crescimento anormal, caracterizado por esterilidade da fêmea e o encolhimento das folhas como se fossem afetados por vírus têm sido observados em híbridos de *C. frutescens* x *C. baccatum* e segundo Rao *et al.* (1992), híbridos derivados de cruzamentos interespecíficos *C. baccatum* x *C. frutescens* apresentam meiose irregular, explicando, assim, a ocorrência de anormalidades nesses cruzamentos.

Analisando as sementes oriundas dos frutos híbridos dos cruzamentos recíprocos foi possível verificar que a grande maioria apresentava tamanho anormal comparadas aos genitores, deformação, sementes de cor marrom, escurecidas, delgadas e com presença reduzida de endosperma (Figura.3).



**Figura 3** Sementes oriundas de polinização interespecífica entre *C. baccatum* x *C. frutescens* e recíproco. A: UENF1495 x UENF 1491; B: UENF1426 x UENF1588 e C: UENF1588 x UENF1426

As plantas híbridas obtidas nessa combinação apresentam porte grande quando comparadas aos parentais, sugerindo a manifestação do vigor híbrido para este caráter. Todavia, essas plantas tiveram seu período de floração e frutificação mais extenso em relação aos pais (Apêndice). As flores apresentaram características medianas aos genitores, apresentando corolas com cor intermediária aos pais. Particularmente, em todas as plantas, as flores apresentaram o pistilo com comprimento superior às anteras, o que pode dificultar a autopolinização. Verificou-se também que os caracteres cor das anteras, cor de fruto maduro e forma de fruto, em geral, mostraram-se intermediários aos genitores (Figura 4).

O caráter número de sementes para os híbridos recíprocos *C. frutescens* x *C. baccatum* apresentou valores baixos em relação aos genitores, sendo que a planta híbrida UENF1425 x UENF1490 produziu frutos com sementes inviáveis, escuras, reduzidas e sem endosperma (Apêndice). Esses resultados são coerentes com o valor médio de viabilidade polínica dos cruzamentos, os quais se mostraram extremamente baixos ( $X=8\%$ ), caracterizando a falta de afinidade genômica entre os genitores, o que possivelmente acarretou problemas como uma meiose irregular no cruzamento entre essas espécies.



**Figura 4** - Cruzamento entre as espécies *Capsicum baccatum* UENF1489 (A) e *Capsicum frutescens* UENF1560 (B), evidenciando a cor das anteras do híbrido interespecífico (C)

#### **Cruzamentos entre *Capsicum baccatum* e *Capsicum chinense***

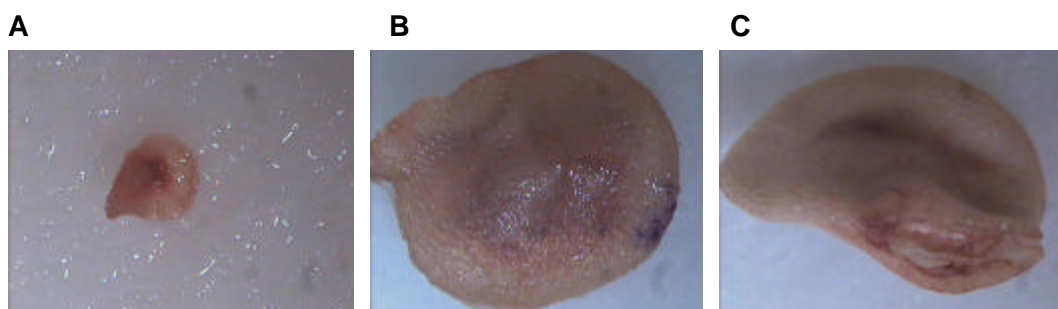
Os resultados da hibridação entre *C. baccatum* e *C. chinense* não foram satisfatórios. Dentre cerca de sessenta e nove cruzamentos entre essas espécies, obteve-se sete frutos com sementes com características morfológicas normais e trinta e dois frutos híbridos sem sementes ou com sementes inviáveis. No entanto, apenas duas plantas de uma mesma combinação, UENF1573 x UENF1555, foram obtidas. Grande parte das sementes inviáveis resultantes de frutos dos cruzamentos apresentaram como principal característica tamanho reduzido em relação às sementes dos genitores, formato atípico e uma quantidade mínima de endosperma (Figura 5). A presença de sementes inviáveis caracteriza a presença de barreiras de pós fertilização, podendo, neste caso, ocorrer à degeneração do endosperma com posterior morte do embrião, comumente observados em alguns cruzamentos interespecíficos (Rodrangboon *et al.*, 2002).

Na combinação UENF1500 x UENF1585 foram formadas 38 sementes, porém não houve germinação. Os recíprocos UENF1585 x UENF1584, UENF1498 x UENF1490 não germinaram, UENF1497 x UENF1500 desenvolveu apenas folhas cotiledonares com aspecto enrugado, não tendo continuidade no desenvolvimento. No cruzamento UENF1424 x UENF1490 ocorreu a formação de 16 sementes, duas germinaram, porém não se desenvolveram. Esses resultados corroboram com os obtidos por Casali (1970), quando o autor realizou cruzamentos entre essas duas espécies. De acordo com o autor, quando *C. chinense* foi usado como progenitor feminino não houve germinação das sementes, entretanto no cruzamento recíproco as sementes germinaram, embora esse processo tenha sido lento, em comparação aos pais. Pickersgill (1966), utilizando *C. baccatum* como genitor materno no cruzamento com *C. chinense* as

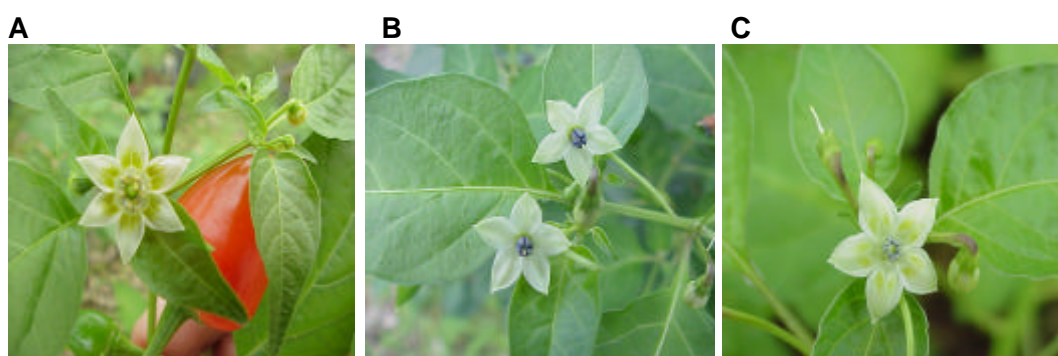
sementes tiveram germinação baixa, contudo deram origem a plantas normais. O recíproco apresentou sementes com baixa germinação, dando origem a plantas anormais, com sintomas de vírus. Segundo Yazawa *et al.* (1989), o crescimento anormal e o encolhimento das folhas são características tipicamente encontradas em cruzamentos entre *C. chinense* x *C. baccatum*.

As plantas obtidas dos dois cruzamentos entre *C. baccatum* e *C. chinense* UENF1573 x UENF1555 apresentaram aspecto geral intermediário aos pais. As variáveis cor de antera, cor de corola, e tamanho do fruto, em relação aos pais, mostraram-se consistentes, evidenciando a natureza híbrida da progênie.

O caráter peso de sementes apresentou valores próximos aos encontrados na espécie *C. chinense*. A polinização interespecífica proporcionou frutos com baixo número de sementes, sendo estas de coloração castanho escura, com características externas atípicas em comparação aos pais (Apêndice).



**Figura 5** Sementes oriundas de híbridos entre *C. baccatum* x *C. chinense*. A: UENF1500 x UENF1585; B: UENF1497 x UENF1500; C: UENF1498 x UENF1490.



**Figura 6** Aspecto geral de flores produzidas por *Capsicum baccatum* UENF 1573 (A) e *Capsicum chinense* UENF1555 (B) e seu híbrido F<sub>1</sub> (C)

### **Cruzamentos entre *Capsicum frutescens* e *Capsicum chinense***

De acordo com a Tabela 1 verifica-se que foram realizados trinta e dois cruzamentos, em que empregou-se *C. frutescens* como genitor feminino. Houve a formação de 32 frutos, no entanto 17 apresentaram sementes inviáveis ou caracterizaram-se como frutos sem sementes, seis desenvolveram sementes aparentemente normais e os frutos restantes foram perdidos em condições de campo ainda em estágio de maturação.

Os frutos interespecíficos formados pelos cruzamentos entre os acessos UENF1557 x UENF1497, UENF1560 x UENF1497 (2 frutos), não desenvolveram-se após o transplante e as sementes dos 3 frutos procedentes da combinação UENF1557 x UENF1498, germinaram, não obstante, sem alcançar a fase adulta. Parte das sementes tidas como inviáveis, apresentaram como características, tamanho reduzido, coloração amarela escura ou marrom, além de serem finas e leves em relação aos genitores.

Cruzamentos entre *C. chinense* x *C. frutescens* formaram 30 frutos. Embora tenha ocorrido um grande número de frutos interespecíficos, comprovando a afinidade genômica entre as duas espécies, a ocorrência de perdas limitou o plantio, em que apenas foi possível cultivar sementes de quatro frutos. Três frutos híbridos foram obtidos da combinação UENF1585 x UENF1557 e atingiram a fase adulta sem nenhuma anormalidade, com a formação de frutos com um número significativo de sementes. O fruto da polinização interespecífica entre os acessos UENF1553 x UENF1425 produziu três sementes com aspecto normal, mas não ocorreu o desenvolvimento das plântulas.

De modo geral, combinações entre as espécies *C. frutescens* x *C. chinense* são tidas como possíveis, não revelando, regra geral, grandes problemas. Híbridos parcialmente férteis foram obtidos por Eshbaugh (1964), quando o autor realizou cruzamentos entre *C. frutescens* x *C. chinense*. Casali (1970) obteve plantas híbridas e recíprocas no cruzamento entre essas espécies, contudo a viabilidade do híbrido foi variável. Pickersgill (1966) demonstrou que *C. chinense* e *C. frutescens* são bastante próximas, revelando um alto grau de compatibilidade e, de acordo com Pickersgill (1991) e Zijlstra *et al.* (1991), as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* pertencem a um mesmo complexo gênico, o que favorece e facilita o cruzamento entre essas espécies.

As plantas oriundas desses cruzamentos apresentaram um número médio de semente em dez frutos inferior aos pais, entretanto o peso dos frutos mostrou ser maior que o peso frutos dos genitores masculinos (Apêndice). As demais características apresentaram-se intermediárias aos genitores.

### **Cruzamentos entre *Capsicum pubescens* e *Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum baccatum***

Cruzamentos interespecíficos de *C. pubescens* e as demais espécies não produziram progênies. Esses resultados são relativos a um baixo número de cruzamentos, em que *Capsicum pubescens* foi utilizado como genitor feminino. O número reduzido de cruzamentos deve-se ao fato de a espécie ter apresentado um relativo grau de dificuldade em ser cultivada nas condições do presente estudo. Não obstante, segundo a literatura, cruzamentos entre a espécie *C. pubescens* e espécies de outros complexos, via de regra, não são viáveis. De acordo com Filho (2002), *C. pubescens* é isolada geneticamente das espécies cultivadas, pois é a única que em cruzamentos interespecíficos não são obtidos híbridos viáveis. Onus e Pickersgill (2004), realizando cruzamentos entre *C. pubescens* e demais espécies incluídas em seus estudos mostraram a existência de incompatibilidade unilateral nesses cruzamentos. Para Smith e Heiser (1957), cruzamentos entre *C. pubescens* x *C. frutescens* e *C. annuum* não são viáveis e ainda de acordo com os autores plantas híbridas entre *C. pubescens* e *C. chinense* somente são possíveis quando realizados através da cultura de embriões.

Em geral, apesar do grande número de cruzamentos entre as cinco espécies, foi pequeno o número de frutos híbridos desenvolvidos e de plantas híbridas viáveis. Alguns fatores podem ser citados para melhor entendimento do baixo percentual na obtenção de frutos interespecíficos:

Primeiramente, a taxa de sucesso nos cruzamentos depende do conhecimento da morfologia e fisiologia da flor como meio para identificar os estádios mais adequados de desenvolvimento dos botões florais para emasculação e das flores fornecedoras de pólen. Pode-se apontar como causas do insucesso da hibridação o uso de botões florais muito imaturos, danos ao aparelho reprodutor feminino e polinização inadequada. Além disso, algumas espécies produzem uma quantidade inexpressiva de pólen a ser utilizado na

polinização. Esse acontecimento ocorre, geralmente, em espécies com flores pequenas ou naquelas onde há uma significativa aderência do pólen à parede da antera, dificultando sua extração.

Outro fator que pode reduzir a eficácia de cruzamentos interespecíficos relaciona-se ao fator temperatura. A exposição a temperaturas acima de 34°C no período de germinação do grão de pólen provoca redução na porcentagem de germinação e na taxa de crescimento do tubo polínico (Stevens e Rudich, 1978), determinando um menor número de frutos por planta. Segundo Abdalla e Verkerk (1968), a causa da não-fixação dos frutos é a ausência de polens viáveis, pois, sob altas temperaturas, a quantidade de pólen é drasticamente reduzida, devido, provavelmente, à interferência no processo de microsporogênese ou microgametogênese.

Por fim, a própria incompatibilidade entre as espécies. Vários são os estudos que relatam os fatores que dificultam a obtenção de plantas viáveis entre espécies de *Capsicum*. Bosland (1996), referindo-se a cruzamentos entre as cinco espécies cultivadas de *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. pubescens*, revelaram que a espécie *C. annuum* cruza facilmente com a espécie *chinense* e esporadicamente com *frutescens* e *baccatum*. Cruzamentos entre as espécies *C. baccatum* e *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. annuum* são esporadicamente viáveis, porém produzem apenas híbridos estéreis. O autor revela ainda, que todos os cruzamentos entre as espécies *C. pubescens* e as demais cultivadas não produzem híbridos.

A determinação de cruzamentos viáveis pode ser em parte elucidada a partir do entendimento de suas relações genéticas. De acordo com Ônus e Pickersgill (2004), fundamentado na estrutura dos cromossomos, bandas de isoenzimas, composição de flavonóides e polimorfismo de DNA cloroplastídico formaram-se grupos naturais de espécies de *Capsicum*. O primeiro grupo seria formado pelas espécies *C. eximium*, *C. cardenasii* e a espécie domesticada *C. pubescens*, o segundo grupo consiste no complexo *C. annuum*, contendo três espécies domesticadas, *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*. A espécie *C. baccatum* está presente em um terceiro grupo, juntamente com a espécie *C. praetermissum*. Com base nas características específicas de cada grupo distinto pode-se explicar a facilidade obtida em certos cruzamentos e a dificuldades impostas por outros.

Em geral, afirma-se que espécies que participam de um mesmo complexo cruzam facilmente entre si, produzindo plantas  $F_1$  férteis, conseqüentemente, o entendimento para grupos distintos é oposto, ou seja, existe uma dificuldade na formação de híbridos interespecíficos férteis oriundos dos cruzamentos entre espécies pertencentes a complexos distintos.

A caracterização morfológica é uma boa metodologia para observar se genes de uma espécie foram transferidos para outra espécie, pois ela permite a obtenção de subsídios para observação do comportamento genético e da direção de cruzamentos a serem utilizados no desenvolvimento de híbridos interespecíficos com potencial para aproveitamento em programas de melhoramento genético.



### 3.2.6 CONCLUSÕES

A existência de compatibilidade de cruzamentos entre os acessos de *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum baccatum* foi observada neste estudo, porém não houve a formação de todos os híbridos recíprocos.

É possível a obtenção de frutos interespecíficos entre as quatro espécies contudo, sementes híbridas viáveis são restritas a cruzamentos entre determinados acessos.

Combinações interespecíficas entre a espécie *Capsicum pubescens* e as demais não obtiveram sucesso.

As melhores combinações híbridas foram obtidas a partir de cruzamentos entre acessos de *C. chinense* x *C. annuum*, *C. baccatum* x *C. annuum* e *C. chinense* x *C. frutescens*.

Cruzamentos entre as espécies *C. baccatum* x *C. chinense* e *C. frutescens* x *C. baccatum* resultaram em plantas com frutos deformados e com menor número de sementes viáveis.

### 3.2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. A., VERKERK, K. (1968). Growth flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth. J. Agric. Sci.*, v. 16, p.71-76
- BOSLAND, P. W. (1996). *Capsicum: Innovative. Uses of an Ancient Crop*. Arlington, VA: ASHS Press, p.479-487.
- CASALI, V. W. D. (1970). Cruzamento interespecífico no gênero *Capsicum*. Viçosa, MG: UFV, 58p. Tese de Mestrado.
- CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. (1984). Origem e botânica de *Capsicum*. Informe agropecuário, v.10, n.113, p. 8-18.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. (2003). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2003. 340 p.
- DESHPANDE, A. A.; ANAND, N.; RAMACHANDER, P. R (1988). Ideotype differentiation of horticultural groups in *Capsicum* spp. *Genetica Agraria*, Roma, v. 42, n. 4, p. 357-364.
- ESHBAUGH, W. (1964). A numerical taxonomic and cytogenetic study of certain species of the genus *Capsicum*. Indiana University. 112p. Tese de Doutorado.
- FILGUEIRA, F. A. R. (2000). Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças-Viçosa: UFV, 402p.:il.
- FILHO, H. (2002). Pimentas Quentes; [http://www. geosites.com /napavalley 1819/index.htm](http://www.geosites.com/napavalley1819/index.htm) em 18/06/02, página mantida por Ring of Fire.
- IPGRI (1995). *Descritores para Capsicum (Capsicum spp)*. IPGRI, Roma, 51p.
- KAPIL, R. N.; TAWARI, S. C. (1978). The integumentary tapetum. *Botanic Review*, v.44, p.457-490.

KUMAR, A. O.; PANDA, R. C.; RAJA, R. K. G. (1987). Cytogenetic studies of the hybrids of *C. annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. TAG Theoretical and Applied Genetics, Volume 74, Issue 2, Jun 1987, Pages 242 - 246, DOI 10.1007/BF00289975, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00289975>

MOOR, C. W. (2003). Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto; Implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Piracicaba. Tese (Doutorado). 184p.

ÔNUS, A. N.; PICKERSGILL, B. (2004). Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution Annals of Botany, v 94, p 289-295.

PICKERSGILL, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T, Gupta, PK, eds. Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. Amsterdam: Elsevier, p.139–160.

PICKERSGILL, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp., Euphytica, Volume 96, Issue 1, Jan 1997, Pages 129 -133.

PICKERSGILL, B. (1966). The Variability and relationships of *Capsicum chinense* Jacq. Indiana University. 98p. (Tese de Ph.D).

POYSA, V. (1990). The development of bridge lines for interespecific gene transfer between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. Theoretical and Applied Genetics, v. 79, p. 187-192.

RAO, N. B.; VALLI, T. S.; LAKSHMI, N. (1992). Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L. x *Capsicum frutescens* L. and its progeny. CAB abstracts. p. 8-24.

RIBEIRO, C. S. C.; MELO, R. A. C. (2003). Híbridaç o Interespecífica entre *Capsicum annuum* e *Capsicum chinense* visando resistência a *Phytophthora capsici*. IN: 2  Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro-Bahia; 23 a 26 abril - 2003.

RODRANGBOON, P.; PONGTONGKAN , P.; SUPUTTITABA, S.; ADACHI, T. (2002). *Breeding Science*. v: 52: p .123-129.

SMITH, P. G.; HEISER, C. B. (1957). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *Am. Jour. Bot* 62-68.

STEVENS, M. A., RUDICH, J. (1978). Genetic potencial for overcoming physiological limitations on adaptability, yield, and quality in the tomato. *HortScience*, Alexandria, v.13, p.673-78, 1978.

SUDR , C. P. (2003). Divergência genética e avalia o da resistência   mancha bacteriana em *Capsicum* spp. Campos dos Goytacazes: UENF, 112p. Disserta o-Mestrado.

TANKSLEY, S. D.; IGLESIAS-OLIVAS, J. (1984). Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinense* in to *Capsicum annuum*. *Euphytica* Volume 33, Number 3. November 1984. Pages: 769 - 777.

XAVIER, A. (1996). Aplica o da Análise Multivariada da Divergência Genética no Melhoramento de *Eucalyptus* spp. Viçosa: UFV, 1996. 129 f. Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, MG. Tese de Doutorado.

YAZAWA, S.; SUETOME, N.; OKAMOTO, K.; NAMIKI, T. J. (1989). *Jpn. Soc. Hortic.Sci.*, 58, 601-607.

YOON, J. B. (2003). Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding pepper (*Capsicum annuum*) resistant to anthracnose. Ph.D. Thesis. Seoul National University, Korea.

ZIJLSTRA, S. C.; PURIMAHUA, C.; LINDOUT, P. (1991). Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. Hortscience, v. 26, p. 585–586.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Capsicum* COM BASE NA VIABILIDADE POLÍNICA

#### 3.3.1 RESUMO

Na presente pesquisa objetivou-se avaliar a viabilidade polínica de quarenta e três híbridos interespecíficos obtidos a partir de cruzamentos controlados entre cinco espécies cultivadas do gênero *Capsicum*, bem como dos trinta e seis acessos representantes dessas espécies utilizados na obtenção dos híbridos. Os híbridos e os acessos foram cultivados em casa de vegetação e, no período da floração, botões florais na antese foram coletados em etanol 70%. Para o preparo da lâmina, anteras foram maceradas em gotas de solução corante tripla. As lâminas foram observadas sob microscópio ótico e foram contados o número de grãos de pólen viáveis (coloração púrpura) e inviáveis (coloração verde). A análise de variância dos dados mostrou que houve diferenças significativas a 1% de probabilidade entre os acessos; porém, de modo geral, os acessos apresentam viabilidade média alta (acima de 90%), com exceção do acesso representante da espécie *C. pubescens*, o qual apresentou uma taxa de viabilidade polínica baixa (27%). Os resultados obtidos indicam que provavelmente problemas relacionados ao insucesso na obtenção de híbridos entre algumas combinações não estão relacionados à viabilidade polínica desses acessos. A análise de variância dos dados obtidos para a viabilidade polínica dos híbridos mostrou que houve variação significativa entre os mesmos. Os maiores valores para viabilidade polínica foram observados em híbridos representantes das seguintes

combinações: *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. chinense* x *C. annuum* e *C. chinense* x *C. frutescens*; entretanto, para algumas combinações híbridas a viabilidade polínica foi muito baixa, sugerindo problemas na meiose e conseqüentemente na formação dos grãos de pólen. Desse modo, constatou-se que o insucesso em algumas combinações ocorreu devido à presença de barreiras pós-fertilização, uma vez que alguns híbridos revelaram um certo grau de esterilidade masculina.

### 3.3.2 ABSTRACT

This study had the objective of evaluating the pollen viability of 43 interspecific hybrids of controlled crosses of five cultivated species of the genus *Capsicum*, as well as of 36 representative accessions of these species used to establish the hybrids. Hybrids and accessions were grown in a greenhouse and in the flowering period, flower buds in anthesis were placed in 70% ethanol. To prepare slides, the anthers were ground in drops of triple dye. Under an optical microscope the number of viable (crimson-colored) and inviable pollen grains (green colored) on the slides was counted. The analysis of variance showed significant differences at 1% probability between accessions. But in general, the mean viability of accessions was high (over 90%), with exception of the *C. pubescens* accession, which presented a low rate of pollen viability (27%). Results indicated that the problems related to a failure in the establishment of hybrids of some combinations are probably not related to the pollen viability of these accessions. The analysis of variance of the data regarding hybrid pollen viability showed significant variation. Highest values for pollen viability were observed in hybrids of the following combinations: *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. chinense* x *C. annuum* and *C. chinense* x *C. frutescens*. The pollen viability in some hybrid combinations was however very low, indicating problems in meiosis and consequently with pollen grain formation. The lack of success of some combinations was ascribed to the presence of post-fertilization barriers, since a certain degree of male sterility was observed in some hybrids.



### 3.3.3 INTRODUÇÃO

Espécies de *Capsicum* são de grande importância econômica, destacando-se mundialmente como base para o desenvolvimento de condimentos e temperos em escala doméstica e industrial. Atualmente são cultivadas em diferentes regiões do mundo, sendo o Brasil considerado um importante centro de diversidade do gênero, possuindo ampla variabilidade de pimentas e pimentões (Pozzobon *et al.*, 2006). Segundo Moor (2003), o cultivo de espécies do gênero *Capsicum* encontra-se em larga expansão por grande parte do território brasileiro, principalmente devido à existência de materiais genéticos adaptados às diferentes regiões.

Tradicionalmente, o melhoramento genético de *Capsicum* tem por base a manipulação genética, por meio da hibridação sexual, intraespecífica ou interespecífica entre materiais genéticos realizada artificialmente. A hibridação interespecífica é uma metodologia importante no melhoramento genético de uma espécie, porque genes de interesse identificados em uma espécie podem ser transferidos para outra espécie. Porém, o sucesso da hibridação interespecífica depende da compatibilidade entre as espécies envolvidas no cruzamento.

Para Prestes e Goulart (1995), o cruzamento entre espécies distintas pode ser incongruente, devido à existência de um conjunto de barreiras pré e pós-zigóticas causada pelo isolamento entre as espécies, gerando distúrbios em cruzamentos interespecíficos, pelo não reconhecimento de parte das informações genéticas de um genitor pelo outro. As barreiras pré-zigóticas são resultantes da não germinação dos grãos de pólen no estigma e do retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico através do estilete até o ovário. Após a fertilização,

as principais barreiras são a morte do embrião, devido à degeneração do endosperma e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas.

As espécies do gênero *Capsicum* podem ser agrupadas em complexos, cada um englobando materiais que hibridizam, de maneira geral, facilmente entre si. São eles: Complexo *C. annuum*, que compreende as espécies *C. annuum* (variedades *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. chacoense* e *C. galapagoense* (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991); Complexo *C. baccatum*, que agrupa as espécies *C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* e *praetermissum*) (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991) e *C. tovarii* (Tong e Bosland, 1999), e Complexo *C. pubescens*, que agrupa as espécies *C. cardenasii*, *C. eximium* e *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991).

Em programas de melhoramento que envolva hibridação interespecífica é necessário o conhecer a viabilidade/fertilidade dos grãos de pólen das espécies a serem envolvidas no programa, bem como dos híbridos. De acordo com Dafni (1992) a avaliação da viabilidade do grão de pólen é o fator primário para que ele venha ter a oportunidade de germinar no estigma da flor, sendo esse um estágio decisivo à fertilização. Informações sobre a viabilidade polínica são fundamentais para os estudos da biologia reprodutiva de espécies vegetais, permitindo a comprovação e o entendimento de resultados decorrentes de determinados cruzamentos.

Sabe-se que em programas de melhoramento genético, hibridações não efetivas e problemas relacionados à incompatibilidade entre as espécies podem ser estudados e elucidados a partir de análises de características associadas à germinação dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento (Kearns e Inouye, 1993).

Diante às dificuldades em se obter determinados híbridos entre espécies de *Capsicum*, a presente pesquisa foi desenvolvida com o intuito de avaliar a viabilidade polínica em acessos representantes de cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, bem como em híbridos interespecíficos obtidos, objetivando esclarecer as razões do insucesso de algumas combinações híbridas em gerar frutos viáveis.

### 3.3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.4.1 Material Genético Vegetal

Foram avaliados 36 acessos representantes das 5 espécies cultivadas de *Capsicum*, conservados na coleção de germoplasma da UENF (Apêndice) e 43 híbridos obtidos a partir de polinização artificial entre as espécies, que foram previamente validados via marcadores moleculares. Os genótipos foram cultivados em casa de vegetação em vasos de quatro litros e meio e 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). Dos 43 híbridos, 27 foram cultivados em casa de vegetação na unidade experimental da PESAGRO/Campos dos Goytacazes e 16 cultivados em casa de vegetação, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) no *campus* da UENF. Os procedimentos laboratoriais foram executados no Setor de Citogenética do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF. A temperatura ambiente durante o período em que se efetuou a coleta dos botões florais variou entre 26° a 38,5°C.

#### 3.3.4.2 Metodologia

Para a análise da viabilidade/fertilidade dos acessos, bem como dos híbridos, botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70%. Posteriormente, as anteras foram maceradas em gotas da solução de FAA - formalina, álcool etílico e ácido acético - (Alexander, 1969). As lâminas preparadas foram observadas sob microscópio óptico Olympus BX 60, campo claro, e foram contados o número de grãos de pólen viáveis (cor púrpura) e o

número de grãos de pólen inviáveis (cor verde). Foram preparadas cinco lâminas para cada material genético, cada uma representando uma antera, onde foram contados 250 grãos de pólen/lâmina, perfazendo um total de 1250 grãos de pólen por acesso. Os dados obtidos foram transformados em percentual (%) e submetidos à análise de variância usando o programa Genes (Cruz 2001).

### 3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas entre os acessos a 1% de probabilidade foram observadas conforme mostram os dados da análise de variância (Tabela 1). Essas diferenças foram validadas pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade (Tabela 2). A média geral de viabilidade polínica foi de 91% e o coeficiente de variação foi baixo, sugerindo a precisão dos dados obtidos.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância referente aos dados de viabilidade polínica dos 36 acessos de *Capsicum* com valores de quadrado médio dos genótipos, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Genótipo	35	8291,981**
Resíduo	144	278,511
Total	179	
Média Geral	227,15	
<b>CV(%)</b>	<b>7,346 %</b>	

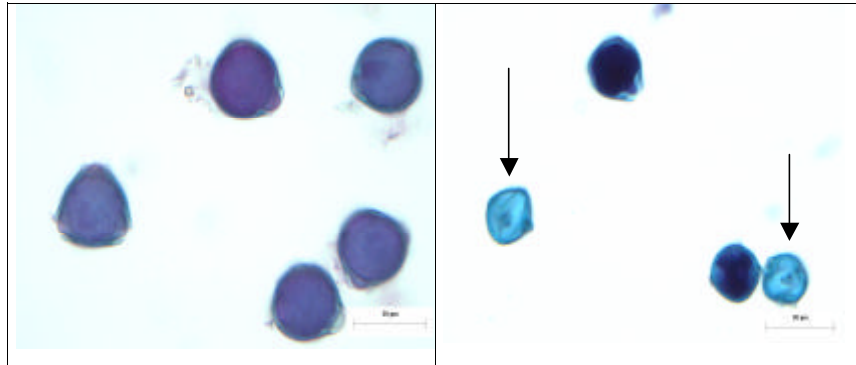
\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste Scott-knott.

Como pode ser observado, houve variação dentro de cada grupo de acessos representantes de uma determinada espécie, bem como entre as espécies. Os acessos representantes da espécie *C. annum* var. *annuum*, tipo pimentão, apresentaram uma média de 85% de viabilidade polínica, sendo que o acesso UENF 1569 apresentou viabilidade polínica inferior a 50%, sugerindo problemas durante a formação dos grãos de pólen. Os acessos representantes da mesma espécie, porém variedade pimenta, apresentaram uma média percentual de viabilidade polínica superior a 93%, podendo ser considerado altamente significativo para este tipo de estudo.

Os acessos representantes das espécies *C. chinense*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *pendulum* apresentaram viabilidade polínica superior a 95%, 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 espécie *C. frutescens* apresentou uma viabilidade média de 87%, porém os acessos UENF1560 e UENF1588 apresentaram viabilidade polínica média de 60% e 77%, respectivamente, valores considerados intermediários, o que pode indicar que a divisão celular nesses acessos apresentou algum tipo de anormalidade. De acordo com Lanteri e Pickersgill (1993), Tanskley e Iglesias (1984), Tong e Bosland (2003) e Yoon (2003), a viabilidade polínica das espécies *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annum*, *C. baccatum*, normalmente apresentam valores médios altos, fato que, via de regra, não é observado quando há cruzamentos entre essas espécies, provavelmente devido a irregularidades ocorridas durante o processo meiótico, o que influencia diretamente no percentual de grãos de pólen viáveis. Grãos de pólen viáveis e inviáveis foram facilmente distinguidos segundo metodologia de coloração ( Figura1).

O acesso UENF1574, o único representante da espécie *Capsicum pubescens* neste estudo, apresentou uma viabilidade polínica muito baixa (27%), entretanto, esse resultado pode ser explicado pelo fato de que esta espécie é predominante de ambientes com condições climáticas completamente distintas das ocorridas durante a execução do experimento. De acordo com Eshbaugh (1993), a espécie *C. pubescens* é típica dos Andes, que são regiões de altitudes elevadas e temperaturas baixas. Segundo a literatura, em diversas hortaliças, temperaturas elevadas, acima de 27°C, afetam a fertilidade do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico (Reghin, 1996, Petropoulou e Alston,1998).

De modo geral, a viabilidade polínica dos acessos de *Capsicum* apresentou valores médio altos, constatando que possivelmente a não formação de frutos ou a formação de frutos sem sementes observados em alguns cruzamentos interespecíficos não pode ser atribuída à viabilidade polínica dos acessos em estudo.



**Figura 1.** Aspecto geral do grão de pólen viável em espécies de *C. annuum* e *C. frutescens*. A: grão de pólen viável (corado); B: grão de pólen inviável (seta - não corado). Barra: 30 $\mu$ m.

Quanto à viabilidade polínica dos híbridos interespecíficos os resultados mostraram que houve diferenças significativas na viabilidade polínica entre os híbridos cultivados, tanto na casa de vegetação na UAP/ UENF (Tabela 3) quanto na PESAGRO (Tabela 4). Os valores dos coeficientes de variação para ambos os locais de cultivo foram baixos, sugerindo a precisão com que os dados foram obtidos.

**Tabela 2.** Viabilidade polínica (%) de 36 acessos representantes de cinco espécies domesticadas de *Capsicum*.

<b>Acessos</b>	<b>Espécie</b>	<b>VP%</b>	
UENF 1562	<b><i>C. annuum var. annuum</i> pimentão</b>	97,44	A
UENF 1565	<i>C. annuum var. annuum</i> pimentão	99,36	A
UENF 1382	<i>C. annuum var. annuum</i> pimentão	89,12	B
UENF 1567	<i>C. annuum var. annuum</i> pimentão	99,12	A
UENF 1569	<i>C. annuum var. annuum</i> pimentão	43,04	D
Média		<b>85,62</b>	
UENF 1503	<i>C. annuum var. annuum</i> pimenta	96,48	A
UENF 1381	<i>C. annuum var. annuum</i> pimenta	97,92	A
UENF 1578	<i>C. annuum var. annuum</i> pimenta	98,56	A
UENF 1502	<b><i>C. annuum var. annuum</i> pimenta</b>	69,20	C
UENF 1575	<i>C. annuum var. annuum</i> pimenta	92,80	A
UENF 1559	<i>C. annuum var. glabriusculum</i> pimenta	96,28	A
UENF 1576	<i>C. annuum var. glabriusculum</i> pimenta	97,84	A
Média		<b>92,72</b>	
UENF 1497	<i>C. chinense</i> pimenta	99,04	A
UENF 1498	<i>C. chinense</i> pimenta	95,84	A
UENF 1555	<i>C. chinense</i> pimenta	98,88	A
UENF 1424	<i>C. chinense</i> pimenta	98,48	A
UENF 1585	<b><i>C. chinense</i> pimenta</b>	98,56	A
UENF 1553	<i>C. chinense</i> pimenta	98,72	A
Média		<b>98,25</b>	
UENF 1495	<i>C. baccatum var. baccatum</i> pimenta	97,44	A
UENF 1584	<i>C. baccatum var. baccatum</i> pimenta	98,32	A
UENF 1417	<i>C. baccatum var. baccatum</i> pimenta	100,00	A
Média		<b>98,59</b>	
UENF 1489	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	95,36	A
UENF 1492	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	97,68	A
UENF 1496	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	98,72	A
UENF 1573	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	94,00	A
UENF 1426	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	98,56	A
UENF 1490	<b><i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta</b>	96,40	A
UENF 1494	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	92,80	A
UENF 1500	<i>C. baccatum var. pendulum</i> pimenta	96,08	A
Média		<b>96,20</b>	
UENF 1425	<b><i>C. frutescens</i> pimenta</b>	96,56	A
UENF 1560	<b><i>C. frutescens</i> pimenta</b>	60,56	C
UENF 1561	<b><i>C. frutescens</i> pimenta</b>	97,92	A
UENF 1491	<i>C. frutescens</i> pimenta	94,56	A
UENF 1557	<i>C. frutescens</i> pimenta	96,16	A
UENF 1588	<i>C. frutescens</i> pimenta	76,88	B
Média		<b>87,11</b>	
UENF 1574	<i>C. pubescens</i> pimenta	27,12	E
Média		<b>27,12</b>	
Média Geral		<b>91,16</b>	



**Tabela 3.** Resumo da análise de variância referente aos dados de viabilidade polínica observados em híbridos interespecíficos de *Capsicum* cultivados na UAP/UENF, com valores de quadrado médio dos genótipos, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Genótipo	15	26102,559167**
Resíduo	64	90,720313
Total	79	
Média Geral	160,90	
CV%	5,90 %	

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste Scott-knott.

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância referente aos dados de viabilidade polínica observada em híbridos interespecíficos de *Capsicum* cultivados na PESAGRO-Rio, Campos dos Goytacazes, com valores de quadrado médio dos genótipos, média geral e coeficiente de variação experimental (CV%).

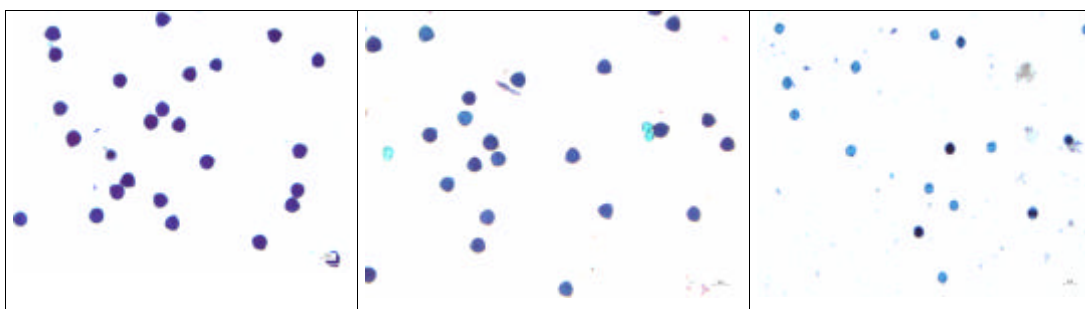
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
Genótipo	26	25508,441**
Resíduo	108	38,413
Total	134	
Média Geral	152,60	
CV %	4,10%	

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste Scott-knott.

De acordo com Pickersgill (1991) e Zijlstra *et al.* (1991), as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* constituem o complexo *annuum*, classificação feita com base na facilidade de cruzamento e fertilidade de seus híbridos. Desse modo, era esperado uma alta viabilidade polínica nos híbridos obtidos entre essas espécies todavia, neste trabalho, a viabilidade polínica dessas combinações híbridas foram inferiores aos genitores (Tabelas 6). No híbrido entre *C. annuum* x *C. chinense* (UENF 1503 x UENF 1555) a viabilidade polínica foi baixa (34%), entretanto no híbrido recíproco (UENF 1555 x UENF 1503) variou de alta (99%) à mediana (75%), sugerindo que para obtenção de um híbrido viável a partir dessa combinação, seja melhor utilizar *C. chinense* como genitor feminino (Figura 2). Smith e Heiser (1957) observaram variações na taxa de viabilidade polínica de 1% a 70% no cruzamento de *C. chinense* x *C. annuum* e Kumar *et al.* (1987) ressaltaram em seus estudos sobre a citogenética de híbridos F<sub>1</sub> em *C. annuum* com *C. chinense* a ocorrência de meiose irregular em híbridos interespecíficos. Tanksley e Iglesias-Olivas (1984) relataram em seu trabalho que

apesar da obtenção de plantas F<sub>1</sub> férteis, ocorre um desbalanço meiótico no cruzamento entre *C. annuum* x *C. chinense*, o que ocasiona uma baixa viabilidade do pólen dos híbridos (12%) em relação aos seus genitores, 85 e 87%, respectivamente. Porém, de acordo com Casali (1970) e Onus e Pickersgill (2004), a obtenção de plantas férteis em cruzamentos envolvendo as espécies *C. annuum* e *C. chinense* são tidos como possíveis, não revelando, regra geral, maiores problemas.

Resultados semelhantes foram observados nos híbridos obtidos entre *C. annuum* x *C. frutescens*, sugerindo que a obtenção do híbrido é possível, contudo com fertilidade intermediária aos genitores. Para melhores resultados, nessa combinação, recomenda-se o emprego de *C. frutescens* como genitor feminino. Segundo Pickersgill (1997), estudos na sistemática de *Capsicum* tem mostrado que os problemas que tem sido relatados em pesquisas de hibridação interespecífica nesta espécie são similares àqueles encontrados em tomate, tabaco e batata; dentre esses pode-se citar a incompatibilidade unilateral que ocorre entre o complexo *Capsicum pubescens* e outras espécies de *Capsicum*.



**Figura 2.** Viabilidade polínica em três combinações interespecíficas: *C. chinense* x *C. frutescens*; *C. chinense* x *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens* x *C. baccatum* var. *pendulum*. Barra: 40µm.

A viabilidade polínica nos híbridos obtidos entre *C. chinense* x *C. frutescens* foi alta (figura 2), em torno de 94%, confirmando o que Pickersgill (1997) e Choong (1998) relataram sobre a proximidade genética entre essas duas espécies. Essa proximidade genética está relacionada, principalmente, à similaridade entre genomas. Baseado nesse ponto, deduz-se que quanto maior a semelhança entre os genomas, maior a possibilidade de ocorrência de um processo meiótico regular, resultando na formação de gametas viáveis. Desse modo, pode-se supor que plantas híbridas formadas a partir do cruzamento de

espécies de um mesmo complexo têm grande potencial de apresentarem plantas férteis com uma viabilidade polínica alta.

Híbridos obtidos entre *C. frutescens* e *C. annuum* var. *glabriusculum* apresentaram viabilidade polínica baixa (27%) (Tabela 5). Em consequência na geração subsequente, não produziram frutos. Segundo Pagliarini e Pozzobon (2004), fatores genéticos, como a falta de similaridade genômica faz com que ocorra desbalanços cromossômicos causados por anormalidades meióticas os quais afetam sobremaneira a viabilidade do pólen.

**Tabela 5.** Viabilidade polínica de híbridos interespecíficos obtidos entre as espécies *C. annuum annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*.

Combinação híbrida	? x ?	Viabilidade Polínica (%)
<i>C. annuum annuum</i> x <i>C. chinense</i>	UENF 1578 X UENF 1553	47
	UENF 1503 X UENF 1555	34
	UENF 1575 X UENF 1555	87
	Média geral	56
	<i>C. chinense</i> x <i>C. annuum annuum</i>	UENF 1555 X UENF 1503
UENF 1555 X UENF 1503		75
Média geral		87
<i>C. annuum annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	UENF 1569 X UENF 1557	86
	UENF 1503 X UENF 1425	84
	UENF 1569 X UENF 1557	77
	UENF 1569 X UENF 1557	40
	Média geral	72
<i>C. frutescens</i> x <i>C. annuum annuum</i>	UENF 1425 X UENF 1565	95
	Média geral	95
<i>C. chinense</i> x <i>C. frutescens</i>	UENF 1585 X UENF 1557	96
	UENF 1585 X UENF 1557	94
	UENF 1585 X UENF 1557	93
	Média geral	94
<i>C. frutescens</i> x <i>C. annuum glabriusculum</i>	UENF 1425 X UENF 1573	28
	UENF 1425 X UENF 1490	26
	Média geral	27

As espécies *C. annuum* e *C. baccatum* pertencem a complexos gênicos diferentes e segundo Pickersgill (1991), Zijlstra *et al.* (1991), Casali (1970) e Kumar *et al.* (1987), 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. Para Harlan e De Wet (1971) e Choong (1998), a obtenção de híbridos entre essas espécies apresenta uma relativa dificuldade, sendo que quando o híbrido é obtido, um grau de esterilidade é manifestada. Entretanto, neste estudo a combinação entre *C. annuum annuum* x *C. baccatum pendulum* apresentou viabilidade polínica superior a 90%. Os híbridos recíprocos apresentaram uma variação quanto à viabilidade polínica de 96% (alta) a 36% (baixa) (Tabela 6). Esses resultados diferem dos obtidos por Yoon (2003) que apesar de obter uma viabilidade polínica alta para as espécies genitoras, obteve uma viabilidade polínica muito baixa (5%) para os híbridos interespecíficos. Considerando que os híbridos obtidos neste estudo tiveram a sua natureza híbrida validada por marcadores RAPD e por caracteres morfológicos, acredita-se que a diferença de resultados possa ter ocorrido devido ao fato de que a fertilidade dos híbridos foi determinada por diferentes procedimentos citológicos.

Para as demais combinações híbridas envolvendo *C. baccatum var. pendulum* x *C. frutescens*, *C. frutescens* x *C. baccatum var. pendulum* (Figura 2), *C. baccatum var. pendulum* x *C. chinense*, *C. baccatum var. pendulum* x *C. annuum var. glabriusculum*, e *C. baccatum var. baccatum* x *C. annuum var. annuum* a viabilidade polínica foi baixa, variando de 15% a 50% (Tabela 6), sugerindo a ocorrência de problemas de homologia cromossômica entre essas espécies, o que resulta na parcial ou completa esterilidade dos híbridos e, conseqüentemente, na ausência de frutos ou na formação de frutos sem sementes, uma vez que grande parte dos grãos de pólen são inviáveis.

**Tabela 6.** Viabilidade polínica de híbridos interespecíficos obtidos envolvendo as espécies *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum* e espécies do complexo *annuum*.

Combinação híbrida	? x ?	Viabilidade Polínica (%)
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	UENF 1567 X UENF 1496	95
	UENF 1567 X UENF 1496	95
	UENF 1567 X UENF 1573	93
	UENF 1565 X UENF 1489	96
	<b>Média geral</b>	<b>95</b>
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	UENF 1381 X UENF 1489	96
	UENF 1381 X UENF 1489	82
	UENF 1578 X UENF 1573	94
	UENF 1578 X UENF 1573	92
	<b>Média geral</b>	<b>91</b>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> x <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>		96
	UENF 1489 X UENF 1569	
	UENF 1496 x UENF 1562	75
	UENF 1496 X UENF 1562	36
	<b>Média geral</b>	<b>69</b>
<i>C. frutescens</i> x <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	UENF 1425 X UENF 1573	22
	UENF 1425 X UENF 1490	8
	<b>Média geral</b>	<b>15</b>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> x <i>C. frutescens</i>	UENF 1496 X UENF 1561	58
	UENF 1489 X UENF 1560	70
	UENF 1489 X UENF 1560	39
	UENF 1489 X UENF 1561	33
	UENF 1489 X UENF 1561	56
	UENF 1489 X UENF 1561	50
	UENF 1492 X UENF 1425	53
	UENF 1596 X UENF 1561	47
	UENF 1596 X UENF 1561	44
	<b>Média geral</b>	<b>50</b>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> x <i>C. chinense</i>	UENF 1573 X UENF 1555	29
	UENF 1573 X UENF 1555	21
	<b>Média geral</b>	<b>25</b>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> x <i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	UENF 1500 X UENF 1576	33
	UENF 1500 X UENF 1576	32
	<b>Média geral</b>	<b>32,5</b>

<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i> x <i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	UENF 1495 X UENF 1575	36
	UENF 1584 X UENF 1562	34
	<b>Média geral</b>	<b>35</b>

Em estudos citogenéticos que envolvam uma grande quantidade de acessos, várias espécies de um mesmo gênero ou mesmo gêneros afins, podem ser encontrados, freqüentemente, genótipos com diferentes números básicos de cromossomos e diferentes níveis de ploídias, fatores que obviamente comprometem o cruzamento entre as espécies. No entanto, considerando que as espécies do gênero *Capsicum* pesquisadas nesse trabalho são diplóides, favorecendo um comportamento meiótico regular, esperava-se que a viabilidade polínica dos híbridos em estudo revelasse comportamentos semelhantes aos pais. Barreiras de hibridação em espécies que possuem o mesmo número de cromossomos foram estudadas por Tong e Bosland (2003), em trabalho realizado sobre a compatibilidade interespecífica de *Capsicum buforum* ( $2n=26$ ) e *Capsicum ciliatum* ( $2n=26$ ). De acordo com os autores, foi possível verificar a ocorrência de um comportamento irregular dos cromossomos na meiose do cruzamento de *C. lanceolatum* ( $2n=26$ ) com outras espécies de *Capsicum* ( $2n=24$ ), indicando a ocorrência de problemas no pareamento dos cromossomos e também sugerindo que *C. lanceolatum* pode não estar envolvido em nenhum dos três complexos conhecidos (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*), o que pode dificultar a obtenção de híbridos viáveis. Porém, mesmo quando *C. lanceolatum* foi cruzado com uma espécie que possuía igual número básico de cromossomos, *Capsicum ciliatum* ( $2n=26$ ), constatou-se a ocorrência de barreiras de hibridação, impossibilitando a obtenção de plantas viáveis.

Para Pickersgill (1991), uma presumível explicação para a meiose irregular entre espécies que possuem o mesmo número de cromossomos está relacionado à ocorrência de quebras cromossômicas as quais seguidas de rearranjos cromossômicos, particularmente as translocações que ocorreram durante o processo de especiação das diferentes espécies do gênero e, em uma menor extensão, dentro da espécie, e de acordo com a literatura, materiais com translocações apresentam viabilidade polínica reduzida, considerando os diferentes tipos de configurações durante a meiose (Singh, 1993).

### 3.3.6 CONCLUSÕES

De modo geral, a viabilidade polínica dos grãos de pólen dos acessos em estudo apresentou valores variando de médios a altos não podendo ser atribuída à essa característica a dificuldade na obtenção de frutos em certas combinações interespecíficas.

No estudo da viabilidade polínica dos híbridos interespecíficos os maiores valores médios resultaram do cruzamento entre as espécies *C. annuum* x *C. baccatum*, *C. chinense* x *C. annuum* e *C. chinense* x *C. frutescens*, e as menores médias encontradas referem-se as combinações envolvendo a espécie *C. baccatum* com as *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. annuum glabriusculum*, indicando a esterilidade parcial dos híbridos.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo infere-se que as barreiras existentes na obtenção de certas combinações híbridas ocorrem provavelmente devido à falta de homologia cromossômica no híbrido, causando a esterilidade completa ou parcial do mesmo; assim, conclui-se que são barreiras pós-zigóticas que não permitem a obtenção de híbrido férteis entre essas espécies.

### 3.3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. P. (1969) Differential Staining of Aborted non Aborted Pollen. *Stain Technology* 44; 117-122.

CASALI, V. W. D. (1970). Cruzamentos Interespecíficos no gênero *Capsicum*. Universidade Federal de Viçosa, pág 03-07. Tese Doutorado. Viçosa.

CHOONG, C. Y. (1998). DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in *Capsicum*. PhD Thesis, University of Reading.

CRUZ, C. D. (2001). Programa Genes, Aplicativo Computacional em Genética e Estatística, Viçosa: UFV, 2001, 648p.

DAFNI, A. (1992) Pollination ecology - a practical approach. Oxford University Press Inc. New York, 1a. ed., 250 p.

ESHBAUGH, W. H. (1993). Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J. & J. E. Simon (Eds), *New Crops*, p.132-139. John Wiley and Sons, Inc., New York.

FILGUEIRA, F. A. R. (2000). Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças-Viçosa: UFV, 402p.:il.

HARLAN, J. R.; DE WET J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20:509-517.

KUMAR, A. O.; PANDA, R. C.; RAJA, R. K. G. (1987). Cytogenetic studies of the hybrids of *Capsicum annum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, Volume 74, Issue 2, Jun 1987, Pages 242-246.



- LANTERI, S. PICKERSGILL, B. (1993). Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq., *Euphytica*, v. 67, Issue 1-2, Jan 1993, Pages 155 - 160.
- MOOR, C. W. (2003). Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto; Implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Piracicaba. Tese (Doutorado). 184p.
- ONUS, A.; PICKERSGILL, B. (2004). Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution *Annals of Botany* 94: 289–295.
- PICKERSGILL, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T, Gupta, PK, eds. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Part B. Amsterdam: Elsevier, 139–160.
- PICKERSGILL, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, v. 96, p. 129-133.
- 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*, v.151, p. 259–269.
- PRESTES, A. M.; GOULART, L. R. (1995). Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *RAPP* 3: 315-363.
- SINGH, R. J. (1993). *Plant Cytogenetics. The Handling of Plant Chromosomes*. 391 p.
- SMITH, P. G. HEISER C. B. (1957). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *Am. Jour. Bot.* p. 62-68.
- TANKSLEY, S. D. IGLESIAS-OLIVAS, J. (1984). Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinense* in to *Capsicum annuum*. *Euphytica* Volume 33, Number 3. November 1984. Pages: 769 - 777.

TONG, N.; BOSLAND, P. W. (1999). *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, v. 109, p. 71-77.

TONG, N.; BOSLAND, P. W. (2003). Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. v. 50, p. 193–199.

WAGNER, C. M. (2003). Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto; Implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Piracicaba 2003. 184p.

ZIJLSTRA, S. C.; PURIMAHUA, C.; LINDOUT, P. (1991). Pollen tube growth in interespecific crosses between *Capsicum* species. *Hortscience*, v. 26, p. 585–586.

YOON, J. B. (2003). Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding pepper (*Capsicum annuum*) resistant to anthracnose. Ph.D. Thesis. Seoul National University, Korea.

### **3.4 GERMINAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN *IN VIVO* E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Capsicum*.**

#### **3.4.1 RESUMO**

Este trabalho objetivou estudar a germinação dos grãos de pólen e desenvolvimento *in vivo* do tubo polínico em combinações híbridas entre cinco espécies de *Capsicum*, que não produziram híbridos viáveis, com a finalidade de identificar possíveis barreiras de incompatibilidade entre as espécies. Para análise da germinação e do crescimento, realizou-se, primeiramente, cruzamentos artificiais. Pistilos polinizados foram coletados 2h, 4h, 6h, e 8h após a polinização em solução de FAA. Posteriormente, os pistilos foram amaciados em hidróxido de sódio 8N, corados em solução de acetato de potássio com anilina azul 0,1% e observados sob microscópio óptico fluorescente. Como controle foram realizadas autopolinizações nos acessos representantes das espécies envolvidas nos cruzamentos. Os resultados referentes à germinação do tubo polínico revelaram que estes foram observados no estilete e mesmo no ovário das combinações não efetivas, sugerindo que é possível que a maioria dos problemas relacionados à hibridação interespecífica dos cruzamentos entre as cinco espécies de *Capsicum* seja resultado da ocorrência de barreiras de pós- fertilização.

### 3.4.2 ABSTRACT

The germination of pollen grain and development of the pollen tube in hybrid combinations was evaluated *in vivo* to identify possible incompatibility barriers between *Capsicum* species which were not viable or whose fruits had no viable seeds. Artificial crosses between the species and selfings were therefore performed. Pollinated/autopollinated pistils were collected 2h, 4h, 6h, and 8h after pollination in FAA solution. The pistils were then ground in sodium hydroxide (8N), dyed in potassium acetate solution with aniline blue 0.1% and observed under a fluorescence microscope. Results of pollen grain germination and pollen tube growth showed that these were observed in the style and even the ovary of the non-viable combinations, suggesting that most problems related to the interspecific hybridization of crosses among the five *Capsicum* species could be result of the occurrence of post-fertilization barriers.

### 3.4.3 INTRODUÇÃO

O processo de hibridação interespecífico é considerado uma metodologia eficaz, amplamente empregada em programas de melhoramento que visam introduzir genes de uma espécie silvestre para uma cultivada. Entretanto, cruzamentos interespecíficos podem ser inviáveis devido à ocorrência de um conjunto de barreiras pré e pós-zigóticas. A presença de barreiras de incompatibilidade entre as espécies pode se manifestar pela ausência de germinação do grão de pólen no estigma, retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico até o ovário, degeneração do endosperma e morte do embrião, impedindo, desse modo, a formação do híbrido (Prestes e Goulart, 1995).

De acordo com Choong (1998), três grandes grupos foram formados entre as espécies de *Capsicum*. Segundo o autor, espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* constituem o complexo *annuum*, *C. baccatum* forma um segundo complexo juntamente com *C. pratermissum* e por fim, as espécies *C. eximium*, *C. cardenasii* e *C. pubescens* compõem o complexo *pubescens*. A formação desses complexos foi fundamentada a partir da estrutura dos cromossomos, bandeamento isoenzimático e polimorfismo de DNA cloroplástico, sendo que a compatibilidade de cruzamentos entre espécies de um mesmo grupo é tida como viável entretanto, para cruzamentos entre complexos distintos, limitações são comuns, devido à ocorrência de barreiras interespecíficas.

Em espécies de *Capsicum*, a literatura relata vários problemas relacionados à incompatibilidade entre as espécies. Em suas pesquisas Pickersgill (1991) afirmou que após a fertilização, o aborto do embrião é uma característica comum em cruzamentos interespecíficos no gênero *Capsicum*.

Segundo Kumar *et al.* (1987), cruzamentos entre diferentes espécies podem acarretar híbridos parcialmente férteis ou totalmente estéreis. Para Yoon *et al.* (2006), a ocorrência de diferentes números cromossômicos nos genitores em cruzamentos pode causar incompatibilidade, aborto de híbridos e esterilidade.

A germinação e o crescimento do tubo polínico devem ser considerados um fator primordial a ser estudado em combinações interespecíficas, uma vez que, em híbridos interespecíficos, a ocorrência de grão de pólen na superfície estigmática não implica necessariamente no seu crescimento através do tubo polínico. Desse modo, testes de germinação dos grãos de pólen, bem como o crescimento do tubo polínico, *in vivo*, podem ajudar a elucidar as razões do insucesso na obtenção de algumas combinações híbridas (Kearns e Inouye, 1993).

Considerando-se que em algumas combinações oriundas de hibridação interespecífica em *Capsicum* não obteve-se resultados positivos, a presente pesquisa foi desenvolvida objetivando-se avaliar a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico nas combinações híbridas não efetivas.

### 3.4.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.4.1 Material Genético Vegetal

Para o estudo da germinação e crescimento do tubo polínico nas espécies utilizou-se os acessos *Capsicum annuum* var. *annuum* (UENF1578 pimentão), *Capsicum chinense* (UENF 1555), *Capsicum frutescens* (UENF1425), *Capsicum baccatum* var. *baccatum* (UENF1495), *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (UENF 1573) e *Capsicum pubescens* (UENF 1574).

Os acessos em estudo foram cultivados em casa de vegetação na Unidade de Apoio a Pesquisa (UAP) no *campus* da UENF, em vasos de quatro litros e meio. 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).

A avaliação da germinação dos grãos de pólen, emissão e crescimento do tubo polínico foram realizados em combinações híbridas que não foram viáveis ou que apresentaram número reduzido de sementes quando em cruzamento. As seguintes combinações foram testadas: *C. frutescens* (UENF 1425) x *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1503 pimenta), *C. frutescens* (UENF 1588) x *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1576), *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1578) x *C. frutescens* (UENF 1560), *C. chinense* (UENF 1553) x *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF1495), *C. frutescens* (UENF 1561) x *C. chinense* (UENF 1555), *C. frutescens* (UENF 1588) x *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1489), *C. annuum* var. *annuum* (UENF1575) x *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1584).

A temperatura ambiente durante o período em que se efetuou a coleta dos botões florais variou entre 26° a 38,5°C.

### 3.4.4.2 Procedimentos Laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais foram executados no Setor de Citogenética do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF.

Para a análise da germinação dos grãos de pólen e do crescimento do tubo polínico *in vivo*, polinizações manuais controladas e autofecundações foram realizadas e após períodos de duas, quatro, seis e oito horas após a polinização os pistilos polinizados foram coletados. Utilizou-se cinco botões florais por horário, constituindo cinco repetições, totalizando vinte botões florais para cada combinação.

Os pistilos coletados foram fixados em FAA (formalina, ácido acético e álcool) em cada horário especificado anteriormente, onde permaneceram por 24 horas; posteriormente, os pistilos polinizados foram lavados três vezes em água destilada e conservados em álcool 70 %. Após essa etapa os pistilos foram amaciados em hidróxido de sódio 8N por 3 horas, novamente lavados em água destilada e corados em solução de anilina azul 0,1% em acetato de potássio durante 4 horas (Dafni, 1992). Em seguida a esse procedimento, separou-se os 5 botões florais em duas partes, a primeira constando do estigma e estilete e a segunda do ovário, sendo feitas 10 lâminas por horário testado. Os pistilos foram observados utilizando-se microscopia óptica de fluorescência. A avaliação constou na observação dos grãos de pólen germinados no estigma e na presença de tubos polínicos no estilete e no ovário.



### 3..4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação dos grãos de pólen nos tempos estudados foi semelhante para os acessos representantes das espécies *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. A germinação dos grãos de pólen, a emissão do tubo polínico e o crescimento do tubo polínico através do estilo foi verificada no primeiro horário, ou 2 HAP. A chegada do tubo polínico no ovário, nas três espécies, foi observada com clareza no terceiro horário de coleta, ou seja, 6 HAP. Foi possível verificar que para as três espécies, a germinação dos grãos de pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico através do estilo para posterior fecundação do óvulo não são comprometidos por nenhum tipo de reação de incompatibilidade.

A autopolinização realizada nas espécies *C. baccatum* (variedades *pendulum* e *baccatum*) mostrou que a germinação dos grãos de pólen no estigma mostrou-se mais lenta em relação as espécies do complexo *annuum*. Para essa espécie, a germinação no estigma começou a ser observada quatro a seis horas após a polinização e a presença do tubo polínico no ovário foi comprovada oito horas após a polinização.

Em relação à espécie *C. pubescens*, não foi observado a presença de tubos polínicos no estilete e no ovário. Nos quatro horários testados apenas foi visualizada a presença de pólen aderido ao estigma. Este fato pode ser relacionado à temperatura, uma vez que *C. pubescens* é endêmica de regiões predominantemente frias, e as condições em que foi cultivada no presente estudo são totalmente atípicas para o seu desenvolvimento, (Erickson e Markhart, 2002). Além disso, é comum a ocorrência de acessos auto-incompatíveis nessa espécie (Ônus e Pickersgill, 2004). Saborio Mora (1989) em seu trabalho sobre auto-

incompatibilidade em *C. pubescens* concluiu que as 13 variedades de *C. pubescens* mostraram variação quanto à reação de auto incompatibilidade, sendo que o autor constatou a existência de variedades auto-incompatíveis, parcialmente auto-incompatíveis e autocompatíveis.

Na maioria das combinações interespecíficas foi observado grãos de pólen germinando no estigma e tubos polínicos, crescendo no estilete até atingir o ovário nos horários estudados. No cruzamento *C. annuum* versus *C. frutescens* e recíproco observou-se que a germinação dos grãos pólen e a emissão e crescimento do tubo polínico em direção ao ovário ocorreu 8 HAP. Embora não tenha sido observada a presença de tubos polínicos no ovário 8 HAP, essas combinações produziram sementes, porém totalmente inviáveis, seja pela pequena quantidade de endosperma, onde parte da semente encontrava murcha, ou pela ausência total de endosperma. Para Nettancourt *et al.* (1974) em alguns cruzamentos interespecíficos, a incompatibilidade ocorre devido à ausência de germinação dos grãos de pólen no estigma ou a falta de emissão e crescimento do tubo polínico no estilete, caracterizando, a ocorrência de barreiras pré-zigóticas. Entretanto, como foi possível constatar a presença de tubos polínicos em direção ao ovário do híbrido e recíproco, pode-se concluir que a presença de barreiras pós-zigóticas nestas combinações provocam a degeneração do endosperma e, conseqüentemente, a morte do embrião híbrido (Barbano e Topoleski, 1984), explicando, desse modo, o grande número de sementes inviáveis obtidas nesses cruzamentos.

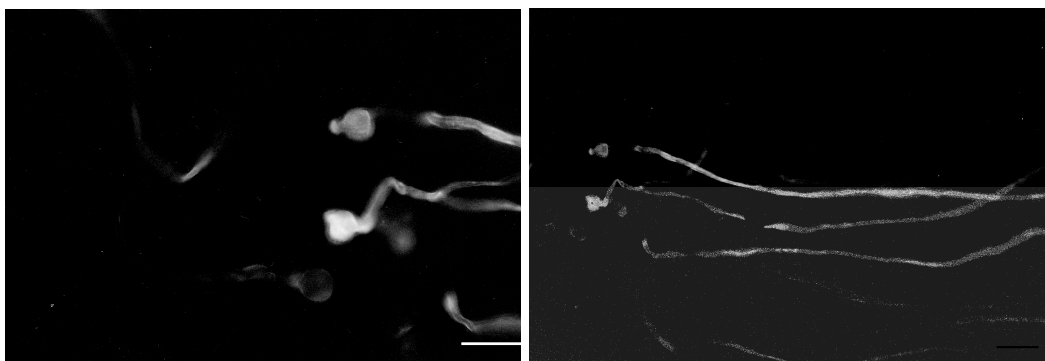
No cruzamento entre *C. frutescens* com *C. annuum* var. *glabriusculum* foi observado que 4 HAP os tubos polínicos cresciam normalmente através do estilete, porém as sementes produzidas nesta combinação apresentaram-se inviáveis, com supressão de endosperma. Observações semelhantes foram obtidas por Barbano e Topoleski (1984), que trabalhando com cruzamentos interespecíficos entre *L. peruvianun* versus *L. esculentum*, observaram a produção de um número expressivo de sementes inviáveis, atribuindo esse resultado à degeneração do endosperma. De acordo com Kapil e Tawain (1978), ausência de endosperma e proliferação endotelial são comumente observados em cruzamentos interespecíficos, provavelmente devido à singamia incompleta entre as espécies.

No cruzamento *C. frutescens* (UENF1588) x *C. baccatum* (UENF1489) a germinação dos grãos de pólen no estigma evidenciou-se 4 HAP, iniciando um crescimento lento dos tubos polínicos no estilete no terceiro horário testado, sendo que esse desenvolvimento pareceu estagnado até 8 HAP. Inúmeras combinações de acessos diferentes envolvendo essas duas espécies foram testadas em condições de campo, revelando diferentes graus de fertilidade. Um considerável número de combinações produziu sementes com deficiência de endosperma, tamanho, coloração e formato anormais e, principalmente, com ausência de embrião. Este fato confirma que as barreiras que dificultam a obtenção de híbridos viáveis entre essas duas espécies ocorrem após a fertilização. A provável causa do aborto do embrião em estado prematuro de desenvolvimento pode ser devido à ausência do endosperma e também à incompatibilidade genética, o que causaria falhas no seu desenvolvimento (Rodrangboon *et al.*, 2002)

A presença de tubos polínicos crescendo nos cruzamentos entre *C. annuum* versus *C. baccatum* indica que não existe um sistema de incompatibilidade que impeça a germinação dos grãos de pólen, crescimento dos tubos polínicos, ou mesmo a penetração nos óvulos. Esses resultados corroboram com as informações de Yoon (2006), o qual verificou que em todas as combinações entre as espécies *C. annuum* e *C. baccatum* os grãos de pólen germinaram normalmente e o tubo polínico desenvolveu-se através do estilete até o ovário sem maiores problemas. Observou-se em condições de campo que nessas combinações foram obtidos frutos com sementes inviáveis, devido à ausência de endosperma, indicando que dificuldades relacionadas ao cruzamento entre esses acessos ocorrem pós-fertilização. Resultados semelhantes foram observados por Yoon (2006), que encontrou, nessas combinações, sementes contraídas onde nenhum embrião se desenvolveu. Segundo Pagliarini e Pozzobon (2004), um aspecto importante e que deve ser considerado na utilização de germoplasma em cruzamentos interespecíficos é a afinidade entre os genomas parentais. A similaridade genômica facilita a recombinação durante a meiose. De acordo King *et al.* (1999), um elevado grau de pareamento entre os cromossomos garante que o conjunto gênico de ambos os genitores possa ser permutado.

Na combinação híbrida *C. chinense* x *C. baccatum* verificou-se a presença de grãos de pólen no estigma em todos os horários, evidenciando-se a permanência dos tubos polínicos na parte superior do estilete, demonstrando a possível existência de uma barreira de incompatibilidade. Constatou-se que, em condições de campo, embora esse cruzamento tenha sido realizado inúmeras vezes, não foi possível a obtenção de frutos. Normalmente, em um cruzamento incongruente, a ocorrência de barreiras pré e pós zigóticas são causadas pelo isolamento entre as espécies, gerando distúrbios em cruzamentos interespecíficos pelo não reconhecimento de parte das informações genéticas de um genitor pelo outro. Para Kerlan *et al.* (1992), em um processo normal de polinização, o grão de pólen adere ao estigma e inicia-se a atividade metabólica com a germinação do tubo polínico. No caso de genitores incompatíveis, ocorre uma reação de calose na superfície do estigma e a formação de tubos polínicos distorcidos podem revelar a ocorrência de uma barreira pré- zigótica.

Na polinização cruzada entre *C. frutescens* x *C. chinense* coletas realizadas 2 HAP demonstraram grãos de pólen germinando no estigma, sendo constatado a presença de tubo polínico no estilete 6 HAP (Figura 1).



**Figura 1.** Germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico em cruzamento interespecífico de *C. frutescens* (UENF1561) x *C. chinense* (UENF 1555) em Microscopia de Fluorescência. Barra: 50µm.

Estudos sobre hibridação interespecífica mostraram estreita relação de *C. chinense* e *C. frutescens*, sendo que Casali (1970) obteve plantas híbridas e recíprocas viáveis. Smith e Heiser (1957) argumentaram que o cruzamento entre essas espécies é possível em ambas direções, no entanto, os autores observaram variações entre 12 a 72% de grãos pólen férteis nas plantas obtidas

do cruzamento entre essas espécies. Pickersgill (1966), realizando estudos de morfologia e hibridação interespecífica em *Capsicum*, demonstrou que *C. chinense* e *C. frutescens* são bastante próximas, apresentando, de modo geral, alto grau de compatibilidade.

### 3.4.6 CONCLUSÕES

No presente estudo concluiu-se que a germinação do grão de pólen sobre o estigma, o crescimento dos tubos polínicos através do estilete e posteriormente a chegada desses no ovário nos acessos representantes das espécies *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. chinense* e *C. frutescens* e *C. frutescens* são normais, não sendo comprometidos por nenhum tipo de reação de incompatibilidade

Baseado na análise da germinação dos grãos de pólen e no crescimento do tubo polínico, supõe-se que nas combinações híbridas inviáveis os maiores problemas estão relacionados à presença de barreiras pós-zigóticas, causando, de modo geral, uma degeneração do endosperma e posteriormente a morte do embrião.

### 3.4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBANO, P. P.; TOPOLESKI, L. D (1984). Post fertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovule. Journal American Society Horticultural Science, v. 109, p. 95-100.

CASALI, V. W. D. (1970). Cruzamentos Interespecíficos no gênero *Capsicum*. Universidade Federal de Viçosa, p. 03-07. Tese Doutorado. Viçosa-MG

CHOONG, C. Y. (1998). DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in *Capsicum*. University of Reading, PhD Thesis.

DAFNI, A. (1992). Pollination ecology - A practical approach. Oxford University Press Inc. New York, 1ª ed., 250 p.

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, v.25, p.123-130.

FILGUEIRA, F. A. R. (2000). Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 402p.:il.

KAPIL, R. N. ;TAWARI, S. C. (1978). The integumentary tapetum. Botanic Review, v.44, p.457-490.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. (1993). Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Niwot.

KERLAN, M. C.; CHEVRE, A.M.; EBER, F.; BARANGER, A.; RENARD, M. (1992). Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species. Inter-specific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica*, v.62, p.145-153.

KING, I. P.; MORGAN, W. E.; HARPER, J. A.; THOMAS, H. M. (1999). Introgression mapping in the grasses. II meiotic analysis of the *Lolium perenne*/*Festuca pratensis* triploid hybrid. *heredity*, Edinburgh, v..82, p 107-112.

KUMAR. A. O.; PANDA, R. C.; RAJA, R. K. G. (1987). Cytogenetic studies of the hybrids of *C. annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. TAG Theoretical and Applied Genetics, Volume 74, Issue 2, Jun 1987, Pages 242 - 246.

NETTANCOURT, D.; DEVREUX, M.; LANERI, U.; CRESTI, M.; PACINI, E.; SARFATTI, G. (1974). Genetical and ultrastructural aspects of the self and cross incompatibility in inter-specific hybrids between self-compatible mechanism in *Lycopersicon esculentum* self-incompatible *L. peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 44, p. 278-288.

ONUS, A. N.; PICKERSGILL, B. (2004). Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution *Annals of Botany*, v. 94: p.289–295.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. (2004). Meiose em Vegetais: Um enfoque para a caracterização de germoplasma. II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais. 8 a 12 de novembro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, D.F

PICKERSGILL, B. (1966). The Variability and relationships of *Capsicum chinense* Jacq. Indiana University. 98p. (Tese de Ph.D).

PICKERSGILL, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T, Gupta, PK, eds. Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. Amsterdam: Elsevier, p.139–160.



PRESTES, A. M.; GOULART, L. R. (1995) Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. RAPP v.3, p. 315-363.

RODRANGBOON, P.; PONGTONGKAN , P.; SUPUTTITABA, S.; ADACHI, T. (2002). Breeding Science. v: 52: p .123-129.

SABORIO MORA, M. H. D. S. (1989). Auto-incompatibilidade em *Capsicum pubescens* ruiz e pavon. Piracicaba, 69p. Dissertação (Mestrado).

SMITH, P. G. HEISER C. B. (1957) Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. Am. Jour. Bot, p. 62-68.

YOON, J. B.; YANG, D. C.; DO, J. W.; PARK, H. G. (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interespecific hibridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of Antracnose Resistance. Breeding Science, v. 56: p. 31-38

#### 4 RESUMO E CONCLUSÕES

Espécies do gênero *Capsicum* são importantes hortaliças consumidas na forma *in natura* ou em diversas linhas de produtos na indústria de alimentos, prevalecendo como especiarias de significativo valor no mercado no mundial. A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias em expressiva parte do território nacional.

Estudos científicos com pimenta e pimentão encontram-se em estágio bastante avançado no Brasil. Segundo Blank (1997), a ocorrência de uma grande diversidade de materiais genéticos dentro do gênero *Capsicum* tem favorecido e possibilitado sua utilização em programas de melhoramento da cultura. Esses utilizam as espécies silvestres como fontes de genes que são introduzidos nas espécies cultivadas através da hibridação interespecífica. Para que o procedimento seja bem sucedido é necessário que as espécies sejam geneticamente próximas para que haja homologia cromossômica, reduzindo assim as chances de resultados negativos.

A transferência de genes úteis através da hibridação interespecífica pode ser limitada por barreiras de incompatibilidade pré e pós fertilização. As barreiras de pré-fertilização resultam do retardamento ou inibição do crescimento do tubo polínico e da falta de germinação do grão de pólen. Após a fertilização, as principais barreiras são a morte do embrião devido à degeneração do endosperma e a esterilidade total ou parcial das plantas híbridas (Prestes e Goulart, 1995). Hogenboom (1975) cita a incongruidade como um dos principais problemas ocorridos na formação de híbridos interespecíficos e a define como uma barreira pré ou pós zigótica, causada pelo isolamento entre espécies, gerando distúrbios

em cruzamentos interespecíficos devido ao não reconhecimento de parte das informações genéticas de um genitor pelo outro.

No presente estudo, foi realizado o cruzamento interespecífico entre as cinco espécies cultivadas de *Capsicum*, avaliando a possibilidade de obtenção de híbridos F<sub>1</sub> viáveis, para posteriormente caracterizá-los a partir de dados moleculares, morfológicos e citogenéticos.

Foi possível concluir que a obtenção de frutos interespecíficos entre *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum* é viável, porém sementes híbridas viáveis são restritas a cruzamentos entre determinados acessos. Verificou-se também que cruzamentos interespecíficos entre *C. pubescens* e as demais espécies, para as condições do presente estudo, não foram efetivas.

A análise das hibridações interespecíficas permitiu concluir que as melhores combinações híbridas ocorreram a partir de cruzamentos entre acessos de *C. chinense* x *C. annuum*, *C. baccatum* x *C. annuum* e *C. chinense* x *C. frutescens*. Constatou-se também que cruzamentos entre as espécies *C. baccatum* x *C. chinense* e *C. frutescens* x *C. baccatum* resultaram em plantas com frutos deformados e com baixo número de sementes.

Por fim, com base na análise da germinação dos grãos de pólen e do crescimento do tubo polínico, verificou-se que, nas combinações híbridas inviáveis, a maior parte das barreiras de incompatibilidade ocorrem após a fertilização.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. A., VERKERK, K. (1968). Growth flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth. J. Agric. Sci.*, v. 16, p.71-76

ABDULLAH, G.; COUMANS, M.; VILLEMUR, P.; JONARD, R. (1979). Intergeneric hybridization between *Poncirus trifoliata* and *Citrus meyeri* or *Tangelo nova*: determination by electrophoresis of zygotic or nucellar embryos from the cross *P. trifoliata* x *Tangelo nova*. *Fruits, Paris*, v.45, n.6, p.591-597, 1979.

ALEXANDER, M. P. (1969). Differential Staining of Aborted non Aborted Pollen. *Stain Technology* 44; 117-122.

ALZATE-MARIN, A. L.; BAÍA, G. S.; MARTINS FILHO, S.; PAULA JUNIOR, T.J. de; SEDIYAMA, C. S.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A.(1996). Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plants from crosses between closely related progenitors. *Brazilian Journal of Genetics*, v.19, n.4, p.621-623, 1996.

ANDRASFALVY, A. CSILLERY, C. (1953), Cytoplasmic systems of interspecific hybrids in *Capsicum*, reconsidered. *Proceedings Vth Meeting Capsicum and Eggplant Working Group of Eucarpia*, 4-7 July, Plovdiv, Bulgaria p. 18-20.

ARNEDO-ANDRES, S.; GIL- ORTEGA, R.; LUIS-ARTEAGA, M.; HORMAZA, I. (2002). Development of RAPD and SCAR markers linked to the Pvr4 locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, 105(6-7), p. 1067-1074.

AVELAR, A. (2005). Cultivo Ardido. Encontro Rural. Pág 60-62 outubro de 2005.

BALLESTER, J. VICENTE, C. M. (1998). Determination of F1 hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica*, Volume 103, Number 2 January 1998, Pages: 223 – 226.

BALLVE, R. M. L.; BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.M.; SIQUEIRA, W. J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. T.; POMPEU JÚNIOR, J. (1991). Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucelares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v. 50, n.1, p.57-76, 1991.

BARBANO, P. P.; TOPOLESKI, L. D (1984). Post fertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon peruvianum* ovule. *Journal American Society Horticultural Science*, v. 109, p. 95-100.

BARBOSA NETO, J. F.; BERED, F. (1998). Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, 1998. P. 29-41. 141p.

BIANCHETTI, L.B. (1996). Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil. Brasília: UNB, 174p. Dissertação-Mestrado.

BLANK, A. F; SOUZA, R. J. de.; GOMES, L. A. A. (1995). Produção de pimentão em estufa. Lavras: UFLA, 15p. (Boletim, 55).

BLANK, A. F. (1997). Teste precoce da capacidade combinatória de linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Lavras: UFLA, 71 p: il. Tese – Doutorado.

BORÉM, A. (1997). Melhoramento de Plantas. Viçosa, UFV. 1997.547p.

BORÉM, A. (1998). Melhoramento de plantas 2 Viçosa. Editora UFV. 453p

- BOSLAND, P. W. (1996). *Capsicum*: Innovative Uses of an Ancient Crop. Arlington, VA: ASHS Press, p.479-487.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. e DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32:314-331.
- BROOKES, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, Amsterdam, v. 234, p. 177-186, 1999.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; HENZ, G. P. (2003). Germoplasm collection of *Capsicum* spp. Maintained by Embrapa Hortaliças (CNPq). *Capsicum and Eggplant Newsletter*. v. 22. p. 17-20.
- CASALI, V. W. D. (1970). Cruzamentos Interespecíficos no gênero *Capsicum*. Universidade Federal de Viçosa, pág 03-07. Tese Doutorado. Viçosa.
- CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. (1984). Origem e botânica de *Capsicum*. Informe agropecuário, v.10, n.113, p. 8-18.
- CHAVES, R. A. (2002). Marcadores Moleculares, técnicas de uso corrente Retirado do site <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/> dia 15/12/2004
- CHOONG, C. Y. (1998). DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in *Capsicum*. PhD Thesis, University of Reading.
- COSTA, F. R. DA.; PEREIRA, T. N. S.; VITÓRIA, A. P.; CAMPOS, K. P. DE.; RODRIGUES, R. SILVA, D. H. DA.; PEREIRA, M. G. (2006). Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 6:18-23, 2006.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. (2003). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2003. 340 p.
- CRUZ, C. D.; (2001). Programa Genes, Aplicativo Computacional em Genética e Estatística, Viçosa: UFV, 2001, 648p.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. (1998). Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (Ed.), Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre, 1998. p.107-116.

DAFNI, A. (1992). Pollination ecology - a practical approach. Oxford University Press Inc. New York, 1<sup>a</sup>. ed., 250 p.

DESHPANDE, A. A.; ANAND, N.; RAMACHANDER, P. R (1988). Ideotype differentiation of horticultural groups in *Capsicum* spp. Genetica Agraria, Roma, v. 42, n. 4, p. 357-364.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

DUVICK, D. N. (1986). Plant breeding: past achievements and expectations for the future. Econ. Bot., v. 40 p.289-297.

EGAWA, Y.; TANAKA, M. (1986). Cytogenetical study of the interspecific hybrid between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*. Japan J. Breed, v. 36, p. 16–21.

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, v.25, p.123-130.

ESHBAUGH, W. H. (1964). A numerical taxonomic and cytogenetic study of certain species of the genus *Capsicum*. Indiana University. 112p. Tese de Doutorado.

ESHBAUGH, W. H. (1983). The genus *Capsicum* in Africa. Bothalia. v.14, n. 3-4, p. 845-848. mar./abr.1983.

ESHBAUGH, W. H. (1993). Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J. & J.E. Simon (Eds), New Crops, p.132–139. John Wiley and Sons, Inc., New York.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. (2003). Uso de Marcadores Moleculares RAPD e Microssatélites Visando a Confirmação da Fecundação Cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. *Agrotrópica*. Ilhéus, v. 15 (1), p. 41–46, 2003.

FERH, W. R. (1987). Principles of cultivar development. New York: MacMillian, V.1, 736p.

FERREIRA, M. E. GRATTAPAGLIA, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 22 p.

FILGUEIRA, F. A. R. (2000). Novo Manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças-Viçosa: UFV, 402p.:il.

FILHO, H. (2002). Pimentas Quentes; [http://www. geosites.com /napavalley 1819/index.htm](http://www.geosites.com/napavalley1819/index.htm) em 18/06/02, página mantida por Ring of Fire.

FLOSS, E. L. (2003). Estratégias de pós-melhoramento. II CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Porto seguro, BA. Anais...

GUO, M.; MOK, M. C.; MOK, D. W. S. (1994). RFLP Analysis of Preferential Transmission in Interspecific Hybrids of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Journal of Heredity*, 85: 174-178.

HARLAN, J. R; DE WET J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20:509-517.

HEISER JUNIOR, C. B. (1979). Peppers, *Capsicum* (Solanaceae). In: SIMMONDS, N. W. (Ed.). *Evolution of crop plants*. London: Longman, p. 265-268, 1979.

HEISER, C. B. (1976). Peppers *Capsicum* (Solanaceae). p. 265-268. In: N.W. Simmonds (ed.), *The evolution of crops plants*. Longman Press, London.



HOGENBOOM, N. G. (1975). Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. Proc. R. Soc. London B. 188: 361-175.

IKUTA, H. (1971). Ensaio de híbridos F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e variedades resistentes vírus de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Revista de Olericultura, Piracicaba, v. 11, p. 64.

INNECCO, R. (1995). Avaliação do potencial agrônômico de híbridos e capacidade combinatória de linhagens de pimentão (*Capsicum annuum* L.). 113 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras MG

IPGRI (1995). Descritores para *Capsicum* (*Capsicum* spp).IPGRI, Roma, 51p.

JACOB, H. J., LINDPAINTNER, K., LINCOLN, S. E., KUSUMI, K., BUNKER, R. K., MAO, Y. P., GANTEN, D., DZAU, V. J., LANDER, E. S. (1991). Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Cell 67: 213-24.

KANG, B. C.; NAHM, S. H.; HUH, J. H.; YOO, H. S.; YU, J. W.; LEE, M. H.; KIM, B. D. (2001). An interspecific (*Capsicum annuum* × *Capsicum chinense*) F<sub>2</sub> linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. TAG Theoretical and Applied Genetics. Issue: Volume 102, Number 4, Date: March 200, Pages: 531-539.

KAPIL, R. N.; TAWARI, S. C. (1978). The integumentary tapetum. *Botanic Review*, v.44, p.457-490.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. (1993). Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Niwot.

KERLAN, M. C.; CHEVRE, A. M.; EBER, F.; BARANGER, A.; RENARD, M. (1992). Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica*, v.62, p.145-153.

KING, I. P.; MORGAN, W. E.; HARPER, J. A.; THOMAS, H. M. (1999). Introgression mapping in the grasses. II meiotic analysis of the *Lolium perenne*/*Festuca pratensis* triploid hybrid. *heredity*, Edinburgh, v..82, p 107-112.

KUMAR, A. O.; PANDA, R. C.; RAJA, R. K. G. (1987). Cytogenetic studies of the hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, Volume 74, Issue 2, Jun 1987, Pages 242 - 246, DOI 10.1007/BF00289975, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00289975>

KUMAR, A. O.; RAMESH C.; PANDA, K. G. ; RAJA, R. (1988). Cytogenetics of interspecific hybrids in the genus *Capsicum* L., *Euphytica*, Volume 39, Issue 1, Sep 1988, Pages 47 – 51

LACERDA, C. A. de; LIMA, J. O. G. de; ALMEIDA, E. C. de; OLIVEIRA, L. M. de (1994). Interferência in vitro de agrotóxicos na germinação e no desenvolvimento do tubo polínico do tomateiro, *Lycopersicum esculentum* Mill., cv. Santa Cruz Kada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.11, p.1651-1656, 1994.

LANTERI, S.; PICKERSGILL, B. (1993). Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq., *Euphytica*, Volume 67, Issue 1 - 2, Jan 1993, Pages 155 - 160.

LINS, T. C. L.; LOURENÇO, R. T.; TAVARES, H. M. F.; REIFSCHNEIDER, F. B.; FERREIRA, M. E.; CORTOPASSI BUSO, G. S. (2001). Caracterização molecular e análise da diversidade genética de acessos de *Capsicum* utilizando marcadores moleculares. [www.sbmp.org.br/cbmp2001/area4/04](http://www.sbmp.org.br/cbmp2001/area4/04). Resumo 158.htm - 11k

LITT, M.; LUTY, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44:398:401.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A. C; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIERA, M. L. C. (2002). Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP): Aspectos Técnicos e Interpretação

Genética. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 29, p. 23-27, 2002.

MAGDALITA, P. M.; DREW, R. A.; ADKINS, S. W.; GODWIN, I. D. (1997). Morphological, molecular and cytological analyses of *carica papaya* x *C. cauliflora* interespecific hybrids. Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 95, p. 224-229, 1997.

MAHAEWARAN, G.; PERRYMAN, T.; WILLIAMS, E. G. (1986). Use of an interspecific hybrids in identifying a new allelic specify generated at the self-incompatibility locus after inbreeding in *Lycopersicon peruvianum*. Theor. Appl. Genet, 50: 391-398.

MAKISHIMA, N. (2000). Horticultura: Em Constante Evolução. A Granja do Ano, pág. 66-75.

MALUF, W. R. (2003). Heterose e Emprego de Cultivares Híbridas de Hortaliças: In 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas Porto Seguro- Bahia 23 a 26 pág 1- 9, abril- 2003.

MESSMER, M. M.; MELCHINGER, A. E.; HERMANN, R. G. (1993). Relationships among early European maize inbreds: I. Comparison of pedigree and RFLP data. Crop Science. v.33, p. 944-950. 1993.

MILACH, S. C .K (2002). Marcadores de DNA. Aplicações no melhoramento de plantas. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento - nº 29, novembro 2002.

MIRANDA FILHO, J. B; GERALDI, I. O. (1984). Adapted model for analysis of partial diallel cross. V.7 p. 667-688, 1984.

MIRANDA, J. E. C. (1988). Análise genética de um cruzamento dialélico em pimentão (*Capsicum annuum* L.). 159 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MONGKOLPORN O.; DOKMAIHOM Y. (2004). Genetic purity test of F1 hybrid *Capsicum* using molecular analysis. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, v. 79, n. 3, p. 449-451(3), May 2004.

MOOR, C. W. (2003). Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto; Implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Piracicaba. Tese (Doutorado). 184p.

MOSCONI, E. A. (1993). Estudios cromosomicos en *Capsicum (Solanaceae)* II. Analisis cariotipico de *C. parvifolium* y *C. annuum* var. *annuum*. Kurtziana 22:9-18.

NAGAI, H. (1983). Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.), visando resistência ao vírus Y. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 1, n. 2, p. 3-9, nov.

NASCIMENTO, I. R.; MALUF, W. R.; VALLE, L.A.C.; MENESES, C. B.; GANDOLFI BENITES, F. R. (2004). Capacidade combinatória e ação gênica na expressão de caracteres de importância econômica em pimentão Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 28, n. 2, p. 253-262, mar./abr., 2004.

NASCIMENTO, W. M.; BOITEUX, L. S.; SATURNINO, M. (1994). Potencial de sementes de pimentão para páprica em Janaúba- MG. Horticultura Brasileira, v.12, n: 2. P. 199-201; novembro.

NETTANCOURT, D.; DEVREUX, M.; LANERI, U.; CRESTI, M.; PACINI, E.; SARFATTI, G. (1974). Genetical and ultrastructural aspects of the self and cross incompatibility in interspecific hybrids between self-compatible mechanism in *Lycopersicon esculentum* self-incompatible *L. peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 44, p. 278-288.

NUEZ VINALS, F.; GIL ORTEGA, R.; COSTA GARCIA, J. (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid; Ediciones Mundi- Prensa, 1996. 607p.

OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. de (2001). Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de Açaizeiro. Acta bot. bras. 15(1): 27-33.

OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. (2001). Freqüência de híbridos em cruzamento entre tangerina-‘Cravo’ e laranja- ‘Pêra’: análise de marcadores morfológicos e RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.35, n.9, p.1895-1903, 2001.

OLIVEIRA, V. R.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D. PEREIRA, P. R. G.; BRACCINI, A. L. (1999) Avaliação da diversidade genética em pimentão através de análise multivariada. *Horticultura Brasileira.*, v.17, n.1, março.

ONUS, A. N.; PICKERSGILL, B. (2004). Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution *Annals of Botany*, v. 94: p.289–295.

OYAMA, K.; HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; SÁNCHEZ, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; GARZÓN-TIZNADO, J.; CASAS, A. (2006). Genetic Structure of Wild and Domesticated Populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Northwestern Mexico Analyzed by RAPDs: Genetic Resources and Crop Evolution, Volume 53, Number 3, May 2006, pp. 553-562(10)

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. (2004). Meiose em Vegetais: Um enfoque para a caracterização de germoplasma. II Curso de Citogenética Aplicada a Recursos Genéticos Vegetais. 8 a 12 de novembro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, D.F.

PARAN, I.; AFTERGOOT, E.; SHIFRISS, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99:167-173.

PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.

PEIXOTO, J. R. (1995). Melhoramento de pimentão (*Capsicum annuum* L.) visando resistência aos nematóides do gênero *Meloidogyne* spp. 103 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

PEREIRA, A. V.; OTTO, R. F.; REGHIN, M. Y. (2001). Efeito da proteção com agrotêxtil na produtividade da cultura do pimentão em Ponta Grossa PR, Horticultura Brasileira, Brasília, v. 19, suplemento CD-ROM, julho.

PETERSON, P. A. (1958). Cytoplasmically inherited male sterility in *Capsicum*. Amer Nat 92: 111-119.

PETROPOULOU, S. P.; ALSTON, F. H. (1998). Selecting for improved pollination at low temperatures in apple. J. Hort.Sci. Biotechnol. 73, 507–512.

PICKERSGILL, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T, Gupta, PK, eds. Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. Amsterdam: Elsevier, p.139–160.

PICKERSGILL, B. (1966). The Variability and relationships of *Capsicum chinense* Jacq. Indiana University. 98p. (Tese de Ph.D).

PICKERSGILL, B. (1971). Relationship between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers, (genus *Capsicum*). Evolution, v. 25, p. 683-691.

PICKERSGILL, B. (1980). Some aspects of interspecific hybridization. In: *Capsicum*. Unpublished and preliminary report at the IV th Eucarpia *Capsicum* working group meetings in Wageningen, The Netherlands.

PICKERSGILL, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp., Euphytica, Volume 96, Issue 1, Jan 1997, Pages 129 -133.

PICKERSGILL, B.; HEISER JUNIOR C. B.; MCNEILL J. (1979). Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*, p. 679-700. In: J.G. Hawkes, R.N. Lester, and A.D. Skelding (eds.). The biology and taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, London.

POYSA, V. (1990). The development of bridge lines for interespecific gene transfer between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. Theoretical and Applied Genetics, v. 79, p. 187-192.

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*, v.151, p. 259–269.

PRESTES, A. M.; GOULART, L. R. (1995). Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *RAPP* v.3, p. 315-363.

PRINCE, J. P.; LACKNEY, V. K.; ANGELES, C.; BLAETH, J. R.; KYLE, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of peppers cultivars. *Genome*, v.38, p 224-231.

RAO, B. N.; SRI VALLI, T.; LAKSHMI, N. (1992). Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L. *C. frutescens* L. and its progeny, *Euphytica*, Volume 59, Issue 2 - 3, Feb 1992, Pages 135 - 140.

RAO, N. B.; VALLI, T. S.; LAKSHMI, N. (1992). Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L. x *Capsicum frutescens* L. and its progeny. *CAB abstracts*. p. 8-24.

REGHIN, M. Y. (1996). Fisiologia do desenvolvimento das hortaliças em ambiente protegido. Botucatu: Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, 12 páginas.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (2000). *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília. 113p.; il.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. (1998). Pepper production and breeding in Brazil, and a word on eggplants, *Capsicum* and *Eggplant Newsletter*, v.17, p.13-18.

RIBEIRO, A. (1987). Herança da pungência em *C. chinense* Jacq. Piracicaba: ESALQ, p.77. Dissertação-Mestrado.

RIBEIRO, C. S. da C.(2005). É fogo!!!.Revista Globo Rural. Edição 231-Jan/05. in:[http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg\\_article\\_print/1,3916,888054-1641-1,00.html](http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_article_print/1,3916,888054-1641-1,00.html)

RIBEIRO, C. S. C.; MELO, R. A. C. (2003). Hibridação Interespecifica entre *Capsicum annuum* e *Capsicum chinense* visando resistência a *Phytophthora capsici*. IN: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Porto Seguro-Bahia; 23 a 26 abril - 2003.

RODRANGBOON, P.; PONGTONGKAN , P.; SUPUTTITABA, S.; ADACHI, T. (2002). Breeding Science. v: 52: p .123-129.

RODRÍGUEZ, J. M.; BERKE, T.; ENGLE, L.; NIENHUIS, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, v. 99, p. 147-156.

SABORIO MORA, M. H. D. S. (1989). Auto-incompatibilidade em *Capsicum pubescens* ruiz e pavon. Piracicaba,, 69p. Dissertação (Mestrado).

SACCARDO, F (1992). Miglioramento del peperone (objective, techniche, program. In colana l'tália agricola. Miglioramento genético Vegetali: Ramo editoriale digliagricoltori, 1992. p. 182-194.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. (1974). A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics, Washington, v. 30, p. 507 - 512.

SHARMA, A. K.; DAS, N. K. (1954). Study of karyotypes and their alterations in aroids. Agronomia Lusitana 16: 2348.

SILVA, A. V. C. DA.; MARTINS, A. B. G.; LEMOS, E. G. M. (2003). Variabilidade Genética entre Diferentes Cultivares de Videira. IN: 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas - Porto Seguro Bahia abril 2003 pg: 549-552 (2748).

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. (2000). Viability evaluation of pollen as possible indicator of high temperature tolerance in tomato genotypes. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, ago. 2000, vol.12, nº.2, p.156-165. ISSN 0103-3131.



SILVA, L.L (2002). Heterose e Capacidade de combinação em cruzamentos dialélicos parciais de Pimentão- Piracicaba - 2002; 82p. Dissertação Mestrado.

SILVA, M. M.; BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. (1999). Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.34, n.3, p.347-352, mar. 1999.

SILVA, M. P. da.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; RODRIGUES, R.; DAHER, R. F.I.; POSSE, S. C. P.(2005). Genetic diversity studies and hybrid identification in snap bean assisted by RAPD markers. *Acta Science Agronomy*, Maringá, v. 27, n. 3, p. 531-539, July./Sept.2005.

SINGH, R. J. (1993). *Plant Cytogenetics. The Handling of Plant Chromosomes.* 391 p.

SIQUEIRA, W. J.; FONSECA, M. I. S.; SONDAHL, M. R. (1988). Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura *in vitro*. *Bragantia*, Campinas, v.47, p.1-8.

SKROCH. P. W.; NIENHUIS J. (1995). Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 91, n. 6-7, p. 1078 – 1085, November. 1995.

SMITH, P. G. HEISER C. B. (1951). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany*, Toronto, p. 62-68, 1951.

SMITH, P. G. HEISER C. B. (1957). Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annum* L. and *C. frutescens* L. *Am. Jour. Bot.* p. 62-68.

SOARES FILHO, W. dos S.; VILARINHOS, A. D.; CUNHA SOBRINHO, A. P.; OLIVEIRA, A. A. R. de; SOUZA, A. da S.; CRUZ, J. L.; MORAIS, L. S.; CASTRO

NETO, M. T. de; GUERRA FILHO, M. dos S.; CUNHA, M. A. P. da; PASSOS, O. S.; MEISSNER FILHO, P. E.; OLIVEIRA, R. P. (1997) *Citrus* breeding program at Embrapa-CNPMPF: development of hybrids. Cruz das Almas : Embrapa-CNPMPF, 1997. 17p. (Embrapa-CNPMPF. Documentos, 74).

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. (2002). Microsporogenesis and microgametogenesis with relation to flower bud and anther size, and pollen viability in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciênc. agrotec.*, Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217, nov./dez.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; RODRIGUES, R.; DUTRA, G.A.; SUDRÉ, C.P. (2000). IRREGULARIDADE MEIÓTICA EM PIMENTA. *Horticultura Brasileira.*, v. 18 p. 748-749.

STEVENS, M. A., RUDICH, J. (1978). Genetic potencial for overcoming physiological limitations on adaptability, yield, and quality in the tomato. *HortScience*, Alexandria, v.13, p.673-78, 1978.

SUDRÉ, C. P. (2003). Divergência genética e avaliação da resistência à mancha bacteriana em *Capsicum* spp. Campos dos Goytacazes: UENF, 112p. Dissertação-Mestrado.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. (2005). Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. *Horticultura Brasileira* 23: 22-27.

TANKSLEY, S. D. IGLESIAS-OLIVAS, J. (1984). Inheritance and transfer of multiple-flower character from *Capsicum chinense* in to *Capsicum annuum*. *Euphytica* Volume 33, Number 3. November 1984. Pages: 769 - 777.

TAVARES, M. (1993). Heterose e estimativa de parâmetros genéticos em um cruzamento dialélico de pimentão (*Capsicum annuum* L.) 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

- TEIXEIRA, R. (1996). Diversidade em *Capsicum*: análise molecular, morfoagronômica e química. Viçosa UFV, p.81. Dissertação-Mestrado.
- TONG, N.; BOSLAND, P. W. (2003). Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. Genetic Resources and Crop Evolution. v. 50, p. 193–199.
- TONG, N.; BOSLAND, P.W (1997). Meiotic chromosome study of *Capsicum lanceolatum*, another 13 chromosome species. *Capsicum* and Eggplant Newsletter 16: 42-43.
- TONG, N.; BOSLAND, P.W. (1999). *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. Euphytica, Wageningen, v. 109, p. 71-77, agosto.1999.
- TONG, N.; BOSLAND, P. W. (2003). Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *Capsicum lanceolatum*. Genetic Resources and Crop Evolution. v. 50, p. 193–199.
- TOQUICA, S. P.; RODRIGUEZ, F.; MARTINEZ, E.; DUQUE, M. C.; TOHME, J (2003). Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germoplasm from the Amazon Department in Colombia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 50, p. 639-647.
- TWELL, D. (1995). Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. Protoplasma, New York, v. 187, p. 144-154, 1995.
- VIÑALS, F. N.; ORTEGA, R. G.; GARCIA, J. C. (1996). El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: Ed Mundi-Prensa, 607p.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. e ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 23:4407-4414.

VOTAVA, E. J.; BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. (2005). Genetic Diversity of Chile (*Capsicum annuum* var. *annuum* L.) Landraces from Northern New Mexico, Colorado, and Mexico. *Journal: Economic Botany* Volume: 59 Issue: 1 Pages: 8-17.

WILLIAMS J. G. K.; KUBELIK A. R.; LIVAK K. J.; RAFALSKI J. A.; TINGEY S. V (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535, 1990.

XAVIER, A. (1996). Aplicação da Análise Multivariada da Divergência Genética no Melhoramento de *Eucalyptus* spp. Viçosa: UFV, 1996. 129 f. Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, MG. Tese de Doutorado

YANG, D. C.(2001) Interspecific hybridization for the breeding of anthracnose-resistant hot pepper lines. M.s thesis, Seoul National University, Korea, 2001.

YAZAWA, S.; SUETOME, N.; OKAMOTO, K.; NAMIKI, T. J. (1989). *Jpn. Soc. Hortic.Sci.*, 58, 601-607.

YOON, J. B. (2003). Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding pepper (*Capsicum annuum*) resistant to anthracnose. Ph.D. Thesis. Seoul National University, Korea.

YOON, J. B.; YANG, D. C.; DO, J. W.; PARK, H. G. (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of Anthracnose Resistance. *Breeding Science* 56: pages: 31-38

ZIJLSTRA, S. C.; PURIMAHUA, C.; LINDOUT, P. (1991). Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. *Hortscience*, v. 26, p. 585–586.











Tabela 5- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas do cruzamento interespecíficos entre *Capsicum baccatum* x *Capsicum annuum*

	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido
Características sementes	Materno 1495	Paterno 1575PM	Híbrido 12 1495B x1575A	Materno 1584	Paterno 1562PT	Híbrido 13 1584 x 1562A	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 14 1500B x1576A
N° sementes/10	529	445	43	476	403	35	169	188	25
Cor das sementes	Amarela clara	Amarela	Amarela clara	Amarela clara	Amarela	Marrom clara	Amarelo	Amarela clara	Marrom clara
Características Flores	Materno 1495	Paterno 1575PM	Híbrido 12 1495B x1575A	Materno 1584	Paterno 1562PT	Híbrido 13 1584 x 1562A	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 14 1500B x1576A
N° de flores por axila	Três ou mais	Uma	Duas	Três ou mais	Uma	Duas	Uma	Três ou mais	Três ou mais
Posição da flor	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Intermediária	Intermediária	Ereta	Ereta	Ereta
Cor da corola	Branca com estrias verdes	Branca	Branca com estrias verdes fortes	Branca com estrias verdes	Branca	Branca com estrias verdes	Branca com estrias amarelas	Roxas	Branca de bordas roxas e estrias marrons
Cor das Anteras	Amarelo-claro	Azul	Amarela Azulada	Amarelo-claro	Azul	Amarela Azulada	Amarela	Roxas	Roxas
Características Frutos	Materno 1495	Paterno 1575PM	Híbrido 12 1495B x1575A	Materno 1584	Paterno 1562PT	Híbrido 13 1584 x 1562A	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 14 1500B x1576A
Construção anular do cálice	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Posição	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Intermediário	Intermediário	Ereto	Ereta	Ereta
Cor do fruto Intermediário	Alaranjado	Alaranjado	Alaranjado	Alaranjado	Alaranjado	Alaranjado	Verde	Roxo	Roxo
Cor do fruto maduro	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho	Vermelho escuro	Vermelho
Forma do fruto	Triangular	Triangular	Triangular	sino	Campanulado	Campanulado	Triangular	Triangular	Triangular
Tipo de epiderme fruto	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Campanulado	Lisa	Lisa	Lisa
Peso Médio de 10 Frutos	8,295	1,812	0,795	6,414	32,791	5,100	5,780	0,305	0,529
Colo na base do fruto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Campanulado	Ausente	Ausente	Ausente
Características Plantas	Materno 1495	Paterno 1575PM	Híbrido 12 1495B x1575A	Materno 1584	Paterno 1562PT	Híbrido 13 1584 x 1562A	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 14 1500B x1576A
Maior largura da copa	97.00cm	49.40cm	73.00cm	97.00cm	61.4cm	73.00	111.00	51,25	59.50
Altura da planta	110.40	43.80	125	77	83.5cm	85.00	118.50	47,00	69
Dias de florescimento	60	41	99	62	47	92	68	41	97
Dias para frutificação	211	132	182	195	152	188	141	127	156
Hábito de crescimento	Ereta	Intermediária	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Intermediária	Ereta
Cor do caule	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde com Roxas	Verde com estrias roxas

**Tabela 6- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas do cruzamento interespecíficos entre *Capsicum baccatum* x *Capsicum annuum***

Características	Progenitores		Híbrido
	Materno	Paterno	Híbrido 15
Sementes	1500	1576PM	1500B x1576A
N° Sementes	169	188	20
Cor das Sementes	Amarelo	Amarela clara	Bege claro
Características Flores	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 15 1500B x1576A
N° de flores por axila	Uma	Três ou mais	Três ou mais
Posição da flor	Ereta	Ereta	Ereta
Cor da corola	Branca com estrias amarelas	Roxas	Branca de bordas roxas e estrias marrons
Cor das Anteras	Amarela	Roxas	Roxas
Características Frutos	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 15 1500B x1576A
Construção anular do cálice	Ausente	Ausente	Ausente
Posição do Fruto	Ereto	Ereta	Ereto
Cor do fruto Intermediário	Verde	Roxo	Roxo
Cor do fruto maduro	Vermelho	Vermelho escuro	Vermelho
Forma do fruto	Triangular	Triangular	Triangular
Tipo de epiderme fruto	Lisa	Lisa	Lisa
Peso Médio de 10 Frutos	5,780	0,305	0,601
Colo na base do fruto	Ausente	Ausente	Ausente
Características Plantas	Materno 1500	Paterno 1576PM	Híbrido 15 1500B x1576A
Maior largura da copa	111.00	51,25	60.00
Altura da planta	118.50	47,00	71.00
Dias de florescimento	68	41	99
Dias para frutificação	141	127	152
Hábito de crescimento	Ereta	Intermediária	Ereta
Cor do caule	Verde	Verde com estrias roxas	Verde com estrias roxas



Tabela 8- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas do cruzamento interespecíficos entre *Capsicum frutescens* x *Capsicum annuum*

	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido
Características Sementes	Materno 1569PT	Paterno 1557	Híbrido 19 1569A x1557F	Materno 1425	Paterno 1576PM	Híbrido 20 1425F x1576A	Materno 1425	Paterno 1565PT	Híbrido 21 1425F x1565A
N° Sementes	202	138	76	320	188	148	320	347	265
Cor da Semente	Amarela clara	Amarela clara	Amarela clara	Amarela	Amarela clara	Bege	Amarela	Amarela	Amarela clara
Características Flores	Materno 1569PT	Paterno 1557	Híbrido 19 1569A x1557F	Materno 1425	Paterno 1576PM	Híbrido 20 1425F x1576A	Materno 1425	Paterno 1565PT	Híbrido 21 1425F x1565A
Número de flores por axila	Uma	Três	Uma	Três ou mais	Três ou mais	Três ou mais	Três ou mais	Uma	Uma
Posição da flor	Intermediária	Intermediária	Ereta	Intermediária	Ereta	Ereta	Intermediária	Intermediária	Intermediária
Cor da corola	Branca com borda Roxa	Amarelo esverdeado	Branca com borda Roxa	Amarelo esverdeado	Roxas	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado	Branca com extremidade Roxa	Amarelo esverdeado
Cor das Anteras	Azul	Azul	Azul	Azul pálido	Roxas	Azul pálido	Azul pálido	Azul	Azul
Características Frutos	Materno 1569PT	Paterno 1557	Híbrido 19 1569A x1557F	Materno 1425	Paterno 1576PM	Híbrido 20 1425F x1576A	Materno 1425	Paterno 1565PT	Híbrido 21 1425F x1565A
Construção anular do cálice	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Posição do fruto	Ereto	Intermediário	Ereta	Intermediário	Ereta	Ereto	Intermediário	intermediário	ereto
Cor do fruto Intermediário	Verde arroxeadado	Verde	Roxo	Verde	Roxo	Verde	Verde	Verde	Verde
Cor do fruto maduro	Vermelho escuro	Vermelho	Vermelho escuro	Vermelho	Vermelho escuro	Vermelho escuro	Vermelho	Vermelho escuro	Vermelho claro
Forma do fruto	Triangular	Elongado	Elongado	Elongado	Triangular	Triangular	Elongado	Triangular	triangular
Tipo de epiderme fruto	Lisa	Semi rugosa	rugosa	Semi rugosa	Lisa	Lisa	Semi rugosa	Lisa	Lisa
Peso Médio de 10 frutos	12,200	0,395	4,188	0,820	0,305	0,746	0,820	4,491	3,796
Colo na base do fruto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Características Plantas	Materno 1569PT	Paterno 1557	Híbrido 19 1569A x1557F	Materno 1425	Paterno 1576PM	Híbrido 20 1425F x1576A	Materno 1425	Paterno 1565PT	Híbrido 21 1425F x1565A
Maior largura da copa	65,00cm	96,00cm	51,00	97,40cm	51,25cm	58,80	97,40	67,00	61,00
Altura da planta	79,00cm	95,00cm	69,40cm	76,50cm	47,00cm	55,00cm	76,50cm	75,00cm	79,75cm
Dias de florescimento	51	72	112	62	41	131	62	46	131
Dias para frutificação	139	126	135	127	127	130	127	129	136
Hábito de crescimento	Ereto	Intermediário	Intermediário	Intermediário	Intermediária	ereto	Intermediário	Ereta	Ereta
Cor do caule	Verde com roxas	Verde	Verde com estrias roxas	Verde	Verde com estrias roxas	Verde	Verde	Verde	Verde

**Tabela 9- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas dos cruzamentos interespecíficos entre *Capsicum frutescens* x *Capsicum annuum***

Características	Progenitores		Híbrido
	Materno	Paterno	Híbrido 22
Sementes	1560	1559PM	1560F x1559A
Nº de sementes	220	170	52
Cor da sementes	Amarela	Amarela clara	Bege
Características	Materno	Paterno	Híbrido 22
Flores	1560	1559PM	1560F x1559A
Número de flores por axila	Três	Uma	Duas
Posição da flor	Intermediária	Ereta	Ereta
Cor da corola	Amarelo esverdeado	Roxa	Amarelo esverdeado
Cor das Anteras	Azul	Roxa	Azul escuro
Características	Materno	Paterno	Híbrido 22
Frutos	1560	1559PM	1560F x1559A
Construção anular do cálice	Ausente	Ausente	Ausente
Posição do Fruto	Intermediária	Ereta	Ereta
Cor do fruto Intermediário	Verde	Roxo	Verde
Cor do fruto maduro	Vermelho escuro	Vermelho	Vermelho escuro
Forma do fruto	Elongado	Triangular	Elongado
Tipo de epiderme fruto	Lisa	Lisa	Lisa
Peso Médio de 10 Frutos	0,903	1,389	0,468
Colo na base do fruto	Ausente	Ausente	Ausente
Características	Materno	Paterno	Híbrido 22
Plantas	1560	1559PM	1560F x1559A
Maior largura da copa	90.00	55.50	42.50
Altura da planta	62.00cm	43.00cm	64.00cm
Dias de florescimento	65	72	120
Dias para frutificação	136	138	145
Hábito de crescimento	Intermediário	Intermediário	ereto
Cor do caule	Verde	Verde com roxas	Verde













<b>Tabela 15- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas do cruzamento interespecíficos entre <i>Capsicum frutescens</i> x <i>Capsicum baccatum</i></b>						
	<b>Progenitores</b>		<b>Híbrido</b>			
Características	Materno	Paterno	Híbrido 37	Materno	Paterno	Híbrido 38
Sementes	1425	1573	1425F x1573B	1492	1425	1492B x1425F
Nº de Sementes/10 frutos	320	245	12	321	320	16
Cor da Sementes	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela	Amarela
Características	Materno	Paterno	Híbrido 37	Materno	Paterno	Híbrido 38
Flores	1425	1573	1425F x1573B	1492	1425	1492B x1425F
Número de flores por axila	Três ou mais	Uma	Uma	Uma	Três ou mais	Duas
Posição da flor	Intermediária	Ereta	Ereta	Ereta	Intermediária	Ereta
Cor da corola	Amarelo esverdeado	Branca com estrias amarelas	Amarelo claro	Branca com estrias claras	Amarelo esverdeado	Amarelo claro com amarelas claras
Cor das Anteras	Azul pálido	Amarela	Azul pálido	Amarelas	Azul pálido	Azul pálido
Características	Materno	Paterno	Híbrido 37	Materno	Paterno	Híbrido 38
Frutos	1425	1573	1425F x1573B	1492	1425	1492B x1425F
Construção anular do cálice	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Posição do fruto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	Ereto	intermediário
Cor do fruto Intermediário	Verde	Amarelo	Amarelo	Laranja	Verde	Laranja
Cor do fruto maduro	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Forma do fruto	Elongado	Triangular	Triangular	Elongado	Elongado	Elongado
Tipo de epiderme fruto	Semi rugosa	Lisa	Lisa	Lisa	Semi rugosa	Semi rugosa
Peso médio de 10 frutos	0,820	3,849	3,433	3,317	0,820	0,650
Coro na base do fruto	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Características	Materno	paterno	Híbrido 37	Materno	Paterno	Híbrido 38
Plantas	1425	1573	1425F x1573B	1492	1425	1492B x1425F
Maior largura da copa	97.40cm	93.00cm	60.00cm	81cm	97.40cm	57.00cm
Altura da planta	76.50cm	77.50cm	97.00cm	98cm	76.50cm	93.50cm
Dias de florescimento	62	66	88	68	62	112
Dias para frutificação	127	137	140	132	127	152
Hábito de crescimento	intermediário	Intermediário	Ereto	Ereto	intermediário	intermediário
Cor do caule	Verde	Verde	Verde	verde	Verde	Verde



**Tabela 17- Características morfológicas de plantas híbridas oriundas do cruzamento interespecíficos entre *Capsicum chinense* x *Capsicum frutescens***

Características	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido	Progenitores		Híbrido
	Materno1	Paterno	Híbrido41	Materno1	Paterno	Híbrido42	Materno2	Paterno	Híbrido43
Sementes	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F
Nº de Sementes/10Frutos	208	138	99	208	138	73	208	138	137
Cor da Sementes	Amarela	Amarela clara	Amarela	Amarela	Amarela clara	Amarela	Amarela	Amarela clara	Amarela
Características Flores	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido
Número de flores por axila	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F
Posição da flor	Uma	Três	Três	Uma	Três	Três	Uma	Três	Três
Cor da corola	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Intermediária	Ereta	Intermediária	Ereta
Cor das Anteras	Esverdeada	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado	Esverdeada	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado	Esverdeada	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado
Características Frutos	Azul	Azul	Azul escuro	Azul	Azul	Azul escuro	Azul	Azul	Azul
Constrição anular do cálice	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido
Posição do Fruto	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F
Cor do fruto Intermediário	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente
Cor do fruto maduro	Ereto	Intermediário	Intermediário	Ereto	Intermediário	Intermediário	Ereto	Intermediário	Intermediário
Forma do fruto	Roxo	Verde	Roxo	Roxo	Verde	Roxo	Roxo	Verde	Verde
Tipo de epiderme fruto	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Vermelho claro	Vermelho	Vermelho	Vermelho
Peso Médio de 10 frutos	Triangular	Elongado	Elongado	Triangular	Elongado	Elongado	Triangular	Elongado	elongado
Colo na base do fruto	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa	Semi rugosa
Características Plantas	5,030	0,395	0,891	5,030	0,395	1,121	3,852	0,395	0,601
Maiores largura da copa	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
Altura da planta	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido	Materno	Paterno	Híbrido
Dias de florescimento	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F	1585	1557	1585C x 1557F
Dias para frutificação	98.00	96.00cm	81.00	98.00	96.00cm	75.00	98.00	96.00cm	58.00
Hábito de crescimento	93.00	95.00cm	88.00	93.00	95.00cm	92.00	93.00	95.00cm	72.00
Cor do caule	60	72	81	60	72	75	60	72	75
	148	126	152	148	126	150	148	126	158
	Ereto	Intermediário	Intermediário	Ereto	Intermediário	Intermediário	Ereto	Intermediário	Intermediário
	Roxo	Verde	Roxo	Roxo	Verde	Roxo	Roxo	Verde	Verde com estrias roxas

**TABELA 18** Relação dos acessos provenientes do banco de germoplasma de *Capsicum* da UENF utilizados nos cruzamentos interespecíficos

Nº	Nº UENF	Espécie	Variedade/Cultivar	Procedência
1	1562	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
2	1565	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
3	1382	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Itaguaí, RJ
4	1567	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
5	1569	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimentão	Viçosa, MG
6	1503	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
7	1381	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	Itaguaí, MG
8	1578	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta	México
9	1502	<i>C. annuum var. annuum</i>	Pimenta	México
10	1575	<i>C. annuum var annuum</i>	Pimenta Ornamental	Campos, RJ
11	1559	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	C. de Macacu, RJ
2	1576	<i>C. annuum var glabriusculum</i>	Pimenta Ornamental	Rio das Ostras, RJ
13	1497	<i>C. chinense Jacq.</i>	Pimenta	Coleta, RJ
14	1498	<i>C. chinense Jacq.</i>	Pimenta	Coleta, RJ
15	1424	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Campos, RJ
16	1555	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
17	1585	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Parintins, AM
18	1553	<i>C. chinense Jacq</i>	Pimenta	Goiânia, GO
19	1417	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Lavras, MG
20	1495	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
21	1584	<i>C. baccatum var baccatum</i>	Pimenta	Rio das Ostras, RJ
22	1489	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
23	1492	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
24	1496	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
25	1573	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Duas Barras, RJ
26	1426	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Campos, RJ
27	1490	<i>C. baccatum var pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
28	1494	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
29	1500	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	Pimenta	Coleta, RJ
30	1425	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos, RJ
31	1561	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Campos, RJ
32	1560	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	C. de Macabu, RJ
33	1491	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Coleta, RJ
34	1557	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Goiânia, GO
35	1588	<i>C. frutescens</i>	Pimenta	Parintins, AM
36	1574	<i>C. pubescens</i>	Pimenta	Piracicaba, USP