

PALINOLOGIA DE *Capsicum* spp.: CARACTERIZAÇÃO,
DIVERGÊNCIA GENÉTICA E VIABILIDADE POLÍNICA

KELLEN COUTINHO MARTINS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO – 2010

PALINOLOGIA DE *Capsicum* spp.: CARACTERIZAÇÃO,
DIVERGÊNCIA GENÉTICA E VIABILIDADE POLÍNICA

KELLEN COUTINHO MARTINS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO – 2010

PALINOLOGIA DE *Capsicum* spp.: CARACTERIZAÇÃO,
DIVERGÊNCIA GENÉTICA E VIABILIDADE POLÍNICA

KELLEN COUTINHO MARTINS

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 18 de janeiro de 2010.

Comissão Examinadora:

Prof^a. Maura da Cunha (D. Sc. Ciências Biológicas) – UENF

Prof^a. Rosana Rodrigues (D. Sc. Produção Vegetal) – UENF

Dr^a. Elaine Manelli Riva Souza (D. Sc. Produção Vegetal) – INCAPER

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D. Melhoramento de Plantas) – UENF
Orientadora

À minha família por estar sempre ao meu lado, fazendo dos meus sonhos seus próprios objetivos e dos meus objetivos sua própria luta.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Mara e Gilberto e à minha irmã Suellen, para os quais, um simples obrigado seria pouco perto do que merecem por todo afeto, carinho e amor que sempre me dedicaram;

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

À minha orientadora, Telma Pereira, pela dedicação e pelos ensinamentos desde a graduação;

Às professoras Rosana Rodrigues e Maura da Cunha, pela co-orientação neste estudo;

A Elaine Riva pela participação na banca examinadora e pelas sugestões dadas;

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

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

A Embrapa Hortaliças pela doação das sementes dos acessos silvestres de *Capsicum*;

Aos meus companheiros de laboratório: Carlos, Emanuelli, Fabiane, Hérika, Monique e Marcelo;

Ao Daniel, funcionário da secretaria do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas;

Aos colegas do curso de Mestrado.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Classificação botânica.....	5
2.2. Centro de origem e distribuição geográfica.....	9
2.3. Melhoramento genético.....	13
2.4. Citogenética.....	15
2.5. Caracterização Palinológica.....	16
2.5.1. O Grão de Pólen.....	17
2.5.2. Morfologia do pólen.....	18
2.5.3. Estudos Palinológicos.....	21
2.6. Viabilidade Polínica	23
2.7. Divergência Genética e Análise Multivariada.....	24
2.7.1. Distância Euclidiana Média (d_{ij})	27
2.7.2. Métodos de agrupamento.....	28
2.7.2.1. Métodos Hierárquicos.....	28
2.7.2.2. Métodos de Otimização.....	29
2.8.1. Componentes Principais.....	30

3. TRABALHOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE <i>Capsicum</i> L.....	32
3.1.1 Resumo.....	32
3.1.2 Abstract.....	33
3.1.3 Introdução.....	34
3.1.4 Material e Métodos.....	35
3.1.4.1 Material genético e condições de cultivo.....	35
3.1.4.2 Métodos.....	36
3.1.4.2.1 Caracterização Palinológica.....	36
3.1.4.2.2 Acetólise.....	36
3.1.4.2.3 Montagem das lâminas.....	37
3.1.4.2.4 Medidas dos grãos de pólen.....	37
3.1.4.2.5 Análise Estatística.....	40
3.1.4.2.6 Análise Multivariada.....	40
3.1.5 Resultados e Discussão.....	41
3.1.5.1 Caracterização Palinológica.....	41
3.1.5.2 Análise Multivariada.....	50
3.1.5.2.1 Dissimilaridade.....	50
3.1.5.2.2 Métodos de Agrupamento.....	51
3.1.5.2.3 Análise dos Componentes Principais.....	58
3.1.6 Conclusão.....	63
3.1.7 Referências Bibliográficas.....	63
3.2 ESTIMATIVA DA VIABILIDADE POLÍNICA DE <i>Capsicum</i> L. BASEADA EM DIFERENTES TESTES COLORIMÉTRICOS.....	72
3.2.1 Resumo.....	72
3.2.2 Abstract.....	73
3.2.3 Introdução.....	73
3.2.4 Material e Métodos.....	75
3.2.4.1 Material genético e condições de cultivo.....	75
3.2.4.2 Métodos.....	75
3.2.5 Resultados e Discussão.....	76
3.2.6 Conclusão.....	93
3.2.7 Referências Bibliográficas.....	93

4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

RESUMO

MARTINS, Kellen Coutinho; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Janeiro de 2010. Palinologia de *Capsicum* spp.: caracterização, divergência genética e viabilidade polínica. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira. Conselheiras: Rosana Rodrigues, Maura da Cunha.

Esta dissertação teve por objetivo estimar a divergência genética entre espécies de *Capsicum* com base na caracterização palinológica; além disso, objetivou-se também testar diferentes soluções corantes a fim de definir a melhor, para uso rotineiro no laboratório. Assim, o primeiro trabalho refere-se a caracterização morfológica dos grãos de pólen de acessos representantes de espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres de *Capsicum* e com base nos caracteres morfopolínicos quantitativos estudar a divergência genética entre os acessos. Para tal, botões florais foram fixados em solução de etanol-ácido acético (3:1). Posteriormente, os grãos de pólen foram acetolisados, medidos sob microscopia óptica e descritos com base 13 características polínicas. O estudo da divergência genética entre os acessos foi feito com base na distância euclidiana média padronizada e a análise de agrupamento foi feita pelos métodos de Ward e Tocher. A representação gráfica da similaridade entre os acessos foi feita pelo método da Análise dos Componentes Principais (ACP). Observou-se que as espécies de *Capsicum* possuem características polínicas típicas da família Solanaceae, ou seja, grãos de pólen com aberturas compostas, poro lalongado, tricolporados e trizonocolporados. Com base nas análises observou-se que as

espécies são geneticamente distantes; utilizando os métodos de Ward e ACP foi possível agrupar os acessos de acordo com classificação dos complexos gênicos já descritos para o gênero, ou seja, as espécies de *C. annuum* e suas variedades botânicas formaram um grupo enquanto que as espécies de *C. baccatum* juntamente com o acesso representante da espécie *C. parvifolium* formaram outro grupo. Os resultados obtidos pelo método de Tocher não foram concordantes com os obtidos pelas metodologias de Ward e ACP. A variável largura do poro dentre as treze características polínicas analisadas foi a mais discriminante para o estudo morfológico de *Capsicum* spp. O segundo trabalho objetivou determinar dentre quatro soluções corantes, carmim acético, lugol, azul de tripano e Alexander, qual a mais adequada para avaliar a viabilidade polínica dos acessos. Assim, botões florais na antese foram coletados e conservados em etanol 70% até o momento de preparo da lâmina. Após o preparo da lâmina pela metodologia *squash* e observação sob microscópio ótico, foram contados os grãos de pólen viáveis e os inviáveis e estimada o percentual de viabilidade. Não houve diferenças significativas entre as soluções corantes, porém a solução de Alexander apresentou a maior média (93,65%) enquanto que a de lugol a menor média (89,31%). Todas as espécies estudadas apresentaram viabilidade polínica alta independente do corante utilizado, sendo a solução de Alexander a mais indicada por ser um corante que discrimina bem grãos de pólen viáveis dos inviáveis e por ser simples sendo possível usar como rotina no laboratório.

ABSTRACT

MARTINS, Kellen Coutinho; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. January , 2010. Palynology of *Capsicum* spp.: Characterization, Genetic Divergence and Pollen Viability. Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Comittee members: Rosana Rodrigues, Maura da Cunha.

This dissertation had the objective to analyze the genetic divergence among *Capsicum* species based on palynology characterization and to test different staining solutions in order to define the best solution for routine laboratory work. So, the first work aimed to do the morphological characterization of pollen grains of domesticated, semi domesticated, and wild *Capsicum* species and based on quantitative morphopollinic characters to study the genetic divergence among accessions. Thus, flower buds were collected in fixative solution of ethanol and acetic acid (3:1). After fixation, the pollen grains were acetolised, measured under optic microscope, and described by thirteen pollen characteristics. The genetic divergence study among accessions were done based on the standardized Euclidian's distance and the *clustering* analysis based on Ward's and Tocher's methods. The graphic representation of similarity among accessions was done by Principal Components Analysis (PCA). It was observed that the *Capsicum* species has pollen characteristics typical of Solanaceae family, that means, pollen grains with compound aperture, lalongate pore, tricolporate and trizonocolporate. Based on the analyses it was observed that the *Capsicum* species are genetically distant; by using the Ward's and PCA methodologies was possible to *cluster* the accesses

according to the pool genic already described for *Capsicum*, it means that the *C. annum* and botanical varieties were *clustered* together and the *C. baccatum*, and its botanical varieties, and *C. parvifolium* were *clustered* together. The results based on Tocher's method were not concordant to the results obtained by Ward and PCA. Among thirteen pollen characteristic, the pore width was the most discriminat for the pollen morphology study of *Capsicum* spp. The second work aimed to determine among four dye solutions (acetic carmine, lugol, trypan blue, and Alexander) the most adequate to evaluate the pollen grain viability of accesses. So, flower buds at anthesis were collected and conserved in 70% ethanol solution until the moment of slides preparation. After the slides preparation by squash technique e observation under optical microscope, pollen grains were classified as viable and non-viable and counted for viability percentage estimation. The results showed that all species presented high pollen grain viability regardless of dye solution used, and the Alexander solution is the most indicated among them because it discriminate very well viable from nonviable pollen grain and it is a simple methodology to use as routine in the laboratory.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* abrange cerca de 30 espécies, (Moscone *et al.*, 2007), sendo constituído por muitas espécies silvestres e apenas cinco domesticadas, originárias da América Tropical (Andrews, 1984; Pickersgill, 1997).

As espécies domesticadas são *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense* e *Capsicum pubescens*, (Casali e Couto, 1984), sendo a espécie *Capsicum annuum*, a mais importante comercialmente (Reifschneider, 2000).

As pimentas e os pimentões são cultivados em regiões tropicais e temperadas (Casali e Couto, 1984). O continente asiático detém 89 % de toda a área plantada com pimenta ao redor do mundo, seguido dos Estados Unidos e México que juntos possuem 7%. No Brasil, a produção de pimentas tem crescido consideravelmente nos últimos anos, sendo o sudeste e o centro-oeste as principais regiões produtoras (Rufino e Penteado, 2006).

A diversidade observada em *Capsicum* é ampla, com grande variedade de formatos, tamanhos, cores e sabores de fruto, e também com diferentes graus de pungência, arquitetura de planta e composição nutricional (Bosland e Votava, 1999). As formas doce ou levemente pungentes são preferidas nos Estados Unidos e na Europa, enquanto as pimentas picantes têm maior importância econômica em outras regiões, especialmente no continente asiático (Martin *et al.*, 1979).

As diversas espécies de pimentas e pimentões produzem frutos cujos teores de vitamina C superam os dos frutos cítricos. Além disso, os frutos são importantes como fontes de vitamina A, vitaminas do complexo B1 e B2 e de minerais como ferro, cálcio e fósforo (Bosland, 1993). As pimentas do gênero *Capsicum* são também fontes de carotenóides, importantes antioxidantes naturais relacionados com a prevenção de doenças degenerativas (Reifschneider, 2000).

Os programas de melhoramento de plantas estão fundamentados na utilização da diversidade genética dentro de uma espécie para o desenvolvimento e seleção de novas cultivares com elevado potencial produtivo (Loarce *et al.*, 1996), além da conservação dos recursos genéticos disponíveis. Para tanto, torna-se necessário conhecer a diversidade genética existente.

O estudo da variabilidade genética em espécies de pimenta e pimentão possibilita a indicação de possíveis cruzamentos férteis entre tipos distintos e a transferência de genes de interesse entre os genótipos (Reifschneider, 2000). De acordo com Pozzobon e Schifino-Wittmann (2006), o sudeste do Brasil possui o maior número de espécies silvestres de *Capsicum* e esses recursos genéticos não têm sido devidamente utilizados para o melhoramento genético ou para estudos evolutivos das formas cultivadas do gênero *Capsicum*.

No entanto, segundo Pickersgill (1997), a diversidade genética das várias espécies domesticadas de *Capsicum* tem sido muito pouco explorada e esta diversidade representa uma oportunidade de utilização de germoplasma mais fácil e mais simples, comparada a outras estratégias de melhoramento, como por exemplo, por meio da transferência de genes por cruzamentos interespecíficos.

A variabilidade pode ser estudada por meio de estudos citológicos, tais como análise de cariótipo, análise meiótica, estudos moleculares, viabilidade polínica e morfologia do grão de pólen, gerando conhecimentos que poderão auxiliar trabalhos de pesquisas que visem o desenvolvimento de genótipos superiores. Vários estudos têm sido realizados visando estimar a variabilidade presente em *Capsicum* utilizando, por exemplo, descritores morfoagronômicos (Costa *et al.*, 2008; Bento *et al.*, 2007; Sudré *et al.*, 2005), marcadores moleculares (Souza, 2008; Costa *et al.*, 2006), e resistência a doenças (Bento, 2008; Riva *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2002).

Em função de sua grande diversidade morfológica, os grãos de pólen são importantes para fins taxonômicos (Marcos Filho, 2005) e nas últimas décadas, os

estudos palinológicos, vêm sendo cada vez mais utilizados como auxiliares na classificação taxonômica dos grupos vegetais, gerando clados filogenéticos que expressam de forma mais precisa a origem e a evolução desses organismos (Judd, 1999). De acordo com Melhem (1978), a importância taxonômica e evolutiva da morfologia polínica pode ser analisada em níveis específicos, genéricos e superiores a essas categorias e, portanto, de alto valor taxonômico e evolutivo.

O estudo da morfologia polínica é importante, pois torna possível a identificação de quase todas as famílias, de muitos gêneros e de grande número de espécies vegetais, sendo a exina o elemento essencial para a identificação da variabilidade e até da separação de espécies diferentes e afins (Salgado-Labouriau, 1973; Miranda, 2003), gerando informações sobre a identidade genética e parentesco de genótipos, que são importantes para a exploração do germoplasma, visando à utilização máxima da diversidade genética (He *et al.*, 1995).

De acordo com Alexander (1969), o estudo sobre a viabilidade polínica também contribui para estudos taxonômicos, assim como para estudos ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, como no monitoramento do grão de pólen, de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial econômico com floração em épocas distintas.

Estimativas da viabilidade polínica constituem um importante parâmetro em análises de fluxo gênico e em programas de melhoramento genético de plantas (Martins *et al.* 1981, Botto 1997). 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 (Dafni, 1992).

De acordo com Einhardt *et al.*, (2006), é importante que o genótipo com características desejáveis, a ser utilizado, tenha uma boa viabilidade polínica, visto que, a eficácia dos cruzamentos, em programas de hibridação, dependem diretamente da viabilidade do pólen.

Com base no que foi visto, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade genética presente no gênero *Capsicum* com base no estudo do grão de pólen (descritores polínicos e

viabilidade polínica) das espécies domesticadas *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens*; das espécies semidomesticadas *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum baccatum* var. *baccatum* e da espécie silvestre *Capsicum parvifolium*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Classificação botânica

As espécies do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae (Eshbaugh, 1993), da qual também faz parte o tomate, a batata, o tabaco e a petúnia (Bosland, 1996), sendo representadas pelas pimentas e pimentões. Cerca de 30 espécies já foram identificadas (Moscone *et al.*, 2007), sendo cinco delas amplamente cultivadas e utilizadas pelo homem: *C. annum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Belletti *et al.*, 1998). Representantes silvestres de todas essas espécies são conhecidos, com exceção de *Capsicum pubescens* (Paran *et al.*, 1998), que por sua vez é a única não cultivada no Brasil, onde além das demais espécies cultivadas, três espécies consideradas silvestres se destacam: *Capsicum buforum*, *Capsicum praetermissum* e *Capsicum schottianum* (Casali e Couto, 1984).

A taxonomia do gênero *Capsicum* ainda é confusa, devido às divergências sobre sua história evolutiva e as relações sistemáticas entre espécies silvestres e domesticadas (Mc Leod, 1986). Além disso, existe grande variedade de formas botânicas e grande número de critérios usados nesta classificação (Bosland e Votava, 1999) que dificultam essa definição. Considerando estes aspectos, as espécies podem ser diferenciadas e classificadas com base em diversos critérios, como o grau de domesticação, a capacidade de hibridação, a coloração das flores e o conteúdo de DNA.

Baseado no processo de domesticação, as espécies de *Capsicum* podem ser separadas em três categorias: plantas domesticadas (aquelas em que o homem selecionou determinadas características de tal modo que não são mais capazes de sobreviver em condições naturais), semidomesticadas (aquelas selecionadas, cultivadas, mas ainda não completamente domesticadas, e que não apresentam diferenças morfológicas significativas em relação às populações silvestres das quais se originaram) ou silvestres (aquelas que podem ser exploradas pelo homem no seu ambiente natural, não ocorrendo normalmente em ambientes alterados pelo homem) (Quadro 1) (adaptado de Eshbaugh, 1980 e IBPGR, 1983, citados por Reifschneider, 2000).

Quadro 1: Espécies do gênero *Capsicum* de acordo com o grau de domesticação:

Domesticadas	Semidomesticadas	Silvestres
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	<i>C. buforum</i>
	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	<i>C. campylopodium</i>
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	<i>C. chacoense</i> var. <i>tomentosum</i>
	<i>C. chinense</i> (f. silvestre)	<i>C. ciliatum</i>
<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i> (f. silvestre)	<i>C. coccineum</i>
	<i>C. cardenasii</i>	<i>C. comutum</i>
<i>C. frutescens</i>	<i>C. eximium</i>	<i>C. dimorphum</i>
	<i>C. tovarii</i>	<i>C. dusenii</i>
<i>C. pubescens</i>	<i>C. chacoense</i>	<i>C. flexuosum</i>
	<i>C. galapagoense</i>	<i>C. geminifolium</i>
		<i>C. hookerianum</i>
		<i>C. lanceotatum</i>
		<i>C. minutiflorum</i>
		<i>C. mirabile</i>
		<i>C. parvifolium</i>
		<i>C. schottianum</i>
		<i>C. scolnikianum</i>
		<i>C. villosum</i>

As espécies de *Capsicum* também podem ser diferenciadas tomando por base a coloração das flores, sendo divididas em dois grupos: o grupo de flores brancas e o grupo de flores púrpuras. (Quadro 2) (Pickersgill, 1991):

Quadro 2: Distribuição das espécies do gênero *Capsicum* com base na coloração das flores:

Grupo A - flores brancas	Grupo B - flores púrpuras
<i>C. annuum</i> (silvestre e domesticada) <i>C. chinense</i> (silvestre e domesticada) <i>C. frutescens</i> (silvestre e domesticada) <i>C. baccatum</i> (silvestre e domesticada) <i>C. praetermissum</i> (silvestre) <i>C. chacoense</i> (silvestre) <i>C. galapagoense</i> (silvestre)	<i>C. pubescens</i> (domesticada) <i>C. eximium</i> (silvestre) <i>C. cardenasii</i> (silvestre) <i>C. tovarii</i> (silvestre)

As espécies de *Capsicum* podem também ser diferenciadas em três grupos, tomando-se por base o seu conteúdo de DNA, determinado através de análise de citometria de fluxo (Belletti *et al.*, 1998):

Complexo *C. annuum*: *C. annuum* (7,65 pg), *C. frutescens* (7,94 pg), *C. chinense* (8,04 pg), *C. chacoense* (7,66 pg) e *C. tovarii* (7,93 pg).

Complexo *C. baccatum*: *C. baccatum* var. *baccatum* (8,43 pg), *C. baccatum* var. *pendulum* (8,39 pg) e *C. eximium* (8,70 pg).

Complexo *C. pubescens*: *C. cardenasii* (8,97 pg), *C. praetermissum* (9,13 pg) e *C. pubescens* (9,72 pg).

Outra classificação utilizada para o gênero *Capsicum* é a dos complexos gênicos, onde são reconhecidos 3 complexos que são estabelecidos de acordo com a cruzabilidade entre as espécies, são eles: complexo *Capsicum annuum*, complexo *Capsicum baccatum* e complexo *Capsicum pubescens* (Pickersgill, 1991; Tong e Bosland, 1999).

O Complexo *annuum* é representado pelas espécies: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapagoense* e *C. chinense*. O Complexo *baccatum* compreende as espécies *C. baccatum* e *C. tovarii*. As espécies *C. cardenasii*, *C. eximium* e *C. pubescens* são representantes do Complexo *pubescens* (Pickersgill, 1991). Embora as barreiras entre os complexos gênicos possam ser quebradas, raramente isso ocorre na natureza (Eshbaugh, 1993).

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

Morfológicamente, as espécies de *Capsicum* possuem grande variabilidade de formato, tamanho e cor dos frutos (Heiser, 1976). Essas características juntamente com outras como a coloração e o número de flores por nó, a cor da corola, a posição e o formato dos frutos, permitem a fácil distinção entre elas (Teixeira, 1996). Além do aspecto morfológico, as características bioquímicas e citológicas têm permitido a distinção entre diferentes espécies (McLeod *et al.*, 1983).

A espécie *Capsicum annuum* se caracteriza por possuir flores isoladas em cada nó (IBPGR, 1983), pedicelo pendente ou inclinado na fase de antese (Casali e Couto, 1984), anteras azuis e corolas brancas leitosas (Heiser, 1976). A variedade *annuum* produz frutos violetas, vermelhos, laranjas, amarelos ou verdes, enquanto a variedade *glabriusculum* exibe frutos vermelhos quando maduros. Quanto à cor das sementes, ambas as variedades de *Capsicum annuum*, têm sementes amareladas (Moscone *et al.*, 2007).

Capsicum baccatum possui flores normalmente isoladas, podendo ter duas por nó (var. *pendulum*) ou duas a cinco flores por nó (var. *baccatum*) (Casali e Couto, 1984), com manchas amarela, marrom ou verde-escura na corola (Eshbaugh, 1993). As anteras são geralmente amarelas (Embrapa, 2009) e o pedicelo é pendente, inclinado ou ereto (Casali e Couto, 1984). O fruto em *C. baccatum* varia de cor, podendo ser vermelho ou amarelo, enquanto as sementes são amareladas (Moscone *et al.*, 2007), podendo ser lisas (var. *pendulum*) ou rugosas (var. *baccatum*) (Casali e Couto, 1984).

Capsicum chinense possui duas ou mais flores por nó (IBPGR, 1983) e corola branca ou branca esverdeada (Casali e Couto, 1984), com anteras geralmente azuis, roxas, violetas ou amarelas (Embrapa, 2009). O pedicelo pode estar pendente, ereto ou inclinado (Casali e Couto, 1984). Os frutos de *C.*

chinense podem ser vermelhos, laranjas, amarelos ou brancos e suas sementes são amareladas (Moscone *et al.*, 2007).

Capsicum frutescens tem de uma a cinco flores por nó que se formam, com pedicelo ereto e pequeno. A corola é verde-clara a branco-esverdeada, sem manchas (Reifschneider *et al.*, 1998). As anteras são geralmente azuis, roxas ou violetas (Embrapa, 2009), enquanto seus frutos são vermelhos (Moscone *et al.*, 2007) e suas sementes são de cor palha a dourada (Casali e Couto, 1984).

Já *Capsicum parvifolium*, pertencente ao grupo das espécies silvestres, possui corola branca ou púrpura ambas com manchas amarelo-esverdeadas, (Moscone *et al.*, 2003) frutos de cor laranja ou vermelhos com sementes acastanhadas (Moscone *et al.*, 2007), características das espécies andinas adaptadas a climas frios, sendo globulares e pendentes, características das espécies brasileiras adaptadas a climas úmidos (Pozzobon *et al.*, 2006).

No gênero *Capsicum*, existem espécies anuais, bienais e perenes (Bosland, 1996). A forma de crescimento predominante são os arbustos perenes, embora várias espécies manifestem um crescimento herbáceo bienal, principalmente aquelas do complexo *Capsicum annuum* (*C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*), sendo que umas poucas espécies se desenvolvem em árvores, como é o caso de *C. parvifolium* (Moscone *et al.*, 2007).

2.2. Centro de origem e distribuição geográfica

O gênero *Capsicum* é conhecido desde o início da civilização no hemisfério Norte, fazendo parte da dieta humana desde aproximadamente 7500 a. C (Mac Neish, 1964, citado por Bosland, 1996). Na época da chegada dos primeiros europeus às Américas foram encontradas pimentas sendo cultivadas pelos índios, freqüentemente ocupando o segundo lugar em importância entre as plantas cultivadas, perdendo apenas para o milho ou para a mandioca (Heiser, 1995).

Sementes de pimenta têm sido encontradas em sítios arqueológicos de 5000 anos a.C. em Tehuacán, México, representando provavelmente, plantas silvestres de *C. annuum*. Formas domesticadas desta espécie são representadas arqueologicamente no México antes do início da era Cristã (Heiser, 1976). Outros

sítios arqueológicos são conhecidos no Peru, nas localidades de Ancon e Huaca Prieta (Reifschneider, 2000).

As pimentas pertencentes ao gênero *Capsicum* já eram conhecidas pelos povos nativos possuindo maior pungência do que a pimenta-do-reino (gênero *Piper*), cuja busca levou ao descobrimento do Novo Mundo. A distribuição mundial do gênero *Capsicum* ocorreu no século XVI, por navegadores portugueses e espanhóis.

No Brasil colonial são diversos os relatos dos exploradores demonstrando que a pimenta era amplamente cultivada e representava um importante item na dieta das populações indígenas. Do ano de 1500 até hoje, as pimentas passaram a ser consumidas por povos de todas as origens, em quantidades crescentes e em usos variados (Reifschneider, 2000).

A relação entre o homem e as plantas de *Capsicum* existe há milhares de anos e as pimentas foram provavelmente as culturas domesticadas há mais tempo no ocidente (Bosland, 2004). Nas expedições feitas por Vavilov entre 1930 e 1933 já estavam registradas coletas de *C. annuum* e *C. frutescens* (History Vavilov, 2004).

De acordo com Heiser (1979), o cultivo das pimentas teve início em várias áreas empregando diferentes espécies silvestres. Essa domesticação resultou em mudanças, particularmente nos frutos, que eram pequenos, eretos, decíduos e vermelhos e passaram a ser grandes, freqüentemente pendentes, não decíduos e com uma grande variedade de cores além do vermelho. Os tipos doces, apesar de conhecidos, só assumiram alguma importância tempos depois.

O centro de origem das pimentas e pimentões é a América Tropical (Pickersgill, 1997), podendo ter sido simultaneamente domesticados em várias partes da América do Sul e Central (Pickersgill, 1991) e tendo sido dispersos pela Europa através dos navegantes e exploradores portugueses e espanhóis que procuravam a pimenta-do-reino, *Piper nigrum* (Casali e Couto, 1984).

Uma porção importante do gênero se originou em uma área nuclear na Bolívia Sul-Central com posterior migração aos Andes e terras baixas da Amazônia (Mc Leod *et al.*, 1982). O Brasil é considerado como um importante centro secundário de várias espécies como *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, este último tendo a bacia amazônica como área de maior diversidade (Reifschneider, 2000).

A origem específica do gênero, no entanto, é controversa: alguns indicam como centro primário de diversidade, o México/América Central, com centros secundários o Brasil; enquanto outros propõem como centro de origem o Brasil e a Bolívia, com dispersão posterior para os Andes e América Central (Prince *et al.*, 1995).

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

A espécie *Capsicum annuum* tem como centro de origem o México (Paran *et al.*, 1998), mas as formas cultivadas parecem ter alcançado a América do Sul possivelmente depois das conquistas espanholas (Pickersgill, 1991). O centro de diversidade da forma cultivada *Capsicum annuum* var. *annuum* inclui Ásia e regiões da América Latina (IBPGR, 1983). Populações silvestres de *Capsicum annuum* são encontradas do sul dos EUA e México até a América Central e norte da América do Sul (Casali e Couto, 1984).

Capsicum baccatum tem como centro de origem a Bolívia e o Peru e baseado em evidências arqueológicas, foi provavelmente, domesticada no Peru por volta de 2500 a.C. (Casali e Couto, 1984). É comumente cultivada na América do Sul, (Bosland, 1996) sendo, no entanto, pouco conhecida fora do continente sul-americano (Heiser, 1976), apesar de ser também encontrada no México, Índia e Hawái (Eshbaugh, 1993).

Capsicum chinense como todas as demais espécies cultivadas de pimenta, teve origem na América, sendo a mais difundida na América tropical e encontrada na região Amazônica, (Bosland, 1992) seu provável centro de diversidade (Reifschneider, 2000). Algumas variedades desta espécie crescidas na África são reportadas como as mais pungentes de todas as pimentas (Heiser, 1976), sendo a pimenta mais comumente cultivada nas Índias Ocidentais, norte

da América do Sul e na Bacia Amazônica. *Capsicum chinense* é também comum no Peru e Bolívia (Pickersgill, 1971). Segundo Eshbaugh (1993), a expansão global mais limitada da espécie *Capsicum chinense* se deve mais provavelmente à sua descoberta na América do Sul, depois de *Capsicum annuum* já ter sido estabelecida no Continente Europeu.

Capsicum frutescens tem como centro de origem a América do Sul, sendo encontrado no Peru seu registro arqueológico mais antigo (Casali e Couto, 1984). A cultivar Tabasco é a única representante dessa espécie comumente cultivada fora dos trópicos (Heiser, 1976). *C. frutescens* encontra-se distribuída nas terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e nas Índias Ocidentais, sendo também cultivada na África e no sudeste da Ásia (IBPGR, 1983). Já *Capsicum parvifolium* é encontrada somente no nordeste do Brasil, na Colômbia e Venezuela (Filho, 2009). Na Tabela 1 encontra-se a distribuição geográfica, de acordo com Moscone *et al.*, (2007), das espécies analisadas no presente estudo.

Tabela 1: Lista das espécies de *Capsicum* estudadas no presente trabalho e sua distribuição geográfica (adaptado de Moscone *et al.*, 2007):

Espécies e Variedades	Distribuição Geográfica
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Cultivada em todo mundo
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Cultivada nos Estados Unidos, México, Costa Rica, Colômbia, Equador, Peru, Brasil, Bolívia, Paraguai, Chile, Argentina, Índia
<i>C. chinense</i>	Cultivada nos Estados Unidos, México, America Central, Equador, Peru, Bolívia, Brasil, Argentina, China, Japão
<i>C. frutescens</i>	Cultivada nos Estados Unidos, México, América do Sul e Central, África, Índia, China, Japão
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	Sul dos Estados Unidos, México, Antilhas, Belize, Honduras, El Salvador, Panamá, Costa Rica, Guatemala, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Norte e Nordeste do Brasil
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	Colômbia, Peru, Bolívia, Paraguai, Sul e Sudeste do Brasil, Norte da Argentina
<i>C. parvifolium</i>	Colômbia, Venezuela, Nordeste do Brasil

2.3. Melhoramento genético

O melhoramento de plantas vem contribuindo de forma expressiva com o incremento qualitativo e quantitativo de alimentos, tendo como objetivo o desenvolvimento de novas cultivares com maior rendimento, qualidade industrial e nutritiva, resistência a doenças, estresses bióticos e adaptabilidade e estabilidade em diferentes regiões fisiográficas, dentre outros (Floss, 2003).

De acordo com Cardoso (2001), para alcançar o sucesso, os programas de melhoramento dependem de vários fatores. A definição dos objetivos é de fundamental importância na economia de tempo e recursos. Do mesmo modo deve-se escolher criteriosamente o método mais eficiente de seleção, levando-se em conta a característica a ser melhorada, uma vez que, o processo de melhoramento só poderá ser bem-sucedido se a população a ser melhorada possuir variabilidade genética quanto ao atributo de seleção.

O gênero *Capsicum*, possui uma ampla variabilidade genética, evidenciada pela grande variedade de espécies, entretanto, para que haja maior uso desses recursos, é de fundamental importância o conhecimento e a organização dessa variabilidade. A análise das variações genéticas e intra e interespecíficas possibilita o conhecimento da organização e estrutura das relações evolucionárias ocorrentes no gênero (Moreira *et al.*, 2006).

O conhecimento da diversidade genética dos acessos cultivados e silvestres mantidos em coleções de pimenta e pimentão dá suporte aos programas de melhoramento para a obtenção de plantas mais produtivas, com resistência a doenças e pragas, e com outros atributos de interesse agrônomo e econômico (Silva, 2004), uma vez que 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).

Segundo Lins *et al.*, (2001), para atender a essa demanda de novas variedades, os programas de melhoramento se baseiam em dados de variabilidade genética obtidos em estudos de caracterização morfológica, citogenética e molecular de acessos cultivados e silvestres.

No Brasil, apesar do uso comum, algumas espécies de *Capsicum* são desconhecidas ou ainda não caracterizadas morfológica e agronomicamente (Luz, 2007). Segundo Bianchetti (1996) essas espécies representam um material genético que pode potencialmente ser empregado em programas de melhoramento.

O melhoramento das pimentas é similar àquele utilizado com outras solanáceas. A espécie pode ser cruzada facilmente e maior ênfase tem sido dada aos tipos “doces” em comparação aos pungentes (Heiser, 1979). Os programas de melhoramento têm explorado a diversidade genética de *Capsicum*,

principalmente das espécies domesticadas e dentre as cultivares desenvolvidas, existem híbridos, linhagens e populações de polinização aberta. As principais características trabalhadas são: produtividade, fácil destaque dos frutos durante a colheita, arquitetura da planta, precocidade e resistência a doenças. De forma paralela, são realizadas avaliações para coloração, pungência, sabor, aroma, formato e tamanho do fruto, espessura da polpa e perda de peso pós-colheita (Greenleaf, 1986; Reifschneider, 2000).

Nas duas últimas décadas ocorreram notáveis avanços nos programas de melhoramento do pimentão no Brasil (Nascimento *et al.*, 2004), no entanto, o melhoramento das pimentas é muito menos avançado (Luz, 2007). Essa escassez de programas nacionais de melhoramento de pimentas ocorre em função principalmente, do pouco interesse das companhias de sementes em comercializar sementes de pimentas, devendo ser considerado também, a dificuldade de manusear as pequenas flores para a execução dos cruzamentos e multiplicação das sementes, a produção escassa de sementes por fruto, uma vez que estes normalmente são muito pequenos e, ainda a ardência extrema do fruto, dificultando a extração das sementes (Moreira *et al.*, 2006).

2.4. Citogenética

De acordo com Moscone *et al.*, (2007) as espécies de *Capsicum* são diplóides e têm um número de $2n=2x=24$ cromossomos, no entanto $2n=2x=26$ cromossomos têm sido reportados. Vários estudos relatam que em cinco táxons (*C. ciliatum* (H., B. e K.) Kuntze, *C. lanceotatum* (Green.) Morton e Stand, *C. mirabile* Martius, *C. campylopodium* Sendtner e em uma espécie de *Capsicum* não identificada) foi observado um número básico de $x=13$ ($2n = 26$). Pozzobon *et al.* (2006) observaram um número somático de $2n=26$ em espécies encontradas no Brasil, sugerindo que $x=12$ e $x=13$ representam diferentes tendências evolutivas no gênero *Capsicum* (Pozzobon e Schifino-Wittmann, 2006).

As pimentas e os pimentões são espécies autógamas (Reifschneider, 2000) com taxa de polinização cruzada que pode ser tão baixa quanto 2% e pode atingir valores como 90% (Pickersgill, 1997). Essa polinização pode ser facilitada por alterações na morfologia da flor, tais como diferenças no tamanho do estilete (Reifschneider, 2000). Por exemplo, algumas pimentas têm um estilete mais

comprido, reduzindo a possibilidade de autopolinização e aumentando assim a possibilidade da ocorrência de polinização cruzada (Nascimento *et al.*, 2006) ou ainda da ação de insetos polinizadores como abelhas (Bosland e Votava, 1999).

Informações citogenéticas têm contribuído de forma complementar ou mesmo de forma decisiva na reformulação de hipóteses filogenéticas com base nos dados dos cromossomos, pois se trata de um caractere bem conservado nas espécies (Lewis e Elvin-Lewis, 1995; Heslop-Harrison, 2000). Na análise do cariótipo, variações cromossômicas numéricas e estruturais são de grande importância, pois constituem o instrumento principal para análise citotaxonômica (Stace, 2000).

De acordo com Moscone (1996), os cariótipos das diferentes espécies de *Capsicum* são muito similares, tendo em geral, um par de acrocêntricos e os restantes dos cromossomos são meta ou submetacêntrico. No entanto, a classificação dos cromossomos de *C. annuum*, apresenta-se controversa. De acordo com Moscone (1993) e Aarestrup (2001), nessa espécie são encontrados 11 pares metacêntricos e um acrocêntrico, enquanto de acordo com Pickersgill (1991) e Lanteri e Pickersgill (1993), evidenciaram dois a três pares de acrocêntricos.

2.5. Caracterização palinológica

O grão de pólen devido a suas características especiais presta-se de maneira muito adequada para numerosos estudos. Sendo naturalmente isolado de outras células, comporta-se como um microorganismo que pode ser cultivado “*in vitro*”. Deste modo, as condições ambientais para seu desenvolvimento e para seu metabolismo podem ser controladas com bastante exatidão. Sua parede externa, quimicamente muito estável e morfologicamente muito variada, permite uma grande diversidade de estudos taxonômicos, morfológicos e paleobotânicos (Salgado-Labouriau, 1973).

O estudo dos grãos de pólen baseia-se principalmente na observação das características morfológicas deste e a comparação destas com outros grãos de pólen (Gasparino e Barros, 2006). Como qualquer outra célula, os grãos de pólen se caracterizam por seu tamanho e forma, no entanto, no caso dos pólenes, existem outras características que os descrevem, como a estrutura e escultura

(ornamentação) de sua exina e as aberturas que podem vir a apresentar, das quais se devem observar os tipos (poros, colpos ou colpóros), o número e a disposição na superfície do grão de pólen (Soler e Nolla, 2002).

Segundo Wodehouse (1935), a morfologia dos grãos de pólen é tão antiga como a maioria dos outros ramos da ciência botânica; historicamente, acredita-se que ela começou ao mesmo tempo que aquelas que requerem o uso do microscópio, mas ao longo dos anos seguintes, ela foi negligenciada a tal ponto que ficou para trás em relação a todos os outros ramos da ciência botânica.

São inúmeras as aplicações da análise dos grãos de pólen, entre elas pode-se citar o entendimento da distribuição das espécies no espaço e no tempo, o estudo do conteúdo de pólen na atmosfera e dos sedimentos, o estudo das mudanças na vegetação passada e sua evolução no tempo, a datação de depósitos (Moore e Webb, 1978), a reconstrução de paleoambientes e paleoclimas dos últimos milênios (Leal e Lorscheitter, 2006) entre outros.

2.5.1. O Grão de pólen

O grão de pólen é um corpúsculo que abriga o gametófito masculino tanto de angiospermas quanto das gimnospermas (Moore e Webb, 1978), constituindo-se em um elo entre cada geração e estando, portanto, envolvido com a reprodução e perpetuação das espécies.

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

A ocorrência de pólen binucleados e trinucleados dentro de um mesmo gênero são raras e nunca ocorre dentro de uma mesma espécie (Brewbaker, 1967). Em 70% das famílias de plantas como Solanaceae e Liliaceae, a segunda divisão mitótica da célula generativa, que dá origem a duas células espermáticas, ocorre quando o tubo polínico cresce através do pistilo feminino. Já em outras famílias como Cruciferae e Gramineae, encontra-se o grão de pólen trinucleado (McCormick, 1993).

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

Os produtos pós-meióticos podem permanecer unidos ou podem se desprender uns dos outros. No último caso, o grão de pólen isolado dá origem a uma mônade e caso os produtos pós-meióticos mantenham-se unidos, díades, tétrades ou políades são formadas (Hesse *et al.*, 2009).

A origem do grão de pólen ocorre através da meiose, uma divisão celular que se caracteriza por apenas uma duplicação cromossômica para cada duas divisões nucleares, produzindo quatro células haplóides (n) a partir de células-mãe diplóides ($2n$). De acordo com Mascarenhas (1992) e Horner e Palmer (1995), a literatura relata vários genes que atuam durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose e qualquer anormalidade durante o processo de formação dos grãos de pólen, pode resultar no surgimento de pólenes anormais ou inviáveis.

2.5.2. Morfologia do pólen

A análise da morfologia polínica tem importância para diferentes ciências entre elas: Melissopalinoologia, Farmacognosia, Paleobotânica, Paleoecologia, Bromatologia, Farmacologia, Fitoecologia, Zooecologia, Sedimentologia, Medicina Legal, Taxonomia Vegetal, Toxicologia, entre outras (Takeda *et al.*, 2001).

Nas angiospermas e gimnospermas, a parede do grão de pólen tem a importante função de proteção do gametófito masculino na sua jornada entre a antera e o estigma, sendo resistente à perda de água. Outra função da parede do grão de pólen é o reconhecimento do estigma compatível: as células do tapete em desintegração liberam uma classe de compostos que ficam mantidos nos espaços

formados pela ornamentação da parte externa da parede de alguns grãos de pólen, chamados de proteínas de “reconhecimento”, as quais possibilitam que o grão de pólen germine somente sobre o estigma compatível (Moore e Webb, 1978).

Historicamente, a estrutura da esporoderma ou parede celular, dos grãos de pólen, tem várias interpretações (Colinvaux *et al.*, 1999) e a terminologia das subdivisões da exina e intina, não é uma unanimidade entre os pesquisadores. Há dois grupos de autores que refletem bem esta divisão dentro da palinologia, Faegri e Iversen (1964) e Erdtman (1971). Reitsma (1970) tentou unificar essas terminologias, sendo sua sugestão aceita por Esau (1977), Moore e Webb (1978) e Huysmans *et al.*, (1994).

A nomenclatura de Erdtman se baseia na morfologia da exina, dividindo-a em uma parte escultrada, mais externa, a sexina, e em outra, não escultrada, a nexina, ambas subdivididas; e a nomenclatura de Faegri, se baseia na afinidade pelos corantes, considerando as camadas que se coram pela fucsina básica, constituintes da ectoexina (mais externa) e as que não (ou pouco) se coram pela fucsina básica, constituindo a endoexina (mais interna) (Barth, 1964).

O ponto mais crítico está na localização da camada basal (“footlayer”), que segundo Erdtman fica incluída na nexina, e segundo Faegri faz parte da ectoexina. Essa diferença de nomenclatura persiste por causa dos diferentes graus dos microscópios. Na óptica comum, ou seja, uma resolução até 1000x, não pode distinguir uma camada basal muito fina, ou partida, tornando-se adequada a nomenclatura de Erdtman. Na microscopia eletrônica cai esta dúvida e distingue-se perfeitamente a ectexina da endexina (Barth, 1964).

A exina é composta por esporopolenina (McCormick, 1993), sendo muito resistente e facilmente extraída de sedimentos (Dajoz, 1991), enquanto a intina é feita de celulose (Moore e Webb, 1978). De acordo com Erdtman (1986), a exina encontra-se dividida em mais duas camadas, uma interna e escultrada (sexina) e uma externa e não escultrada (nexina). A sexina é por sua vez subdividida em duas camadas denominadas endosexina e ectosexina, enquanto a nexina é dividida em endonexina e ectonexina.

Quanto à textura da exina, os grãos de pólen das Angiospermas podem ser divididos em três tipos básicos: tectados (perfurados ou imperfurados, supra-ornamentados ou não); semitectados (reticulados, estriados) ou intectados.

Quanto à ornamentação, a sexina pode ser: psilada (lisa), escabrada (com finas projeções com $1\mu\text{m}$), verrugosa (nodosa), baculada (elementos semelhantes a bastões), pilada (elementos semelhantes a pilos), clavada (elementos semelhantes a clavas), gemada (com pilos sésseis), espinhosa, rugulada (elementos esculturais alongados irregularmente distribuídos), estriada a reticulada (Barth e Melhem, 1988).

Em relação ao seu tamanho e forma, os grãos de pólen variam de 15 a 100 μm de diâmetro (Raynor *et al.*, 1966), podendo ser não-fixiformes ou fixiformes. No primeiro caso, encontram-se aqueles que não possuem forma definida, enquanto os demais possuem forma polínica definida (Erdtman, 1986).

Um caráter morfológico de grande importância para a identificação do grão de pólen são as aberturas. As aberturas são qualquer orifício mais ou menos distinto que delimita áreas que são ou podem normalmente ser ocupadas na liberação do material interno e maleável do grão de pólen (Erdtman, 1986). Como uma segunda função, permitem as acomodações de mudanças de volume nos grãos de pólen sujeitos a alterações de umidade. Alguns grãos de pólen têm pseudo-aberturas que parecem funcionar somente para adaptações volumétricas (Barth e Melhem, 1988).

De acordo com a variação em sua forma, as aberturas podem ser circulares, sendo denominadas poro, alongada possuindo comprimento maior que a sua largura, sendo assim chamada de colpo e podendo ser uma associação de ambos os tipos (cólporo). De acordo com Moore e Webb, (1978), existe o pensamento de que os colpos são mais primitivos do que os poros. Além dessa classificação os grãos de pólen podem ser agrupados em categorias de acordo com o seu número variável de aberturas, sendo utilizado os prefixos mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- e poli-, tanto para poro e colpo quanto para cólporo.

De acordo com sua posição na exina, as aberturas podem ser classificadas como ectoaberturas, que são as mais superficiais e estão localizadas na camada ectexina/sexina, como endoaberturas quando estão localizadas na camada endexina/nexina e como mesoaberturas quando estão localizadas entre essas duas camadas (Punt *et al.*, 1994). Em alguns casos, as ecto- e as endoaberturas são do mesmo tipo (poro ou colpo) e ocorrem no mesmo lugar, em outros casos, elas podem ser de diferentes tipos e ocorrer em posições diferentes (Moore e Webb, 1978).

Para a rotina de identificação do pólen, o número, a forma e estrutura das aberturas, são caracteres requeridos; entretanto, no contexto filogenético-evolucionário a posição das aberturas é importante, pois estas não estão localizadas ao acaso na superfície do grão de pólen e, freqüentemente, têm lugar definido com relação aos pólos e ao equador (Melhem, 1978).

O número e a forma das aberturas, além da estrutura da exina são estudados, para uso em taxonomia de grupos (Takahashi, 1983; Esteves 1998; Franklim e Esteves, 2002; Canceli *et al.*, 2006). As aberturas são as primeiras características utilizadas para a identificação de qualquer grão de pólen ou esporo fóssil (Moore e Webb, 1978). Além das aberturas, alguns outros importantes caracteres aplicados a morfologia do pólen visando a sua identificação são a forma e escultura da parede.

Inúmeros estudos têm sido realizados tomando por base as características morfológicas dos grãos de pólen de diferentes famílias e espécies e segundo Judd (1999), os estudos da morfologia dos grãos de pólen vêm sendo cada vez mais utilizados como dados auxiliares na classificação taxonômica de vários grupos vegetais.

Silva *et al.*, (2003), estudando doze espécies de *Cestrum* L. (Solanaceae), baseados em dados quantitativos e qualitativos dos grãos de pólen, elaboraram uma chave analítica para a identificação das espécies estudadas, mostrando que os dados analisados podem auxiliar na taxonomia do gênero *Cestrum*.

Franklim e Esteves (2008), realizando um estudo palinológico em espécies de *Solanum* L. (Solanaceae), ocorrentes nas restingas do estado do Rio de Janeiro, relatam que o confronto entre os resultados obtidos por eles e a bibliografia analisada mostra que o gênero *Solanum* apresenta um certo número de características semelhantes, porém também apresenta características marcantes relacionadas à variação morfológica das aberturas e à ornamentação da sexina que permitem separar a maioria dos táxons e que podem ser de grande auxílio na delimitação específica.

2.5.3. Estudos palinológicos

Os estudos com os grãos de pólen começaram a evoluir com o desenvolvimento da microscopia no século XVII e com o avanço dos aparelhos

ópticos no século XIX. Mas, foi no século XX com a descoberta de que os grãos de pólen constituem-se em um bom guia fóssil que o estudo do pólen obteve um enorme avanço surgindo a Palinologia (Wodehouse, 1935).

O termo Palinologia foi introduzido por Hyde e Willians em 1945 (Erdtman, 1986) e é definido como a ciência que estuda os grãos de pólen e esporos, tratando das suas estruturas e formações com sua dispersão e preservação sob certas condições ambientais (Moore e Webb, 1978).

Nos estudos palinológicos, a principal técnica utilizada é a acetólise de Erdtman 1952 (Hesse e Waha, 1989), que consiste em anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1 (Martins *et al.*, 2002), seguido se necessário pela oxidação com dióxido de cloro (Baker, 1954), o que permite a eliminação do conteúdo celular para observação da parede externa do pólen (Martins *et al.*, 2002).

O método da acetólise, no entanto, destrói completamente as substâncias não-esporopoleinina e vários estudos sobre a sistemática e filogenia das plantas necessitam de todos os componentes da parede do grão de pólen que não podem ser observadas em amostras acetolisadas (Hesse e Waha, 1989).

Efeitos similares a acetólise são obtidos depois da ebulição em HCL concentrado e lavagem com 10% de KOH (Hesse e Waha, 1989), no entanto segundo Erdtman (1943), essa metodologia não permite a observação de grãos completamente transparentes.

Outro método empregado para o estudo dos grãos de pólen é a da acetólise láctica (ACLAC) desenvolvida por Raynal e Raynal (1971). Esta técnica é utilizada quando os grãos de pólen são muito frágeis e não resistem à acetólise tradicional, consistindo na diminuição de anidrido acético e o acréscimo de ácido láctico tornando a mistura acetolítica mais fraca (Gasparino e Barros 2006). O método em questão permite observar, no microscópio, a saída do conteúdo protoplasmático antes que o grão de pólen se deforme (Moreira *et al.*, 2005) (exemplos, Franklim e Esteves, 2002; Crespo e Ferreira, 2006).

Para melhor visualização da forma e do tipo de abertura, os grãos de pólen podem ser tratados segundo o método de Wodehouse (1935), que apesar de não eliminar o conteúdo polínico e, portanto, não permitir a visualização detalhada da ornamentação do grão de pólen, permite a confecção de lâminas com durabilidade maior do que as obtidas na acetólise láctica. Este método é de

fácil execução e de grande utilidade principalmente aos taxonomistas que necessitam de uma visão rápida do grão de pólen (Gasparino e Barros 2006).

2.6. Viabilidade polínica

Os programas de melhoramento genético vegetal estão fundamentados na obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação genética existente no germoplasma de determinada espécie. Dentre os fatores responsáveis pelo sucesso desses programas destacam-se a seleção de genótipos e os cruzamentos cuja eficácia depende diretamente da viabilidade do pólen (Techio *et al.*, 2006).

A viabilidade polínica é um dos fatores que têm influência direta sobre o sucesso da fertilização, uma vez que o tamanho do fruto, o número de sementes e a percentagem de frutos aumentam se uma quantidade de grãos de pólen viáveis acima do requerido for depositada sobre o estigma (Akamine e Girolami, 1957, Stone *et al.*, 1995; Rodrigues-Riano e Dafni, 2000; Rigamoto e Tyagi, 2002).

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 este um estágio decisivo à fertilização. Essa avaliação pode ser determinada através de um grande número de técnicas (Oliveira *et al.*, 2001). Os métodos diretos incluem a indução da germinação do pólen *in vivo* ou *in vitro* e os indiretos, são baseados em parâmetros citológicos, como a reação a corantes e fluorocromos (Shivanna e Johri, 1985; Dafni, 1992; Shivanna e Rangaswamy, 1992, Kearns e Inouye, 1993).

Os métodos colorimétricos utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Dentre estes testes, destacam-se os testes com lugol, carmim acético e a solução tripla de Alexander (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

A coloração com lugol baseia-se em uma reação química que acontece entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, uma coloração amarela-clara e são transparentes. É indicado para espécies cujo material de reserva do grão de pólen é o amido (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

No teste do carmim acético, os grãos de pólen viáveis apresentam uma coloração rosa/vermelha forte, enquanto os grãos inviáveis mostram-se transparentes e não corados, devido à reação com o material genético existente no citoplasma, como o DNA (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

O método de Alexander (1969) utiliza uma solução tripla, composta por *orange G*, fucsina básica e verde malaquita. A fucsina básica é um corante específico para DNA, corando o citoplasma de vermelho; o verde malaquita colore de verde a parede do grão de pólen e o *orange G* é um intensificador. Através desse teste, o núcleo do grão de pólen viável reage com a fucsina e o pólen viável se cora de rosa, enquanto os grãos inviáveis coram-se de verde.

Apesar dos testes de coloração serem procedimentos simples e baratos, esses métodos não fornecem informações sobre a capacidade germinativa do pólen, o que pode ser avaliado através de testes de germinação *in vitro* (Techio *et al.*, 2006) ou via reação fluorocromática, também conhecido como teste do FCR. Nesse método, os grãos de pólen que não são plenamente fluorescentes, ou seja, grãos pouco fluorescentes e sem fluorescência são considerados inviáveis, enquanto que os grãos de pólen fluorescentes são tidos como viáveis. A reação de fluorescência está diretamente correlacionada com a integridade da membrana do grão de pólen, que por sua vez participará da germinação e crescimento do tubo polínico. Entretanto, esses métodos são mais complexos (Heslop-Harrison *et al.*, 1984).

A viabilidade do pólen relaciona-se diretamente com a normalidade da microsporogênese (Muñoz *et al.*, 2006). A eficácia dos cruzamentos, tanto dentro de uma espécie como entre espécies depende da viabilidade do pólen (Techio *et al.*, 2006) e normalmente uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular.

2.7. Divergência genética e análise multivariada

Em programas de melhoramento baseados em hibridação, genótipos segregantes superiores são recuperados mais rápida e eficientemente quando a população-base para a seleção associa superioridade das características sob

melhoramento à ampla variabilidade genética, esta última oriunda da diversidade genética entre os progenitores envolvidos nos cruzamentos (Falconer, 1981).

A divergência genética pode ser definida como a distância genética entre populações, indivíduos ou organismos, tomando por base várias características, que podem ser morfoagronômicas, fisiológicas, bioquímicas, polimorfismos de DNA, dentre outras, que seja de interesse do pesquisador (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999).

A grande importância dos estudos de divergência genética está no conhecimento do grau de variabilidade genética das populações, em função da preocupação que ocorre com a erosão genética, ou seja, com a redução da variabilidade genética das populações vegetais, decorrente da substituição das antigas variedades por formas genótípicas uniformes (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999). Outra importância da avaliação da divergência genética reside no contexto da evolução das espécies, uma vez que provê informações sobre recursos disponíveis e auxilia na localização e intercâmbio desses (Cruz *et al.*, 2004).

A diversidade genética entre grupos de progenitores tem sido avaliada com o objetivo de identificar as combinações híbridas de maior efeito heterótico e maior heterozigose, de tal forma que, em suas gerações segregantes, se tenha maior possibilidade de recuperação de genótipos superiores (Cruz *et al.*, 2004). Quanto mais divergentes forem os genitores, maior a variabilidade resultante na população segregante, e maior a probabilidade de reagrupar os alelos em novas combinações favoráveis (Benin *et al.*, 2003).

Há duas maneiras básicas de se inferir a diversidade genética, sendo a primeira de natureza quantitativa e a outra de natureza preditiva. Entre os métodos de natureza quantitativa de avaliação da diversidade, ou da heterose manifestada nos híbridos, citam-se as análises dialélicas (Miranda *et al.*, 1988) e entre os métodos preditivos da heterose citam-se aqueles que tomam por base as diferenças morfológicas, fisiológicas ou moleculares, quantificando-as em alguma medida de dissimilaridade que expressa o grau de diversidade genética entre os genitores (Cruz e Carneiro, 2003).

Segundo Falconer (1981), a partir de estimativas da divergência genética entre as populações, é possível obter inferências sobre a capacidade específica de combinação, e, conseqüentemente, da heterose, sem a utilização de cruzamentos dialélicos. Assim, medidas de divergência genética obtidas antes

que qualquer cruzamento seja realizado podem auxiliar os melhoristas a concentrar seus esforços somente nas combinações mais promissoras, uma vez que a heterose manifestada nos cruzamentos está diretamente relacionada à divergência genética entre seus pais.

Uma metodologia bastante utilizada para estimar a divergência genética são as técnicas de análise multivariada (Cruz, 1990), pois permitem quantificar a diversidade genética existente nas espécies, identificar grupos similares ou dissimilares e ainda otimizar o uso dessa diversidade pela identificação dos caracteres mais informativos para a divergência genética (Cruz *et al.*, 2004). De acordo com Santos *et al.*, (2000), os métodos multivariados, têm oferecido contribuições efetivas na identificação de genótipos para serem utilizados em programas de melhoramento genético de várias culturas.

A utilização da técnica multivariada permite ao melhorista que a avaliação do material genético seja feita sobre um conjunto de características que combina as múltiplas informações contidas na unidade experimental. Desse modo, é possível selecionar genótipos mais promissores e avaliar a sua divergência, levando em consideração a contribuição e a importância relativa dos caracteres para a variância total existente entre as populações (Oliveira, 1989).

Na predição da divergência genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados. Dentre eles, a análise por componentes principais e por variáveis canônicas e os métodos aglomerativos. A escolha do método mais adequado tem sido determinada pela precisão desejada pelo pesquisador, pela facilidade da análise e pela forma como os dados foram obtidos. Os métodos aglomerativos diferem dos demais, em razão de dependerem fundamentalmente de medidas de dissimilaridade estimadas previamente (Cruz *et al.*, 2004).

O uso de métodos de aglomeração objetiva a reunião de entidades em grupos homogêneos, de tal forma que seja minimizada a variação dentro e maximizada a variância entre grupos. O processo de aglomeração envolve basicamente duas etapas. A primeira relaciona-se com a estimativa de uma medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre os indivíduos a serem agrupados. A segunda envolve a adoção de uma técnica de agrupamento para a formação dos grupos (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999).

Oliveira *et al.*, (1999), avaliando a diversidade genética entre 133 genótipos de pimentão (*Capsicum annuum*) em relação a doze características

agronômicas, através do uso de técnicas de análise multivariada (distância D^2 de Mahalanobis, agrupamento pelo método de Tocher), obtiveram quinze grupos e concluíram que as características de maior contribuição para a diversidade genética foram altura da primeira bifurcação, altura da planta, relação comprimento/largura do fruto e índice de precocidade.

Sudré *et al.*, (2005), estudando a divergência genética entre 56 acessos de *Capsicum* spp., a partir de caracteres morfoagronômicos através do uso de métodos multivariados, concluíram que o método hierárquico do vizinho mais próximo foi adequado para realizar o agrupamento de diferentes espécies e de variedades de pimentas dentro da mesma espécie botânica. Segundo os autores, a variabilidade genética observada nos genótipos da coleção, foi suficiente para indicar o uso dos acessos avaliados em programas de melhoramento.

2.7.1. Distância euclidiana média (d_{ij})

As medidas de dissimilaridade são de grande importância em estudos de divergência genética em que se procura identificar genitores a serem utilizados em programas de hibridação (Cruz e Carneiro, 2003).

A quantificação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros estimados pelos melhoristas de plantas, principalmente quando o objetivo for a obtenção de segregantes transgressivos e populações de ampla variabilidade genética (Benin *et al.*, 2003).

De acordo com Falconer (1981), no melhoramento genético, a dissimilaridade genética possui uma importância fundamental na escolha de genótipos a serem utilizados como progenitores, já que a divergência genética entre os parentais é um indicativo da expressão heterótica nas progênies. Para a realização de um programa eficiente de melhoramento é necessário reunir o maior número possível de informações relevantes sobre o germoplasma a ser utilizado.

As medidas de dissimilaridade genética, como forma de caracterizar e identificar constituições genéticas distintas de diferentes espécies têm despertado muito interesse e entre os métodos de dissimilaridade, a distância Euclidiana média e a distância de Mahalanobis (D^2) têm sido rotineiramente utilizadas (Cruz *et al.*, 2004).

De acordo com Manly (1986), a distância Euclidiana entre dois objetos quaisquer é obtida por analogia ao Teorema de Pitágoras, para um espaço multidimensional, sendo equivalente ao comprimento da hipotenusa do triângulo retângulo projetado. No entanto, a Distância Euclidiana, quando estimada a partir de variáveis originais, apresenta a inconveniência de ser influenciada pela escala, pelo número de variáveis e pela correlação existente entre as mesmas. Segundo Cruz *et al.*, (2004), preconizam que para contornar o problema de escala, tem sido recomendável a padronização dos dados, e, para contornar a influência do número de caracteres, utiliza-se a distância Euclidiana Média.

Embora a Distância Euclidiana não leve em consideração a correlação entre as características avaliadas, esta técnica pode ser utilizada em situações em que não se dispõe de dados experimentais com repetições, impossibilitando a estimação das variâncias e co-variâncias residuais (Cruz e Regazzi, 2001).

2.7.2. Métodos de agrupamento

O princípio básico de todos os métodos de agrupamento é o de maximizar a similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos (Hair *et al.*, 2005). A análise de agrupamento permite classificar n itens (populações, indivíduos, clones, variedades) avaliados por um conjunto de p caracteres, cujo objetivo é identificar e separar os indivíduos em grupos similares. Esta técnica desconhece *a priori* o número e a composição dos diferentes grupos ou *clusters* a serem formados (Cruz *et al.*, 2004; Hair *et al.*, 2005).

Há inúmeros métodos de agrupamento na literatura (Mardia *et al.*, 1997), que se distinguem pelo tipo de resultado a ser fornecido e pelas diferentes formas de definir a proximidade entre um indivíduo e um grupo já formado ou entre dois grupos quaisquer. Dos métodos de agrupamento, os mais utilizados são os de otimização e os hierárquicos (Cruz e Carneiro, 2003) e segundo Mohammadi e Prasanna (2003), os métodos hierárquicos são os mais comumente empregados em análise de divergência genética.

2.7.2.1. Métodos hierárquicos

Nos métodos hierárquicos, o objetivo final é a obtenção de um diagrama em árvore ou dendrograma, onde os agrupamentos podem ser obtidos, subjetivamente, tomando-se por base as diferenças abruptas de mudanças de nível no dendrograma (Cruz e Regazzi, 1994; Amaral Júnior, 1994). Neste caso, não há preocupação com o número ótimo de grupos, uma vez que o interesse maior está nas árvores e nas ramificações que são obtidas (Cruz *et al.*, 2004).

Os métodos hierárquicos são também divididos em métodos aglomerativos e divisivos. Dentre os métodos aglomerativos, citam-se o vizinho mais próximo; o do vizinho mais distante; o da ligação média, ponderado ou não; o do centróide, também ponderado ou não; e o proposto por Ward. Dentre os métodos divisivos, o mais conhecido é o de Edwards e Cavalli-Sforza (Cruz *et al.*, 2004).

Segundo Mohammadi e Prasanna (2003), os métodos hierárquicos são os mais comumente empregados em análise de divergência genética e, dentre eles, o UPGMA é o mais utilizado, seguido pelo método de Ward.

No método de Ward, são considerados para a formação inicial do grupo, os indivíduos que apresentam a menor soma de quadrados dos desvios (SQD). Admite-se que, em qualquer estágio, há perda de informações em razão do agrupamento realizado, o qual pode ser identificado pela razão entre a SQD, dentro do grupo em formação, e a soma de quadrado total (SQT) dos desvios. A SQD é calculada considerando apenas os acessos dentro do grupo em formação e a SQT é calculada considerando todos os indivíduos disponíveis para a análise de agrupamento (Cruz e Carneiro, 2003).

2.7.2.2. Métodos de otimização

Os métodos de otimização diferem, basicamente, dos hierárquicos, pelo fato dos grupos formados serem mutuamente exclusivos, ou seja, serem independentes (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999). Nos métodos de otimização os grupos são formados pela adequação de algum critério de agrupamento, ou seja, o objetivo é alcançar uma partição dos indivíduos que otimize (maximize ou minimize) alguma medida predefinida (Cruz e Carneiro, 2003).

Um dos métodos mais comumente utilizados na área de melhoramento genético é o proposto por Tocher, citado por Rao em 1952 (Cruz e Carneiro,

2003). Nesse método adota-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre quaisquer grupos. O método requer a obtenção da matriz de dissimilaridade, sobre a qual é identificado o par de progenitores mais similar. Estes progenitores formam o grupo inicial e a partir daí é avaliada a possibilidade de inclusão de novos progenitores (Cruz *et al.*, 2004).

2.7.3. Componentes principais

Segundo Cruz *et al.* (2004), a análise por componentes principais consiste em transformar um conjunto original de variáveis em outro conjunto de dimensão equivalente, mas com propriedades importantes, que são de grande interesse em certos estudos de melhoramento, sendo que cada componente principal é a combinação linear das variáveis originais. Além disso, são independentes entre si e estimados com propósito de reter, em ordens de estimação o máximo, em termos de variação total, contida nos dados iniciais.

A técnica dos componentes principais para o estudo da diversidade genética tem sido aplicada em várias espécies de plantas, sobretudo quando não se dispõe de dados com repetições (Schuelter, 1996) e além de possibilitar o estudo da diversidade genética de um grupo de progenitores, tem a vantagem de possibilitar a avaliação da importância de cada caráter estudado sobre a variação total disponível entre os genótipos avaliados, possibilitando, desta forma, o descarte de caracteres que contribuem pouco para a discriminação do material avaliado (Cruz *et al.*, 2004).

De acordo com Dias (1994), a importância de cada componente principal é dada pela porcentagem de variância total que ele absorve. Em geral, os primeiros componentes principais em estudos de divergência genética têm sido utilizados quando esses envolvem pelo menos 80% da variação total (Cruz *et al.*, 2004). Quando esse limite é atingido, a variabilidade entre os indivíduos avaliados pode ser explicada satisfatoriamente apenas por esses primeiros componentes, simplificando a interpretação. Neste caso, a representação gráfica dos resultados é indicada. Nos casos em que esse limite não é atingido, a análise é complementada pela dispersão gráfica em relação ao terceiro e quarto componente (Cruz, 1990).

Cruz (1990) ressalta, ainda, que a técnica de componentes principais permite uma maior simplificação nos cálculos estatísticos e na interpretação dos resultados em relação aos demais métodos alternativos, à medida que poucos componentes sejam suficientes para explicar a variação existente.

Os componentes principais podem ser usados para o exame das correlações entre características estudadas; reunião de um conjunto maior de características em outro menor e de sentido biológico; avaliação da importância de cada característica; construção de índices que possibilitem o agrupamento dos acessos e o agrupamento dos acessos com mais alto nível de similaridade, por meio de dispersões gráficas (Cruz, 1990; Carvalho, 1993; Schuelter, 1996).

3. TRABALHOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO PALINOLÓGICA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM ACESSOS DE *Capsicum* L.

3.1.1. RESUMO

O presente trabalho objetivou caracterizar morfológicamente os grãos de pólen de sete acessos representantes de espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres de *Capsicum* e com base nos caracteres morfopolínicos quantitativos estudar a divergência genética entre os acessos. Botões florais foram coletados em solução fixadora etanol-ácido acético (3:1) sendo os grãos de pólen acetolisados, medidos sob microscopia óptica com o uso do programa *Image-Pro Plus* versão 5.1 e posteriormente descritos tomando por base as terminologias dos glossários palinológicos. O estudo da dissimilaridade entre os acessos foi feito com base na distância euclidiana média padronizada e a análise de agrupamento foi feita pelos métodos de Ward e Tocher. Foi feita a representação gráfica da similaridade entre os acessos pelo método da Análise dos Componentes Principais (ACP) e verificou-se qual dos caracteres avaliados foi mais discriminante para o estudo morfopolínico de *Capsicum* spp. O estudo da morfologia polínica permitiu a observação de grãos de pólen com características

típicas da família Solanaceae, sendo descritos como isopolares, variando de pequenos a médios, com âmbito triangular e subcircular, 3-colporados, poro lalongado e trizonocolporados. Pelo método de Ward e ACP foi possível agrupar os acessos de acordo com a classificação dos complexos gênicos já descrita para as espécies *Capsicum*. Pelo método de Tocher não foi observada o mesmo agrupamento, sendo observada em um mesmo *cluster* espécies pertencentes a complexos gênicos diferentes. A variável largura do Poro foi a mais discriminante para o estudo morfopolínico de *Capsicum* spp, enquanto a variável eixo polar em vista equatorial tem pouca importância para análise de grãos de pólen em *Capsicum*.

3.1.2. ABSTRACT

The present work aimed to characterize morphologically the pollen grains of seven accesses from domesticated, semi domesticated and wild *Capsicum* species and based on the quantitative morphopolinic characters to study the genetic divergence among the accesses. To do that, flower buds were collected in fixative solution ethanol-acetic acid (3:1) and after fixation the pollen grains were acetolysed, measured under optical microscopy and later described. The study of the dissimilarities among the accesses was done base on the distance standardized medium Euclidian and the *clustering* analysis was made by the Ward's and Tocher's methods. It was also done the graphic representation of the similarity among the accesses by the Principal Component Analysis (PCA) and it was verified which of the characters was the most discriminating for the morphopolinic study of *Capsicum* spp. The study of the polinic morphology revealed that the pollen grains present characteristics typical of the Solanaceae family, being described as isopolars, varying from small to medium size, with triangular amb and sub circular, 3-colporade, lalongate pore and trizonocolporate. By Ward and PCA' methods was possible to *cluster* the accesses according to the pool genic already described to the *Capsicum* species. By the Tocher' method was not observed the same *clustering*, being observed in the same *cluster* species that belong to different pool genic. The variable pore width was the most discriminating

characteristic for the morphopolinic study of *Capsicum* spp, while the variable polar axis in equatorial view has little importance for the pollen grain analysis of *Capsicum*.

3.1.3. INTRODUÇÃO

Um dos pontos fundamentais no melhoramento é a escolha dos genitores para obtenção de populações de ampla base genética onde a seleção atuará. Isto é conseguido quando se alia uma alta média e uma ampla variabilidade genética para a característica a ser melhorada (Ferreira *et al.*, 1995). A variabilidade genética existente no gênero *Capsicum* é grande e para que a implantação de um programa de melhoramento seja bem sucedida é necessário conhecer a variabilidade existente, para que a seleção de materiais genéticos seja feita de maneira a aproveitar todo o potencial da cultura. Além disso, é de grande importância a identificação dos caracteres de maior relevância para a divergência genética (Moreira *et al.*, 2005).

A avaliação de germoplasma, por meio da divergência genética, é importante para o conhecimento da organização e estrutura das relações evolucionárias (Carvalho *et al.*, 2003). Nas últimas décadas, o estudo da morfologia polínica, vem sendo utilizado como auxiliar na classificação taxonômica (Judd, 1999), gerando informações sobre a identidade genética e parentesco de genótipos, que são importantes para a exploração do germoplasma, visando à focalização de máxima diversidade genética (He *et al.*, 1995).

A evolução do pólen tem sido estudada tanto do ponto de vista morfológico quanto fisiológico. A análise morfológica tem sido principalmente voltada à sistemática (Dajoz *et al.*, 1991). Pelas diferentes características que podem ser observadas na estrutura dos grãos de pólen, é possível até mesmo a determinação da planta em diversos níveis taxonômicos (Takeda *et al.*, 2001), sendo o estudo dos grãos de pólen focado principalmente na comparação das diferentes morfologias polínicas encontradas nas espécies.

O emprego dos caracteres polínicos na sistemática data do início dos anos 70 (Muller, 1970; Walker e Doyle, 1975) e vem ganhando espaço na sistemática filogenética (Chase *et al.*, 1993; APG, 2003). Semelhanças e diferenças entre os grãos de pólen constituem uma técnica taxonômica que se tornou básica para diversas famílias botânicas (Salgado-Labouriau, 1973), uma vez que o conjunto das características de um pólen é constante para cada planta e torna possível identificar com mais precisão de que “taxa” provém o pólen (Soler e Nolla, 2002).

Caracteres como a ornamentação da exina, têm sido utilizados como indicadores de relações filogenéticas por diversos autores e têm sido importantes na delimitação de gêneros e espécies em famílias estenopolínicas (Temponi, 2006).

Segundo Mc Leod (1986), a taxonomia do gênero *Capsicum* ainda é confusa, devido às divergências sobre sua história evolutiva e sobre as relações sistemáticas entre as espécies silvestres e domesticadas. Em vista disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfológicamente os grãos de pólen de alguns acessos representantes de espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres de *Capsicum* e verificar o grau de similaridade dessas espécies com base nos caracteres quantitativos do pólen, através de técnicas de análise multivariada.

3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.4.1. Material genético e condições de cultivo

Foram estudados os grãos de pólen de sete acessos representantes de sete espécies do gênero *Capsicum*: as espécies domesticadas *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), *C. chinense* (UENF 1785), *C. baccatum* var. *pendunlum* (UENF 1624) e *C. frutescens* (UENF 1636); as semi-domesticadas *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495); e a espécie silvestre *Capsicum parvifolium* (CNPB 3331), cedida pela Embrapa hortaliças.

Sementes desses acessos foram inicialmente colocadas para germinar em B.O.D. a 27,5°C, em 8 horas de luz e 16 horas de escuro e posteriormente plantadas em casa de vegetação em bandejas de isopor com substrato vegetal Plantmax®, sendo dez plantas por espécie. Cerca de dois meses após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 5 L utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal.

As adubações de cobertura e defensivos agrícolas para controle de pragas e doenças foram empregados de acordo com as recomendações para a cultura (Filgueira, 2000).

3.1.4.2. Métodos

3.1.4.2.1. Caracterização Palinológica

Para análise da morfologia polínica foram coletadas pela manhã por planta, no mínimo, duas flores na antese e as anteras foram acetolisadas seguindo o método da acetólise descrito por Erdtman (1960) com modificações

3.1.4.2.1.2. Acetólise

Para o preparo das lâminas botões florais foram coletados e fixados em solução etanol-ácido acético, na proporção 3:1 por no mínimo 24 horas. Posteriormente foram retiradas duas a três anteras por botão fixado e as mesmas foram colocadas em microtubos de 1ml de ácido acético. Os tubos foram então colocados na centrífuga, centrifugados com 3000 rotações por minutos durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado.

Paralelamente, foi preparada a mistura acetolítica de Erdtman (1960) que promove a hidrólise ácida nos grãos de pólen através de uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico com proporção de 9:1, com o intuito de eliminar o conteúdo celular, facilitando a visualização e o reconhecimento dos caracteres morfológicos.

Os grãos de pólen ficaram imersos na mistura acetolítica, em banho-maria, em uma temperatura de cerca de 100°C durante dois minutos. Os tubos foram então transferidos para centrífuga e depois da centrifugação a mistura

acetolítica foi decantada. Em cada tubo foi acrescentado 1 ml de água destilada mais 2 gotas de álcool etílico e o material centrifugado e decantado. Foi acrescentado em cada tubo, 1 ml de água destilada e glicerina na proporção de 3:1, ficando por no máximo duas horas. Após esse período o tubo foi colocado com a abertura voltada, para o papel de filtro, ficando assim o material em condições de ser depositado em lâmina.

3.1.4.2.2. Montagem das lâminas

Para observação dos grãos de pólen acetolisados foram montadas lâminas com gelatina glicerinada, segundo Kissler (1935, citado por Erdtman, 1952). Encostou-se um estilete aquecido em um pedaço de gelatina glicerinada, com cerca de 2mm de lado, no sedimento presente nos tubos que foram previamente colocados de cabeça para baixo sobre papel de filtro. A gelatina glicerinada contendo o sedimento foi colocada sobre uma lâmina que foi então aquecida até a fusão da gelatina. Em seguida colocou-se uma lamínula sobre a mancha de gelatina glicerinada e a lâmina foi observada ao microscópio óptico.

3.1.4.2.4. Medidas dos grãos de pólen

As mensurações foram realizadas no máximo sete dias após a preparação das lâminas, com o intuito de evitar possíveis problemas de intumescimento, que podem ocorrer com o passar do tempo (Melhem e Matos 1972, Salgado-Labouriau 1973), visto que os grãos de pólen tendem a aumentar de tamanho depois de submetidos ao processo de acetólise (Faegri e Deuse, 1960).

Foram obtidas medidas dos eixos polar e equatorial em vista equatorial (posição em que o grão de pólen está perpendicular à vista polar) e do eixo equatorial em vista polar (posição em que o grão de pólen está com uma área polar voltada para o observador) dos grãos de pólen, além das medidas das aberturas (poro e colpo), da espessura das camadas da exina (sexina e nexina) e do apocolpo (Figura 1). Foram efetivadas 26 medidas de cada característica do pólen examinada, aleatoriamente em diferentes lâminas, sendo mensurados no mínimo cinco pólenes por lâmina.

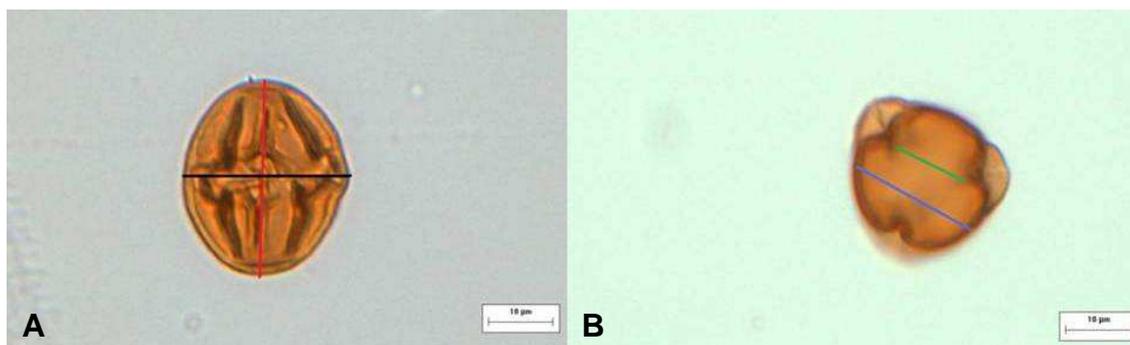


Figura 1. Representação das medidas dos grãos de pólen de *C. chinense* (UENF 1785): a) medida do eixo polar (vermelho) e do diâmetro equatorial (preto) em vista equatorial; b) medida do diâmetro equatorial (azul) e do lado do apocolpo (verde) em vista polar. Barra = 10 µm.

Para classificar os grãos de pólen de acordo com sua forma, foi utilizada a relação entre o eixo polar e o eixo equatorial (P/E) em vista equatorial. Classificação proposta por Erdtman (1952) que criou um índice para a forma dos grãos de pólen com nove classes (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos grãos de pólen com base na razão P/E, segundo Erdtman (1952):

Classes de Pólen		
P/E	Denominação	
0,50	Peroblato	
0,50 – 0,74	Oblato	
0,75 – 0,87	Suboblato	Subesferoidal
0,88 – 0,99	Oblato-esferoidal	
1,00	Esférico	
1,01 – 1,14	Prolato-esferoidal	
1,15 – 1,33	Subprolato	
1,34 – 2,00	Prolato	
2,00	Perprolato	

Em relação ao seu tamanho os grãos de pólen foram classificados de acordo com Erdtman (1945), baseado no comprimento do eixo maior nas seguintes classes: muito pequenos ($< 10 \mu$), pequenos ($10-25 \mu$), médios ($25-50 \mu$), grandes ($50-100 \mu$), muito grandes ($100-200 \mu$) e gigantes ($> 200 \mu$).

A forma das aberturas foi determinada de acordo com a relação entre os dois diâmetros da mesma, sendo classificadas como poro as aberturas mais ou menos circulares em que a relação entre os dois diâmetros foi menor que 2:1 e classificadas como colpo, as aberturas alongadas cuja relação entre os dois diâmetros foi maior que 2:1 (Erdtman, 1952).

Os grãos de pólen foram também classificados tomando por base o índice de área polar, que é dado pela relação entre as extremidades de duas aberturas adjacentes (ou suas margens) e a maior largura do grão de pólen em vista polar, de acordo com classificação proposta por Iversen e Troels-Smith em 1950 e Faegri e Iversen em 1964 (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos grãos de pólen em relação ao índice de área polar (IAP):

Denominação	Intervalo do I.A.P.
Sem área polar	0
Área polar muito pequena	<0,25 (abertura muito longa)
Área polar pequena	0,25 – 0,50 (abertura longa)
Área polar grande	0,50 – 0,75 (abertura curta)
Área polar muito grande	>0,75 (abertura muito curta)

Posteriormente as descrições polínicas e as terminologias adotadas foram baseadas no glossário de Barth e Melhem (1988), Barth (1964) e Punt *et al.* (2007).

Os grãos de pólen acetolisados e preparados para exame em microscopia óptica foram observados em microscópio BX60 e as imagens, capturadas, analisadas e medidas utilizando-se o programa *Image-Pro Plus* versão 5.1.

3.1.4.2.5. Análise Estatística

Para todas as medidas, foi obtida a média aritmética, o desvio padrão da amostra, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança a 95% (Vieira, 1981).

3.1.4.2.6. Análise Multivariada

A composição dos grupos formados pelos acessos mais similares entre si foi determinada pelos métodos de otimização de Tocher e pelo método de agrupamento hierárquico de Ward, utilizando como medida de dissimilaridade a Distância Euclidiana Média Padronizada, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2006) e do programa R (<http://www.rproject.org>). Outra técnica multivariada utilizada para estimar a divergência genética dos acessos de *Capsicum* foi a dos componentes principais.

3.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.5.1. Caracterização Palinológica

Os resultados morfológicos permitiram caracterizar os grãos de pólen do gênero *Capsicum* como pequenos (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*) e médios (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum* e *C. parvifolium*), isopolares com pólo proximal e distal semelhantes, de âmbito triangular a subcircular e simetria radial. A área polar variou em tamanho, sendo encontrada área polar de pequena a grande (Figura 2 e Tabela 3).

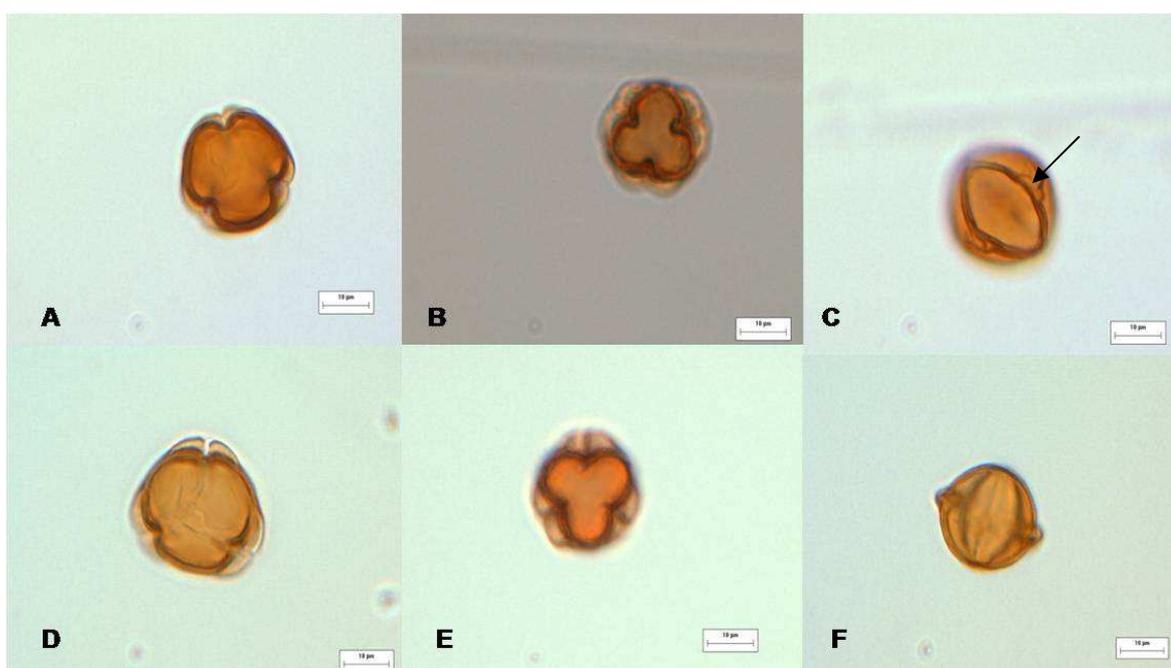


Figura 2. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Capsicum*: a) Vista polar em *C. parvifolium* (CNPB 3331); b) Vista equatorial de *C. chinense* (UENF 1785); c) Vista equatorial de *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), mostrando os colpos (seta); d) Vista equatorial de *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) com âmbito subcircular; e) Vista equatorial em *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562) com âmbito triangular; f) Vista equatorial em *C. frutescens* (UENF 1636).

As aberturas são compostas, apresentando-se sempre em número de três, sendo caracterizadas como colpo e possuindo uma endoabertura circular alongada (alongada transversalmente), chamada poro, denominando-se os grãos

de pólen de tricolporados. Essas características estão em concordância com o descrito para as espécies do cerrado da família Solanaceae, que possuem tipos diferentes de pólen, com predominância de grãos triaperturados com ós grande e lalongado (Salgado-Labouriau, 1973).

Franklim e Esteves (2008) ao realizarem um estudo palinológico de 21 táxons de *Solanum* L. ocorrentes na restinga do estado do Rio de Janeiro, conseguiram separar algumas espécies principalmente com base nas peculiaridades da endoabertura. No entanto, todas as espécies possuíam endoabertura lalongada, sendo também tricolporadas.

Os colpos variaram de curtos a longos (Tabela 3) possuindo contorno irregular e extremidades arredondadas. Em todas as espécies estudadas, os colpos se distribuem de forma equidistante ao redor do equador do grão (trizonocolporados). Barth e Duarte (2008) trabalhando com nove espécies arbóreas pertencentes a seis gêneros (*Acnistus*, *Aureliana*, *Brunfelsia*, *Capsicum*, *Cestrum* e *Solanum*) da família Solanaceae, conseguiram agrupar os grãos de pólen das espécies em seis tipos polínicos correspondendo aos seis gêneros examinados, no entanto todos os tipos polínicos possuíam aberturas zonocolporadas.

Tabela 3. Caracterização morfológica dos acessos estudados representantes de sete espécies de *Capsicum*.

Acesso*	Âmbito	Forma	Área Polar	Colpo	Exina
UENF 1562	Triangular	prolato-esferoidal	Pequena	Longo	Faveolada
UENF 1559	Subcircular	prolato-esferoidal	Grande	Curto	Faveolada
UENF 1495	Subcircular	oblato-esferoidal	Grande	Curto	Faveolada
UENF 1624	Subcircular	prolato-esferoidal	Grande	Curto	Faveolada
UENF 1785	Triangular	prolato-esferoidal	Pequena	Longo	Faveolada
UENF 1636	Triangular	prolato-esferoidal	Pequena	Longo	Faveolada
CNPH 3331	Subcircular	prolato-esferoidal	Grande	Curto	Faveolada

**C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF1559), *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), *C. chinense* (UENF 1785), *C. frutescens* (UENF 1636) e *Capsicum parvifolium* (CNPH 3331).

Analisando-se o intervalo de confiança a 95% (Figura 3) da largura da endoabertura, dos grãos de pólen dos acessos estudados, observou-se que a espécie *C. annuum* var. *annuum* (8,45 μm) e *C. chinense* (8,49 μm), não se separam entre si, mas se separam das demais espécies por apresentarem poros com valores médios de largura do poro menores. Pela ordem de tamanho, estão listadas em seguida as espécies *C. frutescens* (9,50 μm) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (9,51 μm), no entanto, essas espécies não se separam das demais: *C. baccatum* var. *baccatum* (10,49 μm) *C. baccatum* var. *pendulum* (10,77 μm) e *C. parvifolium* (11,03 μm).

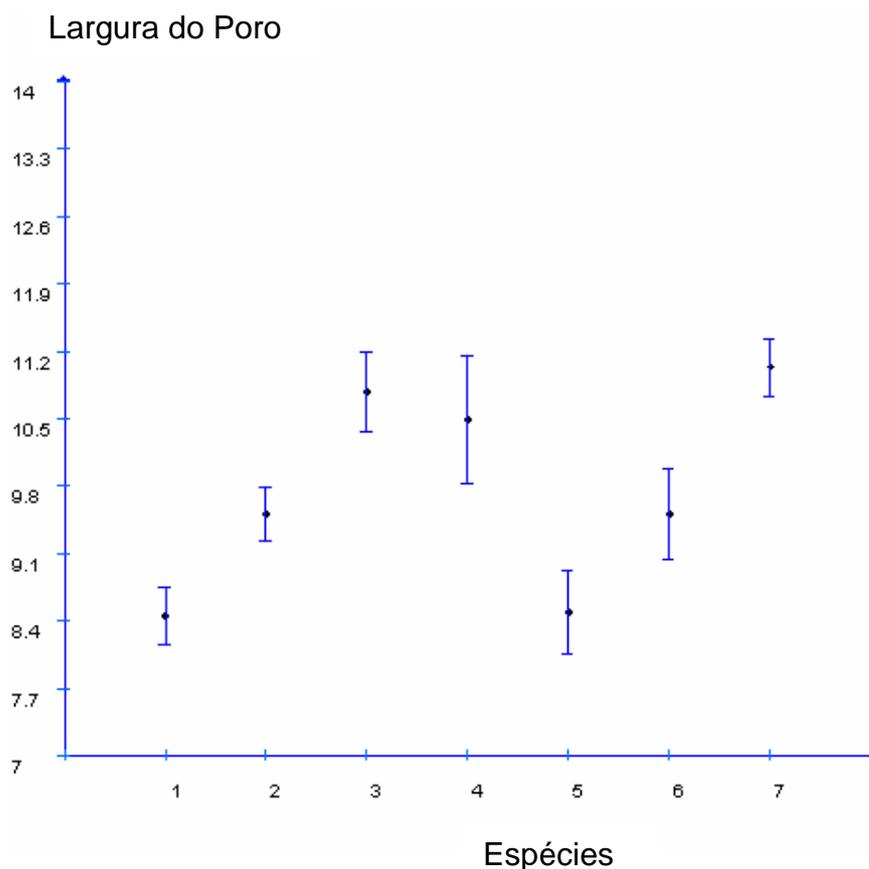


Figura 3. Representação gráfica do intervalo de confiança a 95% dos grãos de pólen, com base na largura do poro das espécies *C. annuum* var. *annuum*- UENF 1562 (1), *C. annuum* var. *glabriusculum*- UENF 1559 (2), *C. baccatum* var. *pendulum*- UENF 1624 (3), *C. baccatum* var. *baccatum*- UENF 1495 (4), *C. chinense*- UENF 1785 (5), *C. frutescens*- UENF 1636 (6) e *C. parvifolium*- CNPH 3331 (7).

De acordo com Melhem (1978), para a rotina de identificação do pólen, o número, a forma e a estrutura das aberturas, são caracteres requeridos; entretanto, no contexto filogenético-evolucionário a posição das aberturas é importante, pois estas não estão localizadas ao acaso na superfície do grão de pólen e, freqüentemente, têm lugar definido com relação aos pólos e ao equador.

Em relação à forma dos grãos de pólen, as espécies estudadas são classificadas em prolato-esferoidal e oblato-esferoidal, este último apenas em *C. baccatum baccatum* (Tabela 3). A forma da espécie *Capsicum schottianum* Sendtn. var. *flexuosum* (Sendtn.) A.T. Hunziker foi identificada por Barth e Duarte, (2008) como subprolata, o que segundo Erdtman (1952) pode juntamente com as classes suboblato, oblato-esferoidal, esférico e prolato-esferoidal serem denominadas subesferoidais. De acordo com Santos (1998), a presença de grãos de pólen subesferoidais é comum entre as Solanaceae.

Os valores médios das principais mensurações realizadas encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6. A exina ficou entre 1,05 μm e 1,28 μm , sendo a espécie *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), a que apresentou o grão de pólen com menor espessura. Nas espécies *C. annuum* e suas variedades, *C. chinense* e *C. frutescens*, as subdivisões da exina (sexina e nexina) apresentaram valores semelhantes, enquanto que nas espécies *C. baccatum* e suas variedades e *C. parvifolium*, a parede externa do pólen foi sempre maior que a interna (Tabela 6).

Segundo Punt e Monna-Brands (1977), Murry and Eshbaugh em 1971, deram informações sobre os grãos de pólen de *Solanum* e alguns gêneros taxonomicamente relacionados como *Capsicum* e de acordo com eles, a sexina e a nexina são quase de igual espessura, enquanto em *Solanum*, a sexina é mais espessa do que a nexina. No entanto, segundo Punt e Monna-Brands, na ilustração dada por Murry e Eshbaugh de *Capsicum baccatum*, a sexina é claramente maior em espessura do que a nexina, enquanto que em algumas espécies de *Solanum*, a sexina não é obviamente maior do que a nexina, sendo a diferenciação dessas duas camadas, um tanto obscura. Já no trabalho realizado por Punt e Monna-Brands, nos espécimes de *Capsicum annuum*, a sexina é distintamente maior que a nexina.

Segundo Perveen e Qaiser (2007), em geral, entre as Solanaceae, as camadas da exina possuem a mesma espessura. Valores de sexina e nexina semelhantes foram encontrados em seções do gênero *Solanum* (Rinaldi e Cuadrado, 1998). No entanto, em *Capsicum schottianum*, a sexina apresenta-se bem maior que a nexina (Barth e Duarte, 2008). Cabrera e Cuadrado (1998) analisando a morfologia polínica de algumas tribos da subfamília *Solanoideae*, observaram que em todas as tribos, a sexina é mais espessa que a nexina.

A família Solanaceae é considerada uma importante e grande representante das angiospermas, sendo distribuída através de regiões tropicais e temperadas do mundo (D'Arcy, 1991). Tratando-se de uma família euripolínica, a morfologia polínica auxilia na delimitação de gêneros e espécies (Barth e Duarte, 2008). No entanto, segundo Persson *et al.*, (1994), existem relativamente poucos estudos polínicos sendo realizados com membros da família Solanaceae, considerando seu tamanho e importância econômica.

No Brasil, a morfologia polínica das Solanaceae foi estudada por Salgado-Labouriau (1973), Wiebek e Wiebek (1974), Franklin e Esteves (2002) e Silva *et*

al. (2003), do ponto de vista palinológico, alguns gêneros como *Solanum* (Passarelli, 1999; Hussein e Gamal, 2007; Franklim e Esteves, 2008) e *Cestrum* (Salgado-Labouriau, 1973; Silva *et al.*, 2003) são relativamente bem estudados, já no gênero *Capsicum*, o número de trabalhos é consideravelmente menor (Raghuvanshi, 1977; Kumar *et al.*, 1986).

Tabela 4. Medidas (μm) do diâmetro equatorial e do eixo polar em vista equatorial dos grãos de pólen dos acessos estudados, onde: μ = média; FV= faixa de variação; s= desvio padrão da amostra; CV= coeficiente de variação; P/E= eixo polar/eixo equatorial.

VISTA EQUATORIAL									
Acessos*	Diâmetro Equatorial (VE)				Eixo Polar (VE)				P/E
	μ	FV	s	CV	μ	FV	s	CV	μ
UENF 1562	22,977	20,44 - 25,11	1,329	5,78	23,955	21,38 -29,27	1,722	7,18	1,043
UENF 1559	24,607	22,94 - 26,41	0,989	4,01	26,661	23,71 – 30,37	1,843	6,91	1,083
UENF 1495	22,973	19,46 – 25,97	1,785	7,76	22,796	18,53 – 30,32	2,902	12,73	0,991
UENF 1624	23,862	21,10 – 26,40	1,345	5,63	24,735	21,90 – 29,25	1,805	7,29	1,038
UENF 1785	24,786	22,23 – 28,11	1,609	6,56	26,020	22,62 – 31,55	2,660	10,22	1,050
UENF 1636	24,520	20,21 – 26,96	1,756	7,16	25,757	21,91 – 29,56	2,094	8,12	1,052
CNPH 3331	24,860	22,85 – 27,36	1,187	4,77	26,273	23,93 – 29,73	1,465	5,57	1,057

**C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562); *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559); *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495); *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624); *C. chinense* (UENF 1785); *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. parvifolium* (CNPH 3331), em vista equatorial (n=26)

Tabela 5. Medidas (μm) do diâmetro equatorial em vista polar e do lado do apocolpo dos grãos de pólen dos acessos estudados onde: μ = média; FV= faixa de variação; s= desvio padrão da amostra; CV= coeficiente de variação; IAP= índice de área polar.

VISTA POLAR									
Acessos*	Diâmetro Equatorial (VP)				Lado do Apocolpo (d)				IAP
	μ	FV	s	CV	μ	FV	s	CV	μ
UENF 1562	20,191	18,24 – 24,09	1,253	6,20	8,885	7,12 – 10,36	0,882	9,92	0,438
UENF 1559	23,456	19,53 – 26,63	1,866	7,95	13,078	10,22 – 16,52	2,011	15,37	0,555
UENF 1495	22,973	19,46 – 25,97	1,785	7,76	13,07	11,10 – 14,63	1,131	8,65	0,588
UENF 1624	22,358	20,12 – 25,17	1,445	6,46	13,114	11,62 – 14,96	1,085	8,27	0,587
UENF 1785	20,280	18,27 – 22,09	1,107	5,45	7,667	6,10 – 9,55	0,936	12,20	0,378
UENF 1636	21,898	20,53 – 23,19	0,659	3,00	10,951	8,65 – 13,24	1,072	9,78	0,499
CNPH 3331	22,91	20,60 – 25,89	1,185	5,17	13,196	11,64 – 14,89	0,850	6,44	0,576

**C. annum* var. *annuum* (UENF 1562); *C. annum* var. *glabriusculum* (UENF 1559); *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495); *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624); *C. chinense* (UENF 1785); *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. parvifolium* (CNPH 3331), em vista equatorial (n=26),

Tabela 6. Medidas (μm) da parede do grão de pólen (exina) e da sua camada externa (sexina) e interna (nexina) dos grãos de pólen dos acessos estudados, onde: μ = média; FV= faixa de variação; s= desvio padrão da amostra; CV= coeficiente de variação.

Acessos*	TEGUMENTO								
	Sexina				Nexina				Exina
	μ	FV	s	CV	μ	FV	s	CV	μ
UENF 1562	0,660	0,51 – 0,99	0,112	16,96	0,622	0,49 – 0,80	0,083	13,34	1,283
UENF 1559	0,603	0,48 – 0,70	0,066	10,94	0,583	0,49 – 0,70	0,062	10,63	1,186
UENF 1495	0,608	0,51 – 0,73	0,048	7,89	0,451	0,42 – 0,61	0,047	10,42	1,059
UENF 1624	0,637	0,53 – 0,68	0,048	7,53	0,458	0,42 – 0,53	0,031	6,76	1,095
UENF 1785	0,596	0,51 – 0,76	0,062	10,40	0,566	0,45 – 0,68	0,047	8,30	1,162
UENF 1636	0,624	0,51 – 0,76	0,056	8,97	0,609	0,51 – 0,68	0,055	9,03	1,234
CNPH 3331	0,603	0,53 – 0,66	0,024	3,98	0,458	0,42 – 0,49	0,026	5,67	1,061

**C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562); *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559); *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495); *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624); *C. chinense* (UENF 1785); *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. parvifolium* (CNPH 3331), em vista equatorial (n=26)

3.1.5.2. Análise Multivariada

3.1.5.2.1. Dissimilaridade

As distâncias Euclidianas Médias Padronizadas, que medem o grau de dissimilaridade (D^2) entre pares de acessos, encontram-se na Tabela 7. A maior distância foi verificada entre os acessos UENF 1562 - *Capsicum annuum* var *annuum* e CNPH 3331 - *Capsicum parvifolium* ($D = 2.103866$), e a menor, entre os acessos CNPH 3331 - *Capsicum parvifolium* e UENF 1624 - *Capsicum baccatum* var *pendulum* ($D = 0,752432$), o que significa que os acessos UENF 1562 e CNPH 3331 são geneticamente os mais divergentes, e CNPH 3331 e UENF 1624, os mais similares.

Segundo Pickersgill (1997), a variabilidade genética disponível dentro das espécies domesticadas de *Capsicum* tem sido pouco explorada e ainda não foi esgotada, evidenciando a importância de trabalhos de caracterização do germoplasma para uso em programas de melhoramento. Com base nos caracteres quantitativos obtidos da análise palinológica das espécies de *Capsicum* estudadas, foi possível identificar quão distantes os acessos são um do outro.

A indicação de progenitores divergentes para estratégias de inter cruzamento constitui-se em uma etapa adicional de grande utilidade para o melhoramento por hibridação, tendo em vista que quanto mais distantes, geneticamente, os progenitores, maior é a tendência de ocorrência de efeito heterótico na geração híbrida e, por conseguinte, maior a probabilidade de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999). No entanto, apesar da máxima divergência genética ter sido apresentada entre os acessos UENF 1562 e CNPH 3331, a recomendação desses só deverá ser feita, após uma análise criteriosa de seus desempenhos, como ressalta Cruz *et al.*, (2004).

Tabela 7. Medidas de dissimilaridade da distância Euclidiana Média Padronizada entre pares de acessos

	UENF 1562	UENF 1559	UENF 1624	UENF 1495	UENF 1785	UENF 1636	CNPH 3331
UENF 1562		1,655154	1,709436	1,696363	1,257897	1,142602	2,103866
UENF 1559			1,286172	1,707526	1,263671	,892035	1,123823
UENF 1624				1,020125	1,656112	1,016243	0,752432
UENF 1495					1,830099	1,437289	1,38881
UENF 1785						,995304	1,68202
UENF 1636							1.172668
CNPH 3331							

C. annuum var. *annuum*- UENF 1562, *C. annuum* var. *glabriusculum*- UENF 1559, *C. baccatum* var. *pendulum*- UENF 1624, *C. baccatum* var. *baccatum*- UENF 1495, *C. chinense*- UENF 1785, *C. frutescens*- UENF 1636 e *C. parvifolium*- CNPH 3331.

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista, por quantificarem e informarem sobre o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre quaisquer dois genótipos (Cruz e Carneiro, 2003). No entanto, como no processo de agrupamento é desejável ter informações relativas a cada par de progenitores, o número de estimativas de medidas de dissimilaridade é relativamente grande, o que torna impraticável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo simples exame visual daquelas estimativas. Para tal, faz-se uso dos métodos de agrupamento (Cruz *et al.*, 2004).

3.1.5.2.2. Métodos de Agrupamento

A partir da matriz de dissimilaridade realizou-se o agrupamento dos acessos através do método hierárquico de Ward e de otimização de Tocher. O método de agrupamento de Ward, como os demais métodos hierárquicos, leva à obtenção de um diagrama em árvore ou dendrograma. No eixo X foram representadas as porcentagens das distâncias entre os acessos e no eixo Y foram representados os sete acessos (Figura 4).

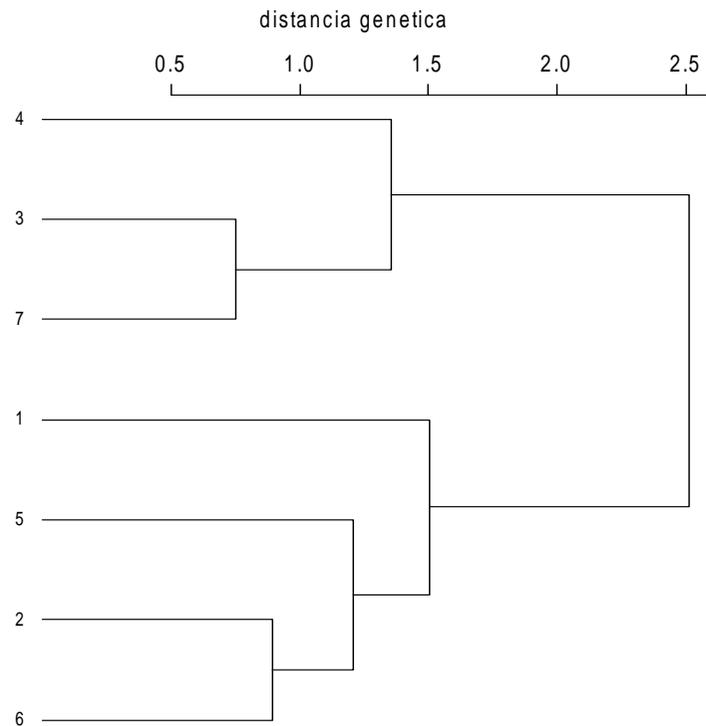


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre sete acessos de *Capsicum* obtido pelo método de Ward, com base em 13 características polínicas avaliadas, utilizando-se a distância Euclidiana Média Padronizada. *C. annuum* var. *annuum*- UENF 1562 (1), *C. annuum* var. *glabriusculum*- UENF 1559 (2), *C. baccatum* var. *pendulum*- UENF 1624 (3), *C. baccatum* var. *baccatum*- UENF 1495 (4), *C. chinense*- UENF 1785 (5), *C. frutescens*- UENF 1636 (6) e *C. parvifolium*- CNPH 3331 (7),

O primeiro grupo reuniu os acessos 3 (*C. baccatum* var. *pendunculum* - UENF 1624), 7 (*C. parvifolium* - CNPH 3331) e 4 (*C. baccatum* var. *baccatum* - UENF 1495), enquanto o segundo grupo reuniu os acessos 2 (*C. annuum* var. *glabriusculum* - UENF 1559), 6 (*C. frutescens* - UENF 1636), 1 (*C. annuum* var. *annuum* - UENF 1562) e 5 (*C. chinense* - UENF 1785).

No dendrograma gerado com base nas características polínicas de *Capsicum*, foi possível observar que no primeiro grupo, houve a união dos acessos de *C. baccatum* L. e o acesso correspondente à espécie *C. parvifolium*, enquanto no segundo grupo ficaram os acessos correspondentes às espécies *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L e *C.annuum* L.

Em relação aos caracteres morfológicos das espécies estudadas, o grupo I, foi formado pelas espécies *C. baccatum* e *C. parvifolium*. Essas espécies em todas as medidas realizadas apresentaram sexina sempre maior que a nexina, ao contrário do grupo II (*C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*), cuja exina e sexina possuíam tamanhos relativamente iguais.

Outra diferença observada entre esses dois grandes grupos formados foi referente às aberturas polínicas, uma vez que as espécies do grupo I são as que possuem maiores índices de área polar além de endoaberturas menores. Já no que diz respeito à largura do colpo, a vantagem ficou ao lado das espécies do grupo II, cujos valores superaram as do grupo I, o que como consequência, deixou o grupo I com índices de áreas polares elevados, como mencionado anteriormente.

Dentro do grupo I, a única espécie que apresentou relação P/E menor que 1 µm foi *C. baccatum* var. *baccatum*, além de possuir dentre as três espécies do grupo, a menor largura de endoabertura. Essas diferenças podem ter levado a referida espécie, a ficar mais distante das demais na hora do agrupamento.

Segundo Iwanami e Yoshio, (1988), dentro da caracterização morfológica, a análise dos descritores relacionados com o pólen serve para diferenciar e relacionar espécies, devido ao fato de que as características como forma, número de aberturas, posição e tipo de aberturas e ornamentação da exina dentre outras, são determinadas geneticamente.

Sierra *et al.*, (2006), ao realizar um estudo palinológico sobre os gêneros *Carica* e *Vasconcellea*, ambos da família Caricaceae, concluíram que os caracteres polínicos demonstraram grande aporte a taxonomia da família, uma

vez que a análise de agrupamento, fazendo uso de descritores palinológicos, permitiu diferenciar bem os grãos de pólen dos dois gêneros.

O padrão de agrupamento formado está de acordo com a divisão das espécies de *Capsicum* em complexos gênicos, presente na literatura. Segundo essa proposta, existe a formação de três grandes grupos entre as espécies de *Capsicum*, onde *C. annuum* L, *C. chinense* Jacq e *C. frutescens* L formam o complexo *annuum*. *C. baccatum* L e *C. pratermissum* formam o Complexo *baccatum*, e as espécies *C. eximium*, *C. cardenasii* e *C. pubescens* formam o complexo *pubescens*. Esses complexos foram formados de acordo com características morfológicas, citogenéticas e de cruzabilidade (McLeod *et al.*, 1983 Pickersgill, 1991; Zijlstra *et al.*, 1991; Choong, 1998; Tong e Bosland, 1999).

Os resultados obtidos aqui, são concordantes com aqueles obtidos por Costa *et al.*, (2008), que ao estimar a divergência genética entre 52 acessos de *Capsicum* spp. via marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos, obtiveram um agrupamento também concordante com a classificação de *Capsicum* spp em complexos gênicos, com dois grandes grupos, sendo um deles formado por acessos de *C. baccatum* L e outro grupo formado pelos acessos de *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L e *C. annuum* L.

Observações semelhantes foram feitas por trabalhos como o de Bianchetti (1996), que utilizando descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares, conseguiu agrupar os acessos de acordo com a classificação taxonômica e de Buso *et al.*, (2001).

O cruzamento interespecífico entre espécies de um mesmo complexo gênico é tido como possível e dentro do complexo *C. annuum*, muitos cruzamentos têm sido realizados com sucesso (Yoon *et al.*, 2006). De acordo com Smith e Heiser (1957), o cruzamento entre *C. annuum* e *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. chinense* foi possível em ambas as direções.

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.

Campos (2006), avaliando as relações genéticas entre acessos representantes das cinco espécies domesticadas de *Capsicum* com base na

cruzabilidade, obteve híbridos entre as espécies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, todas pertencentes ao mesmo complexo gênico e entre *C. annuum* e *C. baccatum* e também entre *C. frutescens* e *C. baccatum*, sendo estes últimos, no entanto, de baixo vigor. Mesmo assim, o cruzamento entre complexos, não tem sido muito relatado (Yoon *et al.*, 2006).

Segundo Harlan e De Wet (1971) e Choong (1998), a obtenção de híbridos entre *C. annuum* e *C. baccatum* apresenta uma relativa dificuldade, sendo que quando o híbrido é obtido, um grau de esterilidade é manifestado, o que foi confirmado com o trabalho de Yoon (2003), que obteve uma viabilidade polínica muito baixa (5%) para os híbridos interespecíficos. Segundo este autor, a esterilidade do híbrido ocorre 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.

Para Pickersgill (1991), essa classificação em complexos é útil, uma vez que o conhecimento sobre a capacidade de hibridação interespecífica é de grande utilidade nos programas de melhoramento. No entanto, as demais espécies de *Capsicum*, ainda não foram enquadradas dentro desses complexos.

Em trabalho realizado por Tong e Bosland (2003), através da observação do comportamento meiótico e capacidade de hibridação interespecífica das espécies silvestres *C. buforum* e *C. lanceolatum*, os autores afirmaram que esta última não se agrupa em nenhum dos referidos complexos e ressaltaram a necessidade de investigações adicionais sobre as relações entre as espécies. No presente trabalho, pode-se perceber que tomando por base os dados morfológicos, pode-se dividir as espécies domesticadas de acordo com os complexos gênicos e que a espécie silvestre *C. parvifolium* encontra-se mais próxima das espécies do complexo *C. baccatum* do que das espécies do complexo *C. annuum*.

Monteiro (2008) ao estudar a divergência genética entre espécies de pimentas do gênero *Capsicum* spp., fez uso de caracteres quantitativos e qualitativos. No emprego do método de agrupamento hierárquico UPGMA, a partir de descritores qualitativos, observou que somente a espécie *C. frutescens* não se distinguiu das demais, constituindo um grupo juntamente com subamostras de *C. chinense*. A proximidade entre essas espécies, mostrada no trabalho também está em concordância com a hipótese dos complexos gênicos, segundo a qual *C.*

annuum, *C. chinense* e *C. frutescens* são intimamente relacionadas, formando o complexo *C. annuum*. O trabalho desenvolvido por Campos (2006) corrobora esses dados, uma vez que o cruzamento entre *C. chinense* x *C. frutescens* apresentou resultados consistentes e promissores.

Além de concordantes com a proposta dos complexos gênicos, os resultados obtidos no presente estudo através do método de Ward, também estão de acordo com aqueles obtidos por Belletti *et al.*, (1998), que ao estudar o conteúdo de DNA de algumas espécies de *Capsicum* através da citometria de fluxo, conseguiram separar as espécies de *C. baccatum* e suas variedades, da espécie *C. annuum*, esta última possuindo um conteúdo de DNA menor.

Outro método de aglomeração utilizado no presente trabalho, foi o de otimização de Tocher, que tem por objetivo a formação de grupos em que os valores das distâncias intragrupos sejam inferiores a quaisquer distâncias intergrupos (Cruz e Carneiro, 2003).

Os agrupamentos obtidos pelos métodos de Ward e Tocher foram divergentes. Neitzkel (2008), estudando a divergência genética entre variedades crioulas de *C. baccatum* utilizando caracteres multicategóricos, observou que os métodos hierárquicos e de otimização utilizados, concordaram apenas na formação de um grupo, sendo os demais grupos formados diferentes. Além disso, a autora constatou grande diferença em relação ao número de grupos formados, uma vez que o método hierárquico UPGMA formou sete grupos e o de Tocher, estabeleceu onze grupos.

Outro trabalho sobre divergência no gênero *Capsicum*, cujo resultado do agrupamento hierárquico não foi semelhante ao de otimização, foi o desenvolvido por Souza (2008), ao estudar acessos de *C. chinense* Jacq. pela técnica de RAPD.

No presente estudo, pelo método de Tocher, foi possível agrupar os sete acessos em quatro grupos distintos, cujas distâncias intra e intergrupo encontram-se na Tabela 8. O primeiro grupo reuniu os acessos UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*), CNPH 3331 (*C. parvifolium*), UENF 1636 (*C. frutescens*) e UENF 1559 (*C. annuum* var. *glabriusculum*), enquanto o segundo grupo, terceiro e quarto grupos foram compostos com apenas um acesso cada, sendo eles os acessos UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*), UENF 1785 (*C. chinense*) e UENF 1562 (*C. annuum* var. *annuum*), respectivamente (Tabela 9).

Tabela 8. Distâncias médias intra e intergrupos de *Capsicum* spp, com base no método de Tocher.

GRUPOS	1	2	3	4
1		1,3884	1,3993	1,6528
2			1,8301	1,6964
3				1,2579
4				

Tabela 9. Agrupamento pelo método de Tocher dos 7 acessos de *Capsicum*: *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), *C. parvifolium* (CNPB 3331), *C. frutescens* (UENF 1636), *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559), *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), *C. chinense* (UENF 1785) e *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), em relação a 13 características morfológicas.

GRUPOS	ACESSOS
1	UENF 1624, CNPB 3331, UENF 1636, UENF 1559
2	UENF 1495
3	UENF 1785
4	UENF 1562

Sudré *et al.*, (2006) utilizando variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão, observaram que pelo agrupamento de Tocher, ficaram no mesmo grupo acessos de *C. frutescens*, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum*. Em relação às mesmas espécies, os resultados obtidos por esses autores, condizem em parte com nossos dados, uma vez que no presente trabalho, o acesso representante da espécie *C. baccatum* var. *baccatum* (grupo 2), ficou isolado dos acessos representantes da espécie *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. frutescens*, que juntamente com os acessos das espécies *C. annuum* var. *glabriusculum* e *C. parvifolium* formaram o grupo I.

Tanto os nossos resultados pelo método de Tocher, quanto os obtidos por Sudré *et al.*, (2006), contradizem a proposta de divisão dos complexos gênicos de *Capsicum* existente na literatura, que coloca as espécies de *C. frutescens* e *C. baccatum* em complexos diferentes (Pickersgill, 1991). No entanto, o cruzamento entre *C. frutescens* e *C. baccatum* var. *pendulum* é possível em ambas as

direções (Smith e Heiser, 1957), apesar da baixa fertilidade dos híbridos resultantes que afeta o número de frutos provenientes dessa combinação (Campos, 2006).

Costa *et al.*, (2006), ao estudarem a diversidade genética entre acessos de *Capsicum* da coleção da germoplasma da UENF, usando marcadores RAPD, obtiveram um grupo onde os acessos de *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum* permaneceram juntos. No entanto, segundo os autores, esta separação pode não ter ocorrido como o esperado em função do pequeno número de bandas polimórficas observadas dentro da espécie ou em função da técnica molecular utilizada.

Os grupos 3 e 4 foram formados apenas pelos acessos representantes da espécie *C. chinense* e *C. annuum* var. *annuum*. Sudré *et al.*, (2006) também observaram a formação de um grupo isolado formado apenas por acessos da espécie *C. annuum* var. *annuum*, reunindo 94% dos acessos avaliados dessa espécie através do método de otimização de Tocher e também pelo método hierárquico do Vizinho Mais Próximo e cinco grupos formados exclusivamente por acessos de *C. chinense*, que diferiam morfológicamente, pelo método do Vizinho Mais Próximo.

3.1.5.2.3. Análise dos Componentes Principais (ACP)

A dispersão gráfica dos escores (valores atribuídos aos acessos, com base em todos os caracteres morfológicos avaliados) e grupos de similaridade com base nos dois primeiros componentes principais, pode ser observada na figura 5.

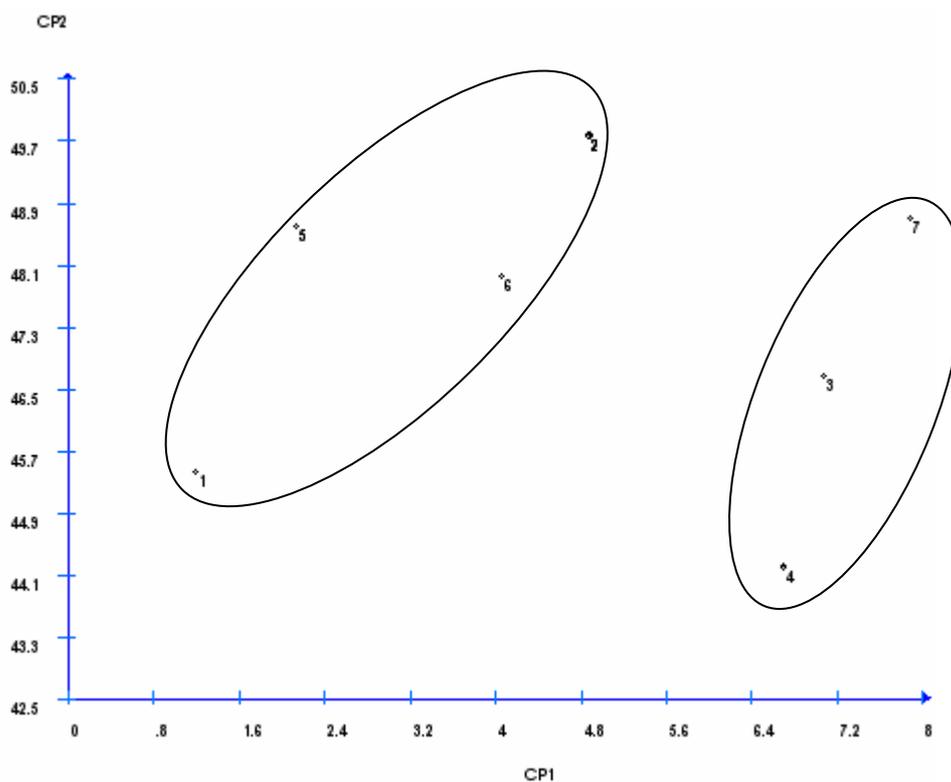


Figura 5. Dispersão gráfica dos acessos com base nos dois primeiros componentes principais, mostrando as espécies *C. annuum* var. *annuum*- UENF 1562 (1), *C. annuum* var. *glabriusculum*- UENF 1559 (2), *C. baccatum* var. *pendulum*- UENF 1624 (3), *C. baccatum* var. *baccatum*- UENF 1495 (4), *C. chinense*- UENF 1785 (5), *C. frutescens*- UENF 1636 (6) e *C. parvifolium*- CNPH 3331 (7).

Conforme o gráfico (Figura 5), pode-se perceber que em relação aos treze caracteres analisados, o acesso 7 (*Capsicum parvifolium*- CNPH 3331) é o mais distante em relação ao acesso 1 (*Capsicum annuum* var. *annuum*- UENF 1562). A distância Euclidiana média padronizada entre esses acessos foi estimada em 2,103. Já os acessos 7 (*Capsicum parvifolium*- CNPH 3331) e 3 (*C. baccatum* var. *pendulum*- UENF 1624) foram os menos divergentes, cuja distância Euclidiana média foi estimada em 0,752.

Ao iniciar um programa de melhoramento genético com determinada espécie é recomendável que, após a definição dos objetivos, seja feita uma avaliação do germoplasma, levando em conta o maior número possível de caracteres quantitativos. Em seguida, faz-se uma análise multivariada para a escolha de progenitores divergentes geneticamente, de modo a maximizar a variabilidade sobre a qual será feita a seleção (Miranda *et al.*, 1988).

Pela ordenação das espécies através da análise dos componentes principais, observa-se o mesmo padrão de agrupamento obtido pelo método de Ward, com as espécies do complexo *C. annuum* (*C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) separadas das espécies pertencentes ao complexo *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*), e a espécie *C. parvifolium* (Figura 5).

A importância de cada componente principal é dada pela porcentagem de variância total que ele absorve (Dias, 1994). Segundo Cruz (1990), os primeiros componentes principais em estudos de divergência genética têm sido utilizados quando esses envolvem pelo menos 70% da variação total. No entanto, Cruz *et al.*, (2004), consideram que pelo menos 80% da variação total sejam retidos pelos dois primeiros componentes principais. Quando esse limite é atingido, a variabilidade entre os indivíduos avaliados pode ser explicada satisfatoriamente apenas por esses primeiros componentes, simplificando a interpretação. Neste caso, a representação gráfica dos resultados é indicada (Cruz, 1990).

Através da análise de componentes principais, verificou-se que as duas primeiras componentes, resultantes da combinação linear dos 13 caracteres morfológicos avaliados explicaram mais de 80% (80,33 %) da variação total (Tabela 10). Esse resultado indica que a metodologia foi satisfatória no estudo da divergência dos acessos de *Capsicum*, por meio da avaliação da dispersão gráfica dos escores em relação aos 1º e 2º componentes principais.

Dias *et al.* (1997) relatam que através da dispersão gráfica, obtida com componentes principais, recupera-se a informação em nível de indivíduo que é perdida por se considerar apenas a informação de grupos na análise de agrupamento. O procedimento dos componentes principais e, ou da distância Euclidiana, têm sido largamente empregados na avaliação de acessos em bancos de germoplasma, pelo fato de, nesta situação, ser difícil a quantificação de influências não-genéticas, que atuam simultaneamente sobre várias características (Cruz, 1990; Amaral Júnior, 1994).

Tabela 10. Estimativas dos autovalores associados aos componentes principais, importância relativa (raiz %) e acumulada referentes a 13 caracteres morfológicos avaliados em sete acessos de *Capsicum*.

Componentes	Raiz	Raiz (%)	% Acumulada
1	6,4947399	49,9595374	49,9595374
2	3,9489412	30,3764704	80,3360078
3	1,2563151	9,6639622	89,99997
4	0,8972736	6,9021046	96,9020746
5	0,2582268	1,9863599	98,8884345
6	0,1445035	1,1115655	100,0
7	0,0	0,0	100,0
8	0,0	0,0	100,0
9	0,0	0,0	100,0
10	0,0	0,0	100,0
11	0,0	0,0	100,0
12	0,0	0,0	100,0
13	0,0	0,0	100,0

Bento *et al.*, (2007) realizaram um estudo de quantificação da divergência fenotípica entre 29 acessos de *Capsicum* spp., com base na caracterização morfológica e agrônômica, utilizando-se de 37 descritores sugeridos pelo IPGRI e técnicas de análise multivariada, entre elas a análise de componentes principais. Como resultado, os autores observaram que foram necessários os três primeiros componentes principais para explicar cerca de 80% da variância total, adequando-se neste caso a uma representação gráfica tridimensional.

Miranda *et al.*, (1988) realizaram um estudo com o objetivo de prever o comportamento dos híbridos F₁ de seis progenitores de pimentão (*C. annuum* L.), através da divergência genética dos seis cultivares. Como passo inicial, os autores realizaram a análise dos componentes principais, obtendo as combinações lineares das médias de 11 variáveis (caracteres agrônômicos) originais padronizadas não correlacionadas e com base nos escores dos primeiros componentes principais obtiveram as correlações entre a divergência genética de medida pela distância Euclidiana. Nos resultados referentes à análise dos componentes principais, os autores observaram que os dois componentes

principais envolveram cerca de 89% da variação total, demonstrando ser satisfatória suas utilizações nas análises posteriores.

Segundo Cruz e Regazzi (2001) é possível avaliar a importância de cada característica estudada sobre a variação total, possibilitando o descarte das variáveis redundantes (menos discriminantes), por estarem correlacionadas a outras variáveis, pela sua invariância ou por serem uma combinação linear de outras características.

Em muitos casos, os pesquisadores geram um considerável acréscimo de trabalho ao avaliarem um grande número de características. Como consequência tem um aumento no trabalho de caracterização sem melhoria na precisão, tornando a análise mais trabalhosa e dificultando a interpretação dos dados. Nessas situações, pode-se minimizar o problema fazendo-se uso da técnica de análise de componentes principais, eliminando aquelas variáveis respostas que menos contribuírem para o estudo (Liberato *et al.*, 1999).

Pereira (1989) citado por Amaral Júnior e Thiébaud, (1999), também evidenciou a importância da avaliação da eficiência das características na discriminação genotípica em bancos de germoplasma, onde o número de acessos é elevado e várias características, ou descritores, são utilizados. O autor afirmou que, em diversos casos, diversas características são tomadas sem a existência de estudo prévio da sua contribuição para a variabilidade. Isso pode proporcionar aumento de esforços na condução de ensaios, sem que haja ganhos compensatórios nas informações extraídas e também maior dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente quando existem características redundantes, ou fortemente influenciadas pelo ambiente.

Cruz e Carneiro (2003) enfatizam que na análise de componentes principais a importância relativa dos componentes principais decresce do primeiro para o último e que os caracteres de maior contribuição para variação acumulada são aqueles que exibem maiores coeficientes de ponderação nos componentes de maior autovalor e os de menor contribuição são aqueles que exibem maiores coeficientes de ponderação nos componentes de menor autovalor.

Nos acessos de *Capsicum* estudados, a variável que mais contribuiu para variação acumulada foi a largura do poro e a variável de menor contribuição para variação acumulada foi o eixo polar em vista equatorial. A variação acumulada nos dois primeiros componentes, que na análise utilizando todos os descritores

era de 80,34%, sem utilização do descritor eixo polar em vista equatorial caiu para 79%, confirmando dessa forma, a baixa contribuição desse descritor para a variação acumulada.

Schuelter *et al.*, (1998) estudando a diversidade genética de uma população da pimenta silvestre *C. flexuosum*, avaliaram a importância de seis características morfológicas, com o intuito de verificar aquelas que menos contribuem para a discriminação dos genótipos, possibilitando descartá-las em estudos futuros. Os autores constataram que os caracteres que menos contribuíram para a diversidade foram altura e diâmetro da planta na ocasião da antese da primeira flor, concluindo que esses caracteres podem ser descartados.

Teixeira (1996) concluiu por meio da técnica de componentes principais, que as características comprimento do fruto, diâmetro do fruto, número de sementes por fruto, altura de planta e diâmetro de copa foram discriminantes em estudos com *Capsicum* spp.

3.1.6 CONCLUSÃO

Os caracteres morfopolínicos das espécies de *Capsicum* estão em concordância com os de outros gêneros da família Solanaceae, ou seja, grãos com aberturas compostas, tricolporados e trizonocolporados.

Pelo método de Ward e ACP foi possível agrupar os acessos estudados de acordo com classificação dos complexos gênicos.

A variável largura do poro foi discriminante para o estudo morfopolínico de *Capsicum* spp, enquanto a variável Eixo Polar em Vista Equatorial não foi discriminante nas condições do trabalho realizado.

3.1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL JÚNIOR, A. T. DO; THIÉBAUT, J. T. DE L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais*. Campos dos

- Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, CCTA, 55p.
- AMARAL JÚNIOR, A. T. (1994) Análise multivariada e isozimática da divergência genética entre acessos de moranga (*Curcubita máxima* Duchesne). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG. 95p.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) (2003). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141:399-436.
- BARROSO, L. P.; ARTES, R. (2003) Análise Multivariada, 48ª Reunião da RBRAS e 10ª SEAGRO, UFV, Departamento de Ciências Exatas, Lavras, MG, 151p.
- BARTH, O. M.; DUARTE, S. G. (2008) Morfologia polínica de espécies arbóreas de Solanaceae do Estado de Santa Catarina, Brasil. Hoehnea 35(3): 379-386
- BARTH, O. M.; MELHEM, T.S. (1988) Glossário Ilustrado de Palinologia. Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas.
- BARTH, O.M. (1964). Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 63: 133-162.
- BENTO, C. S. dos; SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; PEREIRA, M. G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, v.8, n.2, p. 149-156.
- BIANCHETTI, L.B. (1996) *Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de Capsicum (Solanaceae) ocorrentes no Brasil*. Tese (Mestrado em Botânica) – Brasília – DF, Universidade de Brasília - UNB, 174p.
- BREWBAKER, J. L. (1967) The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Amer. J. Bot.* 54(9): 1069-1083.
- BUSO, G. C. S. ; LOURENÇO, R. T. ; BIANCHETTI, L. B. ; LINS, T. C. L. ; POZZOBON, M. ; AMARAL, Z. P. S. ; FERREIRA, M. E. (2001) Espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica Brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares. Brasília: Embrapa

- Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 7).
- CABRERA M. M.; G. A CUADRADO (1998) Solanaceae, subfamilia Solanoideae Tribus *Datureae*, *Jaboroseae* y *Lycieae* en PIRE S.M., ANZÓTEGUI L.M.y G.A. CUADRADO (eds.) *Flora polínica del Nordeste argentino* Vol 2 (EUDENE UNNE).
- CAMPO, M. (1966) Pollen et phylogénie – Les brevixes. *Pollen et Spores*, 8(1):57-73.
- CAMPOS, K. P. (2006) Obtenção, caracterização morfológica e reprodutiva de híbridos interespecíficos entre espécies domesticadas de *Capsicum*. Dissertação de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas, Campos dos Goytacazes, UENF, 158p.
- CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. (2003) Catálogo de germoplasmas de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças, Brasília: Embrapa, 2003. 49 p. (Documentos, 49).
- CASALI, V. W. D. (1970). Cruzamento interespecífico no gênero *Capsicum*. Viçosa, MG: UFV, 58p. Tese de Mestrado.
- CHASE, M. W.; SOLTIS, D. E. OLMSTEAD, R. G., MORGAN, D.; LES, H.; MISHLER, B. D.; DUVALL, M. R.; PRINCE, R. A.; HILLS, H. G.; QIU, Y. L.; KRON, K. A.; RETTIG, J. H.; CONTI, E; PALMER, J. D.; MAHART, J. R.; SYTSMA, K. J.; MICHAELS, H. J.; KRESS, W. J.; KAROL, K. G.; CLARK, W. D.; HÉDREN, M.; GAUT, B. S.; JASEN, R. K.; KIM, K. J.; WIMPEE, C. F.; SMITH, J. F.; FURNIER, G. R.; STRAUS, S. H.; XIANG, Q. Y.; PLUNKETT, P. S.; SOLTIS, S. M.; SWENSEM, S. M.; WILLIAMS, S. E.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J.; EGUIARTE, L. E.; GOLEMBERG, E.; LEARN JR., G. H.; GRAHAM, S. W.; BARRET, S. C. H.; DAYANANDAN, S.; ALBERT, V. A. (1993) Phylogenetics of seed plant, and analysis of nucleotide sequence from the platid gene *rbcl*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80: 528-580.
- CHOONG, C. Y. (1998) DNA polymorphisms in the study of relationships and evolution in *Capsicum*. PhD Thesis, University of Reading.
- CRUZ, C. D. (2006) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV. 480p.

- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ed. rev. Viçosa: UFV, 390p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV. 585p.
- CRUZ, C. D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas (1990) Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 188p.
- COSTA, F. R., PEREIRA, T. N. S., SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R. (2008) Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. Ciência Rural, Santa Maria, Online.
- COSTA, F. R., PEREIRA, T. N. S., VITÓRIA, A. P., CAMPOS, K. P., RODRIGUES, R., SILVA, D. H., PEREIRA M. G. (2006) Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology 6:18-23.
- D'ARCY, W. G. (1991) The Solanaceae Since 1976 with a Review of its Biography. Hawkes, J.G., III, Taxonomy Chemistry and Evolution. Royal Bot. Gov. Kew, pp: 75-137.
- DAJOZ, I.; BOTTRAUD, I. T.; GOUYON, P. H. (1991) Evolution of pollen morphology. SCIENCE, v. 253, p. 66-68.
- DIAS, L.A. dos S.; KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, G.C. (1997) Divergência fenética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.). Agrotrópica, v.9, p.29-40.
- DIAS, L. A. S. (1994) Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.). 94p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ERDTMAN, G. (1960) The acetolysis method. A revised description. Svensk Botanisk Tidskrift 54: 561-564
- ERDTMAN, G. (1952) Pollen morphology and plant taxonomy Angiosperms. Almqvist e Wiksell, Stockholm.
- ERDTMAN (1945) Pollen morphology and plant taxonomy. III. *Morina* L. With an addition on pollenmorphological terminology. Svensk bo. Tidskr. 39.

- FAEGRI, K., IVERSEN, J. (1964) Textbook of pollen analysis. 2nd ed. Blackwell, Oxford.
- FAEGRI, K.; DEUSE, P. (1960) Size variation in pollen grains with different treatment. *Pollen et Spores*, 2(2) 293-298.
- FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. de; SANTOS, M. X. S. dos; RAMALHO, M. A. P. (1995) Métodos de avaliação da divergência genética em milho e suas relações com os cruzamentos dialélicos. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 30, n.9, p. 1189-1194.
- FRANKLIM, C. P. R. B.; ESTEVES, V. G. (2008) Palinologia de espécies de *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.) ocorrentes nas restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta bot. bras.* 22(3): 782-793.
- FRANKLIM, C. P. R. B.; ESTEVES, V. G. (2002) Morfologia polínica de espécies de *Brunfelsia* L. (Solanaceae) ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.2, p.137-145.
- HARLAN, J. R.; DE WET J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20:509-517.
- HE, G., PRAKASH, C.S., JARRET, R.L. (1995) Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Genome*, 38: 938-945.
- HUSSEIN, M. A. W.; GAMAL, M. A. (2007) Palynological and cytological characters of three species of genus *Solanum* (Family: Solanaceae) from Saudi Arabia. *Journal of Biological Sciences* 7 (4): 626-631.
- IVERSEN, J.; TROELS-SMITH, J. (1950) Pollenmorfologiske definitioes of types. *Danmarks Geol. Unders* 4, rk. 3,8.
- IWANAMI, Y.S.; YOSHIO, Y. (1988). *Pollen: Illustrations and scanning of electronmicrographs*. Tokio: Kodans e Springer-Verlag.
- JUDD, W. S., (1999) *Plant systematic: a phylogenetic approach*. Massachusetts, Sinauer Associates.
- 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>
- KUMAR, A. O.; PANDA R. C.; RAO, K. G. R.; RAMANUJAM, C. G. K. (1986) Pollen morphological studies in *Capsicum*: 1. Species and varieties.

- Geophytology 16. (2): 166-175. Illus. En Icones, Palynology. Geog=0 Systematics: ANGIOSPERMAE (SOLANACEAE: *CAPSICUM*).
- LIBERATO, J.R.; VALE, F.X.R.; CRUZ, C.D. (1999) Técnicas estatísticas de análise multivariada e a necessidade de o fitopatologista conhecê-las. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, p.5-8.
- MC LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H. (1986) Genetics of GOT in *Capsicum*. *J. Hered.*, v. 77, p. 469-470.
- MC LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H., RAYLE, R.E. (1983) An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Evolution*, 37 (3):562-574.
- MELHEM, T. S.; MATOS, M. E. R. (1972) Variabilidade de forma dos grãos de pólen de *Eriope crassipes* Benth. *Labiatae*. *Hoehnea* 2: 1-10.
- MELHEM, T. S. (1978) Palinologia – suas aplicações e perspectivas no Brasil. Coleção Museu Paulista, série Ensaios.
- MIRANDA, J. E. C. de; CRUZ, D. C.; COSTA, C. P. da (1988) Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) pela divergência genética dos progenitores. *Ver. Brasil. Genet.* 11, 4, 929-937.
- MONTEIRO, E. R. (2008) Identificação botânica e divergência genética em pimentas do gênero *Capsicum* spp. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí. 59 p.
- MOREIRA, G. R. ; PINTO, C. M. F. ; CALIMAN, F. R. B. ; SILVA, D. J. H. ; ROCHA, P. R. R. (2005) Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta do banco de germoplasma da EPAMIG/CTZM. In: 45º Congresso Brasileiro de Olericultura, 2005, Fortaleza. *Horticultura Brasileira - Resumos do 45º Congresso Brasileiro de Olericultura*.
- MULLER, J. (1970) Palynological evidence on early differentiation of angiosperms. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 45:417-450.
- NEITZKE, R. S.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G.; CASTRO, C. M. (2008) Divergência genética entre variedades locais de *Capsicum baccatum* utilizando caracteres multicategóricos. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 20, n.3, p.249-255.
- PASSARELLI, L. M. (1999) Morphology, reserves and pollen viability of some *Solanum* Sect. *Cyphomandropsis* species. *Grana* 38: 284-288.

- PERSSON, V.; KNAPP, S.; BLACKMORE, S., (1994) Pollen morphology and systematics of tribe Juanulloae A.T. Hunziker (Solanaceae). *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 83:1 30.
- PERVEEN, A.; QAISER, M. (2007) Pollen morphology of family Solanaceae from Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 39(7): 2243-2256.
- PICKERSGILL, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp., *Euphytica*, Volume 96, Issue 1, Jan 1997, Pages 129-133.
- PICKERSGILL, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In T. Tsuchiya and P.K. Gupta, *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*, part B, 139-160. Elsevier: Amsterdam.
- PUNT, W., BLACKMORE, S., NILSSON, S.; LE THOMAS, A. (2007) Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology* 143. 1-81
- PUNT, W.; MONNA-BRANDS, M. (1977) Solanaceae. *Review of Palaeobotany and palynology*, 23: NEPF 1-30. *The Northwest European Pollen Flora*, 8.
- R (2004) Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Áustria. Disponível em <http://www.R-project.org>.
- RAGHUVANSHI, R. K. (1977) Palynological studies in *Capsicum* L. *J. Palynol.* 12. (1 - 2): 81 – 86. *Illus. Palynology. Geog=1 - 7 Systematics: ANGIOSPERMAE (SOLANACEAE: CAPSICUM)*
- RINALDI, S.A, CUADRADO, G.A. (1998) Estudio Palinológico de Seis Secciones del Genero *Solanum* L. en el Nordeste Argentino. Vol 2 (EUDENE UNNE) <<http://www1.unne.edu.ar/cyt/biologia/b-056.pdf>> Acesso em 10 maio.2009.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L. (1973) Contribuição à palinologia dos cerrados. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro.
- SANTOS, F.A.R dos.(1998) Palinologia de *Heteranthia decipiens* Ness e Mart (Scrophulariaceae ou Solanaceae?). *Polibotánica*, 8:21-27.
- SCHUELTER, A. R.; CASALI, V. W. D.; CRUZ, C. D.; COELHO, A. D. F.; AMARAL JÚNIOR, A. T. do (1998) Diversidade genética em uma população de pimenta silvestre (*Capsicum flexuosum* Sendt). *Revista Ceres*, 45(262):531-539.

- SIERRA, C. L. S.; CAETANO, C. M.; LAGOS, T. C. L.; SERVIA, J. L. C. (2006) Palinología de *Carica* y *Vasconcellea* (Caricaceae). Acta Agronómica ISSN: 0120-2812 ed: Editorial Feriva v.55 fasc.3 p.
- SILVA, N. S.; CARVALHO, A. M. V.; SANTOS, F. A. R. (2003) Morfologia polínica de doze espécies de *Cestrum* L. (Solanaceae) da mata higrófila na Bahia, Brasil. Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá, v. 25, no. 2, p. 439-443.
- 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.
- SOLER J. B.; NOLLA J. M. R. (2002) Introducción. In: Valero-Santiago AL, Cadahia-García A (Eds): *Polinosis, Polen y Alergia*, 7-16. MRA ediciones, España.
- SOUZA, S. A. M. (2008) Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.
- SUDRÉ C. P; CRUZ C. D; RODRIGUES R; RIVA E. M; AMARAL JÚNIOR A. T; SILVA DJH; PEREIRA T. N. S. (2006) Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, 24: 88-93.
- TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F.; GELINSKI, V. V. (2001) Catálogo polínico do parque estadual de Vila Velha, Paraná – 2ª parte. Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences, 7 (1): 7-18.
- TEIXEIRA, R. (1996) Diversidade em *Capsicum*: análise molecular, morfoagronômica e química. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, p.81.
- TEMPONI, L. G. (2006) Sistemática de *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. Tese de Doutorado. 143p.
- TONG, N.; BOSLAND, P. W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109.
- 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.

- VIEIRA, S. (1981) Introdução à Bioestatística. Campus, Rio de Janeiro.
- ZIJLSTRA, S., PURIMAHUA, C., LINDHOUT, P. (1991) Pollen tube growth in interespecific crosses between *Capsicum* species. *HortScience*, 26 (5):585-586.
- WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. (1975) The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62:664-723.
- WIEBKE, M. L.; WIEBKE, G. (1974) Estudo dos grãos de pólen de Solanaceae – 1. *Estudos Leopoldinenses* 29:71-89.
- YOON, J. B., YANG, D. C., WAHHNG, J. D., PARK, H. G. (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *C. annuum* L and *C. baccatum* L for introgression of Anthracnose resistance. *Breeding Science* 56: 31-38.
- YOON, J. B. (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.

3.2. ESTIMATIVA DA VIABILIDADE POLÍNICA DE *Capsicum* L. BASEADA EM DIFERENTES TESTES COLORIMÉTRICOS

3.2.1. RESUMO

O presente estudo objetivou estudar a viabilidade dos grãos de pólen em sete acessos representativos do gênero *Capsicum*. Para a avaliação da viabilidade dos acessos de *Capsicum*, botões florais na antese foram coletados e fixados em solução de Carnoy e armazenados em freezer (-10 °C) até o momento do preparo das lâminas. Testes de viabilidade polínica foram realizados, utilizando quatro diferentes corantes: carmim acético, lugol, azul de tripano e Alexander. Para comparar as médias entre as plantas dentro de cada corante e analisar as diferenças entre os corantes dentro de cada população, a análise dos dados da viabilidade polínica foi realizada através do intervalo de confiança, empregando o método de amostragem simples ao acaso. Já para indicar qual o melhor corante na estimativa da viabilidade polínica, os resultados foram submetidos a uma análise de variância e comparados pelo teste de média de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Independente do corante utilizado, em nenhum dos acessos estudados foi observado a prevalência de grãos de pólen estéreis/inviáveis; ao contrário, verificaram-se altas porcentagens de grãos de pólen viáveis. Essa viabilidade polínica alta dos acessos parece refletir uma meiose regular e um índice meiótico também regular. Analisando a influência de cada corante na estimativa da viabilidade das espécies, observou-se que não houve diferença significativa entre os mesmos, no entanto a média da viabilidade estimada pelo

corante Alexander foi maior do que as análises realizadas com os demais corantes.

3.2.2. ABSTRACT

The present study aimed at to study the viability of the pollen grains in seven accessions representatives of the gender *Capsicum*. For the evaluation of the viability of the accessions of *Capsicum*, floral buttons in the antese were collected and fastened in solution of Carnoy and stored in freezer (-10 °C) until the moment of the preparation of the sheets. Tests of pollinic viability were accomplished, using four different coloring: acetic carmim, lugol, trypan Blue and Alexander. To compare the averages between the plants inside each coloring and to analyse the differences between the colorings inside each population, the analysis of the data of the pollinic viability was accomplished through the trust interval for proportion with aid of the program GENES (Cruz, 2006), using the method of simple sampling at random. Already to indicate the best color in the estimate of the pollinic viability, the results were submitted to a variance analysis and compared by the test of average of Tukey at 5% of probability. Independent of the used color, in none of the studied accesses it was observed the prevalence of grains of pollen sterile/impracticable; on the contrary, high percentages of viable pollen grains were verified. That high pollinic viability of the accessions seems to reflect a regular meiosis and an index meiotic also regulate. Analyzing the influence of each coloring one in the estimate of the viability of the species is observed that there was not significant difference among the same ones, however the average of the dear viability for the color Alexander was larger than to the analyses accomplished with the other colors.

3.2.3. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético é uma das alternativas para solucionar alguns problemas, principalmente aqueles referentes a doenças, através da utilização de espécies silvestres como reservatórios de genes para hibridação interespecífica (Hajjar e Hodgkin, 2007). O estudo da viabilidade polínica se constitui em um dos fatores de suma importância no melhoramento de plantas, pois reflete a potencialidade do gameta masculino na eficiência da fecundação e posterior fertilização (Biondo e Battistin, 2001).

Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, e em última análise, de variabilidade genética (Souza, 2002).

A porcentagem de germinação e porcentagem de viabilidade do pólen está em completa concordância (Bolat e Pirlak, 1999). Scorza e Sherman (1995) consideram que um bom pólen deve apresentar 50 a 80% de grãos germinados com tubos bem desenvolvidos. À medida que o pólen envelhece, a porcentagem de germinação e o comprimento dos tubos polínicos decrescem. A variação na porcentagem de pólen viável também pode ocorrer, devido a condições ambientais adversas como: baixas temperaturas do ar, alta umidade ou excessivas chuvas na floração, baixa intensidade luminosa etc (Kuang e Tu, 1935).

A viabilidade do pólen pode ser determinada através de um grande número de técnicas (Dafni 1992; Kearns e Inouye 1993) e uma das maneiras de medir essa viabilidade é pela coloração citoquímica (Biondo e Battistin, 2001). No entanto, a comparação entre diferentes métodos para estimar a viabilidade polínica, pode ser de suma importância, pois a utilização de uma única técnica pode superestimar ou subestimar os resultados, assim, uma avaliação comparativa é um procedimento recomendado na tentativa de se obter resultados mais confiáveis na determinação da viabilidade do pólen de inúmeras espécies (Rodríguez-Riano e Dafni, 2000).

Segundo Manara (1974), é grande a importância da fertilidade do pólen em trabalhos de hibridação artificial. A esterilidade do pólen ou mesmo a baixa fertilidade dos indivíduos utilizados como progenitores masculinos são fatores

extremamente negativos quando se tem em mente programas de hibridação artificial ou autofecundações.

Devido à grande importância de se estimar a viabilidade polínica das espécies e do estudo comparativo de técnicas usadas para estimar essa viabilidade, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade polínica de acessos de *Capsicum* baseado em quatro diferentes testes colorimétricos.

3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.4.1. Material genético e condições de cultivo

No presente estudo, foram utilizadas amostras de grãos de pólen de sete acessos de *Capsicum*, sendo seis acessos pertencentes à coleção de germoplasma da UENF e representantes das espécies domesticadas e semidomesticadas *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), *C. chinense* (UENF 1785), *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624) e *C. frutescens* (UENF 1636), *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559) e *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) e um acesso doado pela EMBRAPA representando a espécie silvestre *C. parvifolium* (CNPq 3331).

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

3.2.4.2. Métodos

Para a avaliação da viabilidade dos acessos de *Capsicum*, botões florais na antese foram coletados pela manhã, fixados em solução de Carnoy e armazenados em freezer (-10 °C) até o momento do preparo das lâminas.

Os testes de viabilidade polínica foram realizados, utilizando quatro diferentes corantes: carmim acético (Kearns e Inouye 1993) que indica a

viabilidade do pólen pela coloração vermelha; lugol (Dafni 1992) que indica a viabilidade pela coloração marrom; azul de tripano que determina a viabilidade pela não presença da cor azul, e Alexander (Alexander, 1969), onde os grãos de pólen viáveis são detectados pela presença da cor vermelha ou púrpura no protoplasto, enquanto que os grãos de pólen inviáveis apresentam coloração verde.

Durante o preparo das lâminas foi empregada a mesma metodologia: as anteras foram cortadas transversalmente com o auxílio de um bisturi e em seguida, foram maceradas com um escalpelo, visando à liberação dos grãos de pólen sobre 10 μ L de cada um dos corantes supracitados, independentemente. Após a retirada dos debris, o material foi coberto com uma lamínula e observado ao microscópio.

A fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados, foi utilizado o método de varredura e para cada acesso em cada corante utilizado, foram feitas oito lâminas sendo contados 250 grãos de pólen/lâmina, perfazendo um total de 2000 grãos de pólen.

Para comparar as médias entre as plantas dentro de cada corante e analisar as diferenças entre os corantes dentro de cada população, a análise dos dados da viabilidade polínica foi realizada através do intervalo de confiança para proporção com auxílio do programa GENES (Cruz, 2006), empregando o método de amostragem simples ao acaso. Já para indicar qual o melhor corante na estimativa da viabilidade polínica, os resultados foram submetidos a uma análise de variância e comparados pelo teste de médias de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

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

3.2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente do corante utilizado, em nenhum dos acessos estudados foi observado a prevalência de grãos de pólen estéreis/inviáveis; ao contrário,

verificaram-se altas porcentagens de grãos de pólen viáveis. A média geral da viabilidade dos acessos, de acordo com cada corante está na Tabela 1.

Tabela 1. Média geral da viabilidade dos acessos de *C. chinense* (UENF 1785), *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), *C. annuum* var. *glabriusculum* (UENF 1559), *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495), *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. parvifolium* (CNPH 3331), com base nos corantes carmim acético, lugol, azul de tripano e Alexander.

Acessos	Alexander	Lugol	Carmim Acético	Azul de Tripano
UENF 1785	93,75	90,4	91,5	92,65
UENF 1562	96,1	88,65	89,5	88,45
UENF 1559	95,55	90,05	94,9	92,75
UENF 1624	84,75	93,4	78,7	94,25
UENF 1495	94,1	93,85	89,15	91,3
UENF 1636	93,25	91,7	91,35	94,6
CNPH 3331	98,05	77,15	96,55	95,6
μ	93,65	89,31	90,23	92,8

Alta porcentagem de viabilidade do pólen, semelhante à encontrada no presente estudo, também foi observada por Lanteri e Pickersgill (1993), Tong e Bosland (2003) e Yoon (2003) nas espécies *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* e *C. baccatum*. Tong e Bosland (1999), testando a viabilidade polínica de *C. baccatum* e *C. tovarii*, também observaram uma boa estimativa da viabilidade polínica, com 96,5% e 84,7%, de grãos de pólen viáveis, respectivamente.

A viabilidade polínica alta dos acessos, reflete uma meiose regular e um índice meiótico também regular. Segundo Defani-Scoarize *et al.*, (1995), o comportamento meiótico de uma planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade e as alterações observadas durante a divisão celular, deverão teoricamente, refletir-se na viabilidade dos gametas dos grãos de pólen, pois a viabilidade dos gametas depende de um comportamento meiótico harmonioso.

Segundo Twell (1995), 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.

Damasceno Júnior (2008), avaliando o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de *Carica papaya* e *Vasconcellea monóica*, observou que a meiose mostrou-se regular em *C. papaya* e irregular em *V. monóica*, enquanto a

viabilidade polínica foi de 96,0% e 70,93%, respectivamente, sugerindo que a menor viabilidade encontrada em *V. monóica*, é consequência da sua meiose instável.

Segundo Techio *et al.*, (2006), a alta viabilidade dos grãos de pólen de capim-elefante e de milheto, além de estar relacionada à regularidade meiótica, também está associado ao horário de coleta, padronizado entre 8h30min e 10h, momento em que as anteras começam a se tornar deiscentes, levando a crer que a viabilidade atinja seu ponto máximo. Vale ressaltar que a coleta dos botões florais utilizados, foi realizada sempre pela manhã, entre 8 e 10h.

Souza *et al.*, (2002), estudando a viabilidade polínica em maracujazeiro amarelo, observaram uma diminuição da viabilidade polínica ao longo dos horários de coleta, que ocorreu a partir da antese (12 h) até as 19 h, em intervalos de uma hora, e após 24 horas, mostrando que o percentual médio de viabilidade polínica foi influenciado negativamente pelo horário de coleta, tendo os maiores valores médios percentuais sido encontrados no horário de abertura da flor.

A viabilidade polínica de uma espécie pode ser estimada através de técnicas colorimétricas em que são usados corantes como o carmim acético (Kearns e Inouye 1993), lugol (Dafni 1992), Azul de Tripano e Alexander (Alexander 1969). Considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, a estimativa é dada pela contagem dos grãos de pólen não abortados e abortados que se mostram corados e não corados, respectivamente, ou com cores diferentes, como é o caso do corante Alexander (Techio, 2002).

Com o uso do corante Alexander, onde o pólen viável foi diferenciado do inviável pela coloração vermelha ou púrpura intensa do protoplasma, observou-se que em todas as espécies com exceção de *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), em média, mais de 90% dos grãos de pólen, possuíam protoplasma e parede celular íntegras, indicados pela coloração vermelha do protoplasma e um contorno verde da parede celular (Figura 1 e 2a).



Figura 1. Fotomicrografias dos grãos de pólen de *Capsicum chinense* (UENF 1785): a) Alexander (pólen viável); b) Alexander (pólen inviável); c) Carmim acético (pólen viável); d) Carmim acético (pólen inviável); e) Lugol (pólen viável); f) Lugol (pólen inviável); g) Azul de Tripano (pólen viável); h) Azul de Tripano (pólen inviável). Barra = 10 µm.

Uma alta viabilidade polínica em acessos representantes de espécies do gênero *Capsicum* também foi relatada por Monteiro (2007), Martins (2007) e Souza (2008), que encontraram uma média de 98, 96% e 95%, respectivamente, ao analisarem a viabilidade dos acessos utilizando o corante Alexander.

Damasceno Júnior *et al.*, (2008), testando a viabilidade dos grãos de pólen de dois cultivares de mamoeiro, Golden e Tainung 01, utilizaram dois

corantes, a Solução Tripa de Alexander e o Diacetato de Fluoresceína ou Reação Fluorocromática (FCR). Os autores observaram que não houve diferença significativa entre os testes de coloração utilizados pelo teste “t” ($p > 0,05$) e com base nos resultados obtidos, sugerem o uso do método de Alexander, uma vez que tem alta confiabilidade para o discernimento entre grãos de pólen viáveis e inviáveis, visto a semelhança obtida com uma das técnicas mais aceitas e recomendadas para a avaliação da viabilidade de grãos de pólen, o FCR.

Utilizando o teste de carmim acético, apenas os acessos representativos das espécies *C. chinense* (UENF 1785), *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. parvifolium* (CNPq 3331), apresentaram valor médio de viabilidade acima de 90%. Novamente, a espécie *C. baccatum* var. *pendulum* (UENF 1624), mostrou a menor média, ficando com apenas 78,7% de grãos de pólen viáveis (Figura 2b).

Corrêa *et al.*, (2007), analisaram a viabilidade polínica com o uso do corante carmim acético de quatro espécies do gênero *Capsicum*: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, totalizando 12 acessos do banco ativo de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado. Como resultado, os autores observaram uma grande variação no número de grãos de pólen viáveis entre os acessos, desde 63,2% em *C. frutescens* até 96,7% em *C. chinense*. Munhoz *et al.*, (2008), evidenciaram em seus estudos que altos valores de viabilidade polínica utilizando o teste colorimétrico de carmim acético indica uma boa integridade do material genético do grão de pólen.

Em estudo realizado por Vargas (2006) sobre a viabilidade polínica das cultivares de mamona, a autora afirma que o uso do corante carmim acético 2% permitiu uma boa distinção entre polens viáveis e inviáveis considerando este método adequado para avaliação de viabilidade polínica, que em todas as cultivares avaliadas, foi superior a 86%.

Domingues *et al.* (1999) comparando a técnica de coloração de pólen com carmim acético a 25% com os trabalhos de Moreira e Gurgel (apud Loguercio e Battistin, 2004) que utilizaram carmim acético 40%, descrevem que mesmo em concentrações menores do corante esta metodologia permite boas análises de viabilidade do pólen e que as concentrações maiores permitem apenas fotos mais nítidas. Estes dados corroboram aqueles obtidos neste experimento utilizando

carmim acético 1% para pólen de *Capsicum*, pois permitiu uma boa distinção entre polens viáveis e inviáveis.

Almeida *et al.*, (2006) ao comparar os corantes carmim acético a 1%, azul-de-amã, orceína acética a 2% e lugol para estimar a viabilidade polínica de *Ocimum selloi* e *Ocimum officinalis*, concluíram que para estimar a viabilidade polínica da *O. selloi* pode-se utilizar o carmim acético, o lugol, a orceína acética e o azul-de-amã; já no caso do *O. officinalis*, o carmim acético pode ser considerado o mais eficiente na avaliação da viabilidade dos grãos de pólen.

Com o uso do corante Lugol para estimar a viabilidade dos acessos de *Capsicum*, pode-se perceber uma grande variação nos resultados médios de grãos de pólen entre as espécies (Tabela 1). A espécie silvestre *C. parvifolium* (CNPq 3331), foi a que apresentou menor valor de grãos de pólen viáveis (77,15%), com um limite inferior de 71,43% e limite superior de 82,05%, enquanto a espécie *C. baccatum* var. *baccatum* (UENF 1495) apresentou a maior média (93,85 %) com um limite inferior de 90,97% e limite superior de 96,31% (Figura 3a).

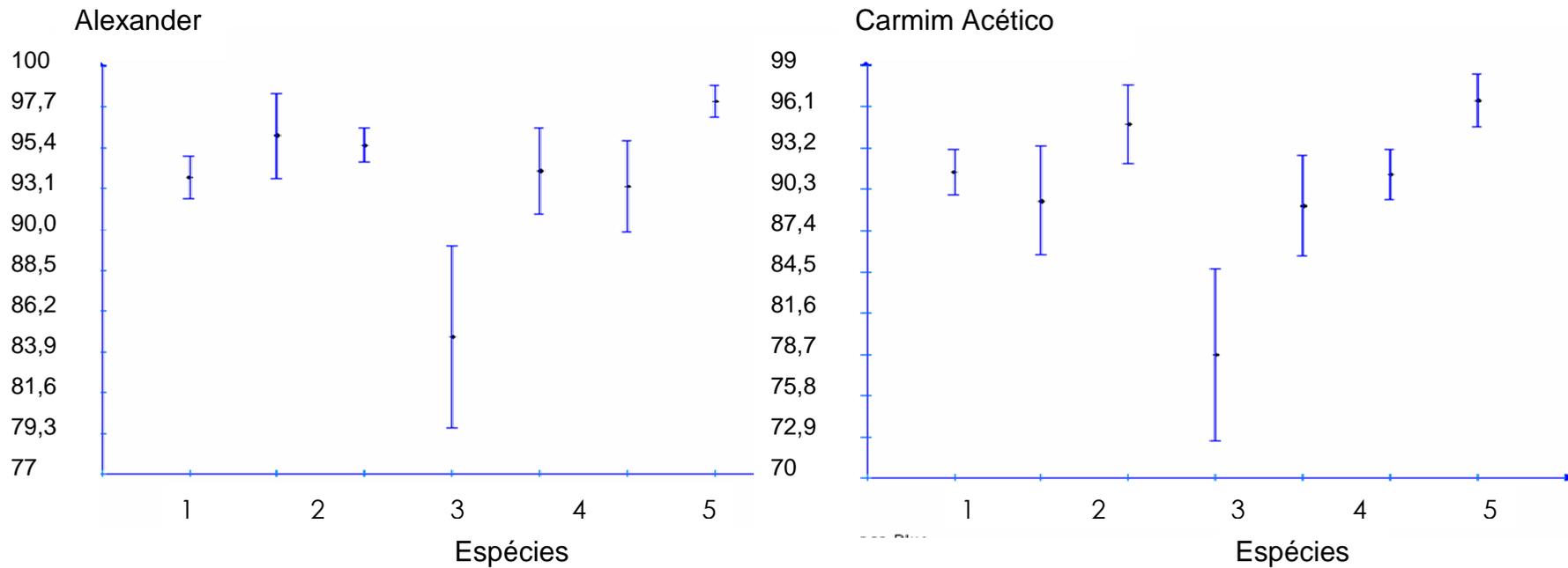


Figura 2. Intervalo de confiança a 95% dos resultados da coloração com os corantes Alexander (a) e Carmim (b), dos acessos de *C. chinense* - UENF 1785 (1), *C. annuum* var. *annuum* - UENF 1562 (2), *C. annuum* var. *glabriusculum* - UENF 1559 (3), *C. baccatum* var. *pendulum* - UENF 1624 (4), *C. baccatum* var. *baccatum* - UENF 1495 (5), *C. frutescens* - UENF 1636 (6), *C. parvifolium* - CNPH 3331(7).

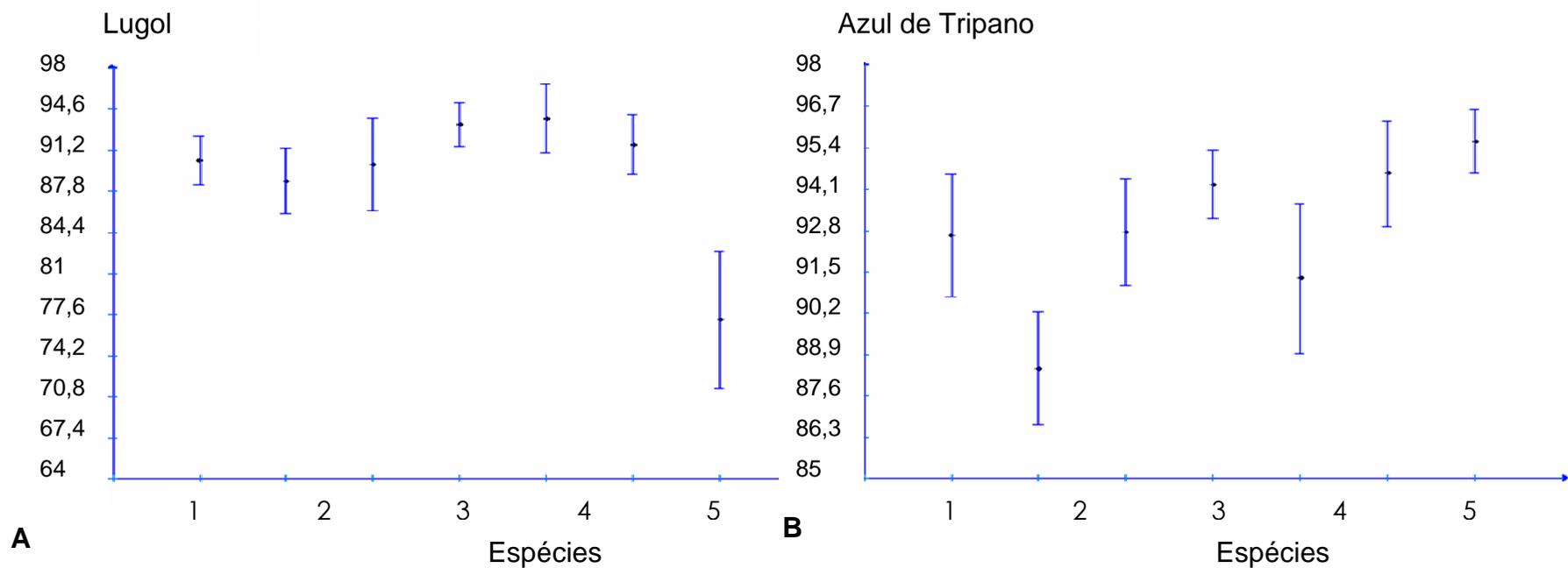


Figura 3. Intervalo de confiança a 95% dos resultados da coloração com os corantes Lugol (a) e Azul de Tripano (b), dos acessos de *C. chinense* - UENF 1785 (1), *C. annuum* var. *annuum* - UENF 1562 (2), *C. annuum* var. *glabriusculum* - UENF 1559 (3), *C. baccatum* var. *pendulum* - UENF 1624 (4), *C. baccatum* var. *baccatum* - UENF 1495 (5), *C. frutescens* - UENF 1636 (6), *C. parvifolium* - CNPH 3331(7).

Apesar do teste de lugol ser usado para estimar a viabilidade polínica de várias espécies (Souza *et al.*, 2004; Oliveira, 2007), esse teste está associado apenas à detecção de amido que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (King, 1960, Beyhaut, 1988, Rodriguez-Riano e Dafni, 2000). Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se supor que em comparação com as espécies avaliadas, os grãos de pólen de *C. parvifolium* (CNPH 3331) possuam uma menor quantidade de amido no grão, uma vez que o teste com lugol acusou a presença de amido em cerca de apenas 77,15% dos grãos de pólen (Tabela 1).

Utilizando o teste colorimétrico de Azul de Tripano, os grãos de pólen viáveis não apresentaram a coloração azul, pois ao penetrar na célula viva essa exclui para o exterior o corante adquirindo uma coloração translúcida, enquanto a inviável, apresenta uma coloração azul escura. Desta forma, a viabilidade com o uso do azul de tripano age como um teste de exclusão. Os resultados obtidos com o presente corante, mostraram que com exceção do acesso *C. annuum* var. *annuum* (UENF 1562), todos os demais acessos apresentaram viabilidade polínica média acima de 90%, no entanto, todos os acessos ficaram dentro do mesmo intervalo de confiança, como pode ser observado na Figura 3b.

Erickson e Markhart (2002), estudando o efeito de altas temperaturas na produção de *Capsicum annuum* var. *annuum*, utilizaram o corante azul de tripano para estimar a viabilidade polínica dos cultivares e observaram que a viabilidade polínica não foi significativamente afetada pela exposição a altas temperaturas, uma vez que a percentagem de grãos de pólen viáveis permaneceu alta tanto para botões não tratados quanto para botões tratados com alta temperatura.

Justo *et al.*, (2008) realizando uma análise da viabilidade do pólen de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.), submetidas à radiação gama, observaram que a cultivar IAC-80 apresentou alta viabilidade, quando na coloração azul de tripano em comparação com os corantes carmim acético 2% e Alexander. Segundo os autores, o teste utilizando o azul de tripano, superestimou a viabilidade da cultivar, em relação ao teste *in vitro*, que apresentou menor percentual de polens germinados, no entanto, em outro trabalho, Cuchiara *et al.*, (2008) fazendo uso do corante azul de tripano para testar a viabilidade de genótipos de mamona, os autores observaram respostas variadas no percentual de viabilidade dos genótipos, mostrando que o teste com o azul de tripano, nem

sempre superestima a viabilidade dos genótipos. Segundo Scorza e Sherman (1995), as reações com corantes podem não se correlacionar bem com a germinação *in vitro* ou com a habilidade de efetuar fertilização.

Souza *et al.*(2009) ao comparar cinco diferentes testes colorimétricos para estimar a viabilidade polínica em *Passiflora suberosa*, observaram nos grãos de pólen corados com azul de tripano, o menor valor da percentagem de grãos de pólen viáveis, em comparação com os demais corantes utilizados.

A produção de pólen viável é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas e fornece informações básicas para a conservação das espécies e o planejamento de um programa de melhoramento genético (Dafni, 1992; Kearns e Inouye, 1993). A viabilidade do pólen pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma espécie e entre amostras de um mesmo indivíduo (Neto *et al*, 2006). Segundo Shivanna e Rangaswamy (1992), o período de florescimento, as alterações ambientais e as diferenças genotípicas podem contribuir para tal variabilidade.

De acordo com Loguercio e Battistin (2004), através de estudos sobre a viabilidade polínica pode-se obter resultados da fertilidade das espécies e/ou cultivares, obtendo-se uma visão prévia da infertilidade das plantas, bem como o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer.

Analisando a influência de cada corante na estimativa da viabilidade das espécies, observa-se que não houve diferença significativa entre os mesmos (Tabela 2), no entanto a média da viabilidade estimada pelo corante Alexander foi maior do que as análises realizadas com os demais corantes.

Tabela 2. Médias da viabilidade dos grãos de pólen estimada pelos diferentes corantes.

Corantes	Médias
Alexander	93,650 a
Azul de Tripiano	92,800 a
Carmim	90,236 a
Lugol	89,314 a
CV (%)	3,996 %

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Techio *et al.*, (2006) avaliando a viabilidade do pólen em acessos de capim-elefante relataram que o Reativo de Alexander (verde malaquita + fucsina ácida) apresenta dados mais acurados pela diferenciação de coloração. Em que o verde malaquita tem afinidade com a celulose presente na parede celular corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida de rosa. Desta forma, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen abortados coram-se de verde (Alexander, 1969). Auler *et al.*, (2006), compararam os corantes carmim propiônico 2%,orceína acética 2% e reativo de Alexander, para estimar a viabilidade polínica de *Baccharis trimera*. Como resultado, os autores sugerem o corante reativo de Alexander como o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen da espécie.

Apesar do teste de média entre os corantes não ter sido significativo, sugere-se a utilização da solução tripla de Alexander, para estimar a viabilidade polínica de espécies de *Capsicum*, no uso rotineiro em laboratório, pois além de eficaz, é uma técnica rápida e de fácil visualização.

As diferenças entre os corantes dentro de cada um dos acessos estudados, também foram observadas. No caso do acesso UENF 1785 representante da espécie domesticada *C. chinense*, todos os corantes analisados ficaram dentro do mesmo intervalo de confiança, sendo a maior média de grãos de pólen viáveis detectada pelo corante Alexander, com 93,75% de viabilidade (Tabela 1 e Figura 4a). Esses dados corroboram os obtidos por Souza (2008), que ao analisar a viabilidade polínica em 52 acessos de *C. chinense* da coleção de germoplasma da UENF, obteve uma média geral de viabilidade de 95% utilizando a solução tripla de Alexander.

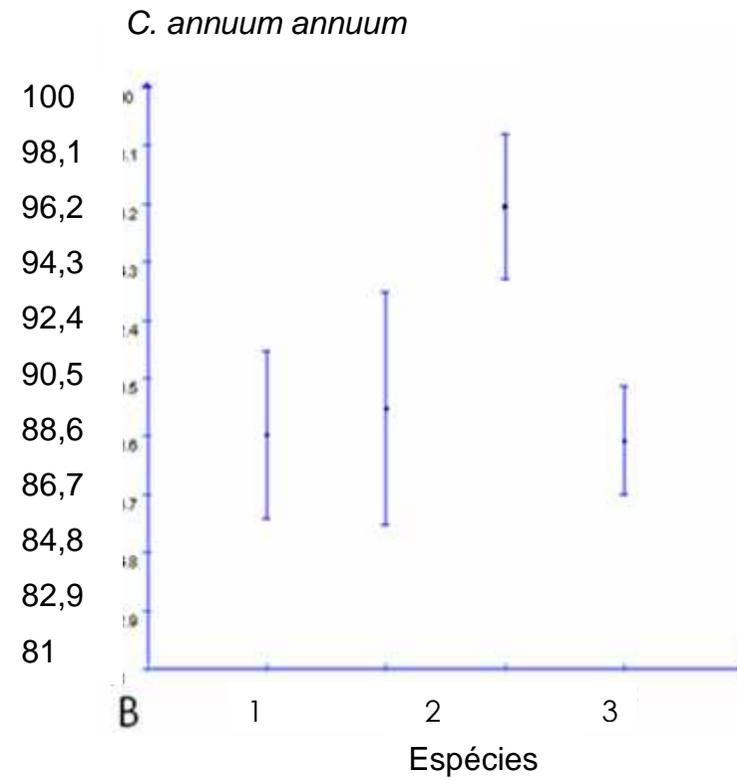
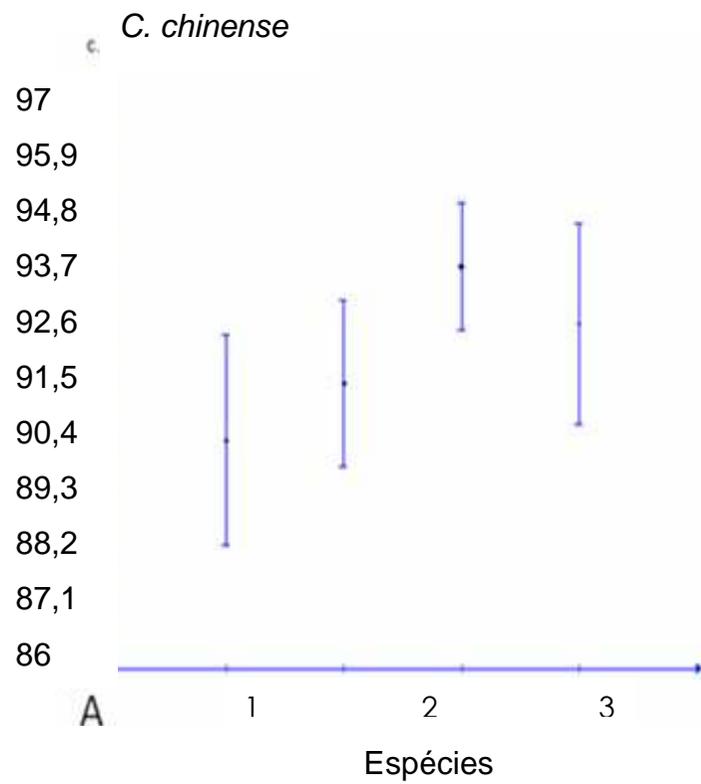


Figura 4. Intervalo de confiança a 95% dos resultados da coloração de *C. chinense* (a) e *C. annum* var. *annuum* (b), com os corantes Lugol (1), Carmim (2), Alexander (3) e Azul de Tripano (4).

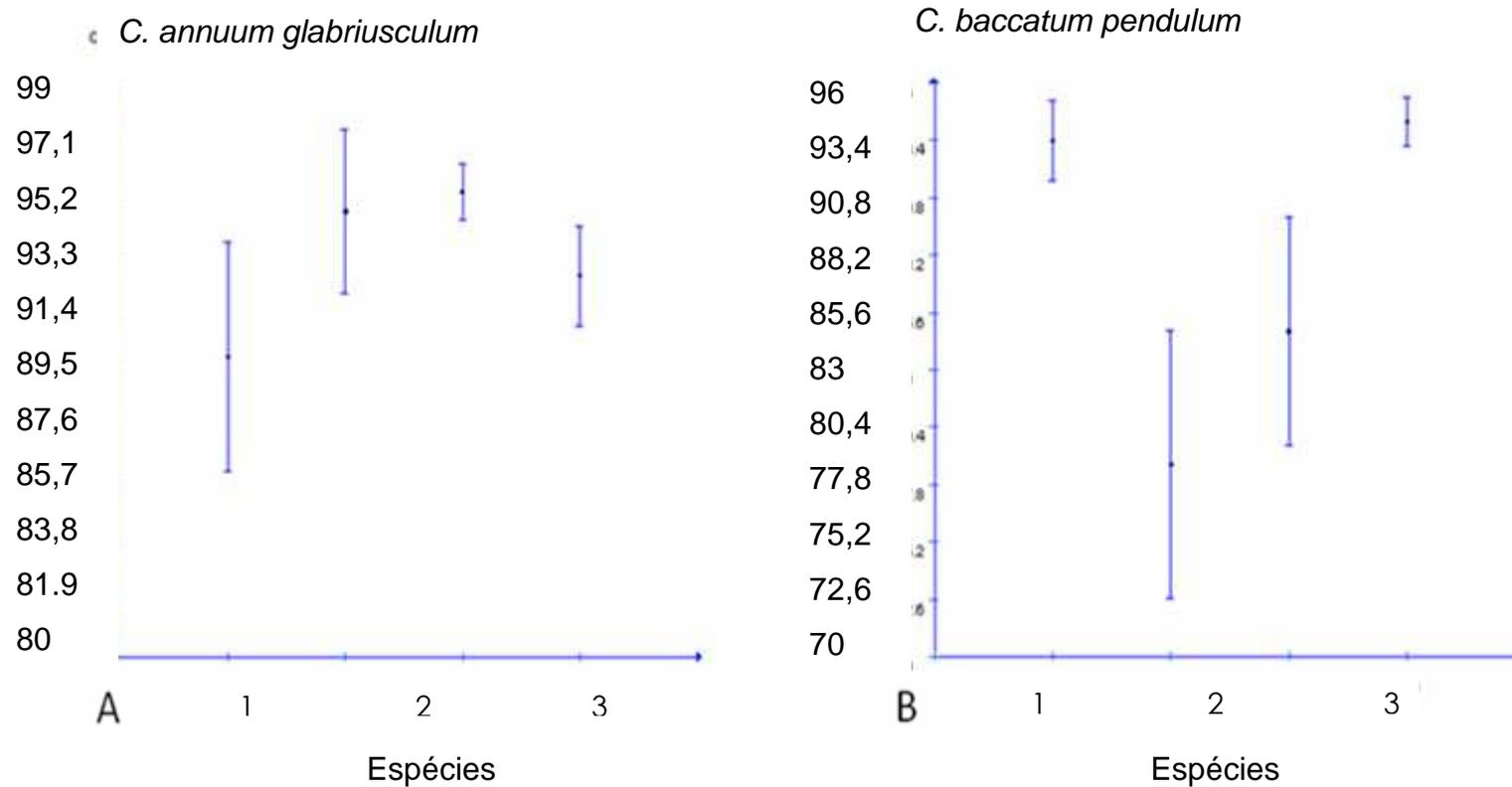


Figura. 5 Intervalo de confiança a 95% dos resultados da coloração de *C. annuum* var. *glabriusculum* (a) e *C. baccatum* var. *pendulum* (b), com os corantes Lugol (1), Carmim (2), Alexander (3) e Azul de Tripano (4).

Quando comparada as médias entre os corantes utilizados para estimar a viabilidade polínica do acesso UENF 1562 (*C. annuum* var. *annuum* – pimentão), pode-se observar que dentre os quatro corantes, o Alexander foi também o que estimou um maior número de grãos de pólen viáveis, no entanto, no caso desse acesso, o corante Alexander foi o único a indicar uma média superior a 90% de grãos de pólen possuindo protoplasma e parede celular íntegras (Figura 4 b).

Monteiro (2007) avaliando a viabilidade polínica em acessos representantes das espécies cultivadas de *Capsicum*, obteve como resultado uma média de 85% de viabilidade polínica para os acessos representantes da espécie *C. annuum* var. *annuum*, tipo pimentão, valores próximos aos obtidos nesse estudo com o uso dos corantes Lugol, Carmim acético e Azul de Tripano, já os acessos representantes da mesma espécie, porém variedade pimenta, apresentaram uma média percentual de viabilidade polínica em torno de 91%.

Na estimativa da viabilidade polínica do acesso UENF 1559, representante da espécie semidomesticada *C. annuum* var. *glabriusculum*, o corante Alexander também apresentou a maior média, no entanto, o corante Carmim acético foi o que mostrou o maior limite superior no intervalo de confiança a 95% (97,64%) (Figura 5 a). Martins (2007), estudando a meiose e viabilidade polínica do acesso UENF 1559, observou que apesar de terem sido identificadas algumas anormalidades meióticas, as mesmas não foram suficientes para comprometer a fertilidade da espécie, uma vez que foi observada uma média geral de viabilidade de 96,6%, condizendo com os dados obtidos no trabalho atual.

Pelo intervalo de confiança a 95%, pode-se observar na Figura 5 b, que no acesso UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*), as médias dos corantes azul de tripano e lugol, não ficaram no mesmo intervalo que os demais corantes, sendo os mesmos, responsáveis por estimar valores médios de viabilidade superiores a 90%, enquanto os corantes carmim acético e lugol, apresentaram uma viabilidade polínica média de 78,7% e 84,75%, respectivamente.

Vale ressaltar que dentre as espécies utilizadas no presente estudo, o acesso UENF 1624, foi o que apresentou menores valores de viabilidade, com limite inferior de 72,62% com o uso do corante carmim acético. Essa baixa viabilidade pode estar relacionada a problemas durante a meiose, visto que

segundo Souza *et al.*, (2000), o grau de fertilidade de uma planta está diretamente relacionado ao seu comportamento meiótico.

Quando comparada as médias entre os corantes utilizados para estimar a viabilidade polínica do acesso UENF 1495 (*C. baccatum* var. *baccatum*), pode-se observar que a média dos corantes ficaram dentro do mesmo intervalo, sendo que o único corante que apresentou uma média inferior a 90% de viabilidade foi o corante carmim acético. No entanto, seu valor foi muito próximo dos demais, identificando 89,1% de média de grãos de pólen viáveis (Figura 6 a). Em estudo realizado por Campos (2006), os acessos representantes da espécie *C. baccatum* var. *baccatum* apresentaram viabilidade polínica alta, 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.

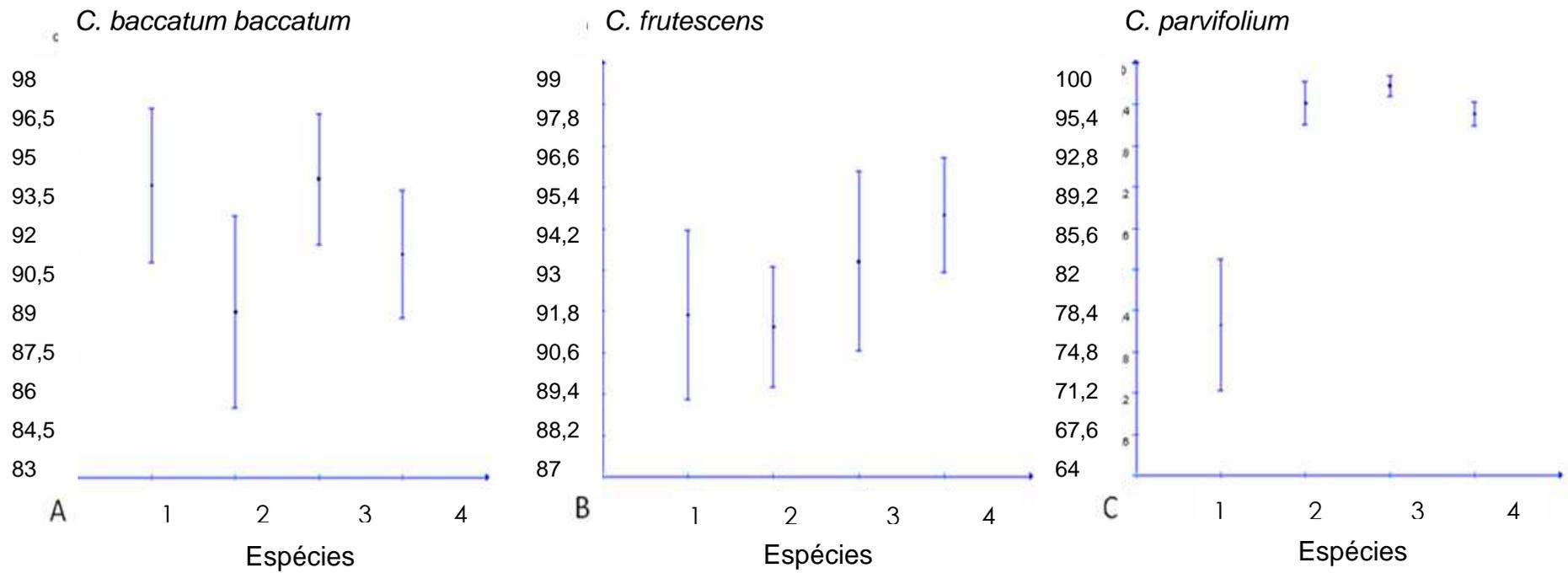


Figura 6. Intervalo de confiança a 95% dos resultados da coloração de *C. baccatum* var. *baccatum* (a), *C. frutescens* (b), *C. parvifolium* (c), com os corantes Lugol (1), Carmim (2), Alexander (3) e Azul de Tripano (4).

No acesso UENF 1636 (*C. frutescens*), ocorreu uma diferença no que foi observado até então para as espécies supracitadas, com exceção do acesso UENF 1624 (*C. baccatum* var. *pendulum*). Nessa espécie, o corante Alexander apresentou a segunda maior média geral de grãos de pólen viáveis, sendo o corante azul de tripano, o responsável pelas maiores médias de viabilidade encontradas no acesso (Figura 6 b). O acesso UENF 1636 (*C. frutescens*), juntamente com os acessos UENF 1559 (*C. annum* var. *glabriusculum*) e UENF 1785 (*C. chinense*) foram os únicos acessos cujas médias de viabilidade polínica foram superiores a 90%, independente do corante utilizado para estimar essa viabilidade.

Por último, foi estimada a viabilidade do acesso representante da única espécie silvestre presente no estudo, *C. parvifolium* (CNPq 3331). Quando foi analisada a viabilidade do presente acesso, fazendo uso dos corantes carmim acético, Alexander e azul de tripano, encontrou-se valores altos de viabilidade, sendo observados 96,55%, 98,05% e 95,6% de grãos de pólen viáveis respectivamente. No entanto, quando foi utilizado o corante Lugol, a média de viabilidade do acesso, caiu muito, apresentando 77,15% de pólen viáveis, com um limite inferior de 71,43% e superior de 82,86% (Figura 6 c).

Com base nesse resultado, pode-se dizer que apenas 77,15% dos grãos de pólen de *C. parvifolium* avaliados em um total de 2000 pólenes observados, acusaram a presença de amido, apesar do teste de lugol ser usado para estimar a viabilidade polínica. Segundo King (1960), Beyhaut (1988), Rodriguez-Riano e Dafni (2000), esse teste está associado apenas à detecção de amido que podem estar presente tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados.

Pozzobon e Schifino-Wittman (2006) estudaram o comportamento reprodutivo de um total de 30 acessos de 14 espécies do gênero *Capsicum*, através da análise meiótica e viabilidade polínica dos mesmos. Dentre as espécies silvestres avaliadas pelas autoras, encontrava-se a espécie *C. parvifolium* que apresentou uma viabilidade polínica de 81,10%, resultado de um índice meiótico superior a 90% apesar da presença de produtos pós-meióticos como monâdes, díades, tríades e de algumas irregularidades meióticas tais como a presença de quadrivalentes.

3.2.6. CONCLUSÃO

Os acessos utilizados neste estudo apresentaram uma taxa de viabilidade polínica alta, independente do corante utilizado, uma vez que em nenhum dos acessos estudados foi observado a prevalência de grãos de pólen estéreis/inviáveis. Essa viabilidade polínica alta dos acessos reflete uma meiose e um índice meiótico regular, indicando uma potencialidade para a utilização em cruzamentos.

Não houve diferença significativa entre os corantes utilizados, no entanto a média da viabilidade estimada pelo corante Alexander foi maior do que as médias obtidas com os demais corantes. Em vista disso, sugere-se a sua utilização para estimar a viabilidade polínica de espécies de *Capsicum*, em trabalho rotineiro no laboratório, pois além de eficaz, é uma técnica rápida e de fácil visualização

3.2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M.P. (1969) Differential staining of aborted and noaborted pollen. *Stain Tech.* n.1, v.44, p.117-122.
- ALMEIDA, O. S. da; RIBEIRO, G. S.; ALVES, J. S.; SILVA, A. B. da; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. (2006) Estimativa da viabilidade polínica em espécies do gênero *Ocimum* com diferentes corantes. In: 46º Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. Horticultura Brasileira, v. 24. p. 242-242.
- AULER, N. M. F., BATTISTIN, A., REIS, M. S. (2006) Número de cromossomos, microesporogenese, viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, n.2, v.8, p.55-63.
- BEYHAUT, R. (1988) Estúdio comparado de dos técnicas para viabilidad de polen en *Vitis vinifera*. Notas Técnicas, 5. Facultad de Agronomia, Montevideo .
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. (2001) Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos

- gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae – Faboideae), nativas na Região Sul do Brasil. *Bioikos*, v.15, n.1, p.39-44.
- BOLAT, Y.; PIRLAK, L.(1999) An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Turkish Journal of Agriculture Forestry*, Ankara, v.23, p.383-388.
- CAMPOS, K. P. (2006) Obtenção, caracterização morfológica e reprodutiva de híbridos interespecíficos entre espécies domesticadas de *Capsicum* L. Tese de Doutorado em Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.
- CORRÊA, L. B., BARBIERI, R. L., SILVA, J. B. (2007) Caracterização da viabilidade polínica em acessos de *Capsicum* (Solanaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5 (1): 660-662.
- CRUZ, C. D. (2006) Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm.
- CUCHIARA, C. C.; JUSTO, P. S.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. (2008) Uso de corantes na análise da viabilidade polínica de genótipos de mamoneira expostos em condições adversas. In: Simpósio Estadual de Agroenergia e 2ª Reunião Técnica Anual de Agroenergia-RS, Porto Alegre-RS.
- DAFNI, A. (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford University Press Inc. New York, 1ª. Ed., 250 p.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C. (2008) Estudos citogenéticos, genéticos e moleculares, como ferramenta auxiliar no melhoramento genético do mamoeiro. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. 151p.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. da (2008) Conservação de pólen de mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Revista Ceres*. 55(5): 433-438
- DEFANI-SCOARIZE, M. A.; PAGLIARINI, M. S.; AGUIAR, C. G. (1995) Evolution of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parentes. *Maydica*, v.40, n. 1,2 p. 319-324.
- DOMINGUES, E.T; TULMANN NETO, A.; TEÓFILO SOBRINHO, J. (1999) Viabilidade do pólen em cultivares de laranja doce. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 56, n. 2, p.265-272.

- ERICKSON, A. N.; MARKHART, A. H. (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell and Environment*. 25, 123–130
- FILGUEIRA, F. A. R. (2000) Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 402p.
- HAJJAR, R., HODGKIN, T. (2007) The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*: 156: 1-13.
- JUSTO, P. S.; CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. (2008) Análise da viabilidade do pólen de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidas à radiação gama. In: III Congresso Brasileiro de Mamona - Energia e Ricinoquímica, Salvador.
- KEARNS, C. A. E INOUE, D. (1993) Techniques for pollinations biologists. Niwot, Colorado: University press of Colorado. 579p.
- KUANG, H. H.; TU, D. S. (1935) Studies on the fertile percentage in varietal crosses of rice hybrids. *Agron. Jour.*, 23: 190.
- KING, J. R. (1960) The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain technology* 35:225-7.
- LANTERI, S., PICKERSGILL, B. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. e *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica*, 67 (1-2):155-160.
- LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. (2004) Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium Cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul- Brasil. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.*, v. 11, nº 1. p.192-205.
- MANARA, N. T. F. (1974) Viabilidade dos grãos de pólen em variedades de arroz (*Oriza sativa* L.). *Ver. Centro Ciências Rurais*. Vol. 4, n.4, 309-316.
- MARTINS, K. C. (2007) Análise meiótica em espécies do gênero *Capsicum*. Monografia (Licenciatura em Biologia) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 51p.
- MONTEIRO, C. E. S. (2007) Viabilidade polínica de híbridos interespecíficos e acessos do gênero *Capsicum* L. (Solanaceae). Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ. 50p.

- MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER-FILHO, P.E.; BARTH, o.M.; REINERT, F. (2008) Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. *Revista Brasileira de Botânica*, n.2, v.31, p.209-214.
- NETO, O. D. S.; KARSBURG, I. V.; YOSHITOME, M. Y. (2006) Viabilidade e germinabilidade polínica de populações de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) *Revista de Ciências Agro-Ambientais, Alta Floresta*, v.4, n.1, p.67-74
- OLIVEIRA, J. F. de (2007). Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, Alagoas. 72f.
- POZZOBON, M. T., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. (2006) A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). *Cytologia* 71(3): 275–287.
- RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. (2000) A new procedure to assess pollen viability. *Sex Plant Reprod.* v.12, p.241-244.
- SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. (1995) Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J.N. (Ed.). *Fruit breeding*. New York: John e Sons. p.325-440.
- SHIVANNA, K.R., RANGASWAMY, N.S. (1992) *Pollen biology. A laboratory manual*. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 210p.
- SOUZA, S. A. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, K. C.; MONTEIRO, C. E. S. (2009) Comparação entre metodologias para estimar a viabilidade polínica em *Passiflora suberosa* L. Resumo 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas.
- SOUZA, S. A. M. (2008) Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; SILVA, L. C.; SUDRÉ, C. P. (2004) Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae) *Beitrag zur Biologie Pflanzen*, Berlim, v.73, p.359-376.
- SOUZA, M. M. de; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. (2002) Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciênc. agrotec.*, Lavras. V.26, n.6, p.1209-1217.

- SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., RODRIGUES, R., DUTRA, G. A., SUDRÉ, C. P. (2000) Irregularidade meiótica em pimenta. *Hortic. bras.*, v. 18, p. 748-749.
- TECHIO, V. H., DAVIDE, L. C., PEDROZO, C. A., PEREIRA, A. V. (2006) Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Sci. Biol. Sci.*, v. 28, n. 1, p. 7-12.
- TECHIO, V. H. (2002) Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras. 104p.
- 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*, 50:193-199.
- TONG, N., BOSLAND, P. W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109: 71-77.
- 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
- VARGAS, D. P. (2006) Mamona (*Ricinus communis* L.): Cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen. Dissertação de mestrado. Em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 98p.
- YOON, J.B. (2003) Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding pepper (*Capsicum annuum* resistant to anthracnose).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O gênero *Capsicum* abrange cerca de 30 espécies, sendo constituído por muitas espécies silvestres e apenas cinco domesticadas, originárias da América Tropical. As espécies domesticadas incluem *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense* e *Capsicum pubescens*, sendo a espécie *Capsicum annuum*, a mais importante comercialmente. A diversidade encontrada em *Capsicum* é ampla, com grande variedade de formatos, tamanhos, cores e sabores de fruto, e também com diferentes pungências, arquitetura de planta e composição nutricional. Os programas de melhoramento de plantas estão fundamentados na utilização da diversidade genética dentro de uma espécie para a criação e seleção de novas cultivares com elevado potencial produtivo além da conservação dos recursos genéticos disponíveis. Para tanto, torna-se necessário conhecer a diversidade genética existente. A variabilidade pode ser estudada por meio de estudos citológicos, tais como análise de cariótipo, análise meiótica, estudos moleculares, viabilidade polínica e morfologia do grão de pólen gerando conhecimentos que poderão auxiliar trabalhos de pesquisas que visem o desenvolvimento de materiais superiores. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da diversidade genética presente no gênero *Capsicum* com base no estudo do grão de pólen (descritores polínicos e viabilidade polínica) das espécies *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccatum* var. *baccatum*,

Capsicum baccatum var. *pendulum* e *Capsicum parvifolium*. O estudo da morfologia polínica revelou grãos de pólen com características típicas da família Solanaceae, sendo descritos como isopolares, variando de pequenos a médios, com âmbito triangular e subcircular, 3-colporados, poro lalongado e trizonocolporados. Pelo método de Ward e ACP foi possível agrupar os acessos de acordo com a classificação dos complexos gênicos, que coloca as espécies de *C. annuum* e de *C. baccatum* em grupos diferentes. A variável largura do Poro foi discriminante para o estudo morfopolínico de *Capsicum* spp. Quanto à viabilidade polínica, os acessos utilizados neste estudo apresentam uma taxa de viabilidade polínica alta, independente do corante utilizado, uma vez que em nenhum dos acessos estudados foi observado a prevalência de grãos de pólen estéreis/inviáveis. Não houve diferença significativa entre os corantes utilizados, no entanto a média da viabilidade estimada pelo corante Alexander foi maior do que as análises realizadas com os demais corantes. Em vista disso, sugere-se a sua utilização para estimar a viabilidade polínica de espécies de *Capsicum*, no uso rotineiro em laboratório, pois além de eficaz, é uma técnica rápida e de fácil visualização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, J. R. (2001) Análise morfológica dos cromossomos de pimentão (*Capsicum annuum* L.). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa – MG.
- AKAMINE, E.K.E., GIROLAMI, D.G. (1957) Problems in fruit set in yellow passion fruit Hawaii. *Farm Science*, 2 (2): 3-5.
- ALEXANDER, M.P. (1969) Differential staining of aborted and noaborted pollen. *Stain Tech.* n.1, v.44, p.117-122.
- AMARAL JÚNIOR, A. T. DO; THIÉBAUT, J. T. DE L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais*. Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, CCTA, 55p.
- AMARAL JÚNIOR, A. T. (1994) Análise multivariada e isozimática da divergência genética entre acessos de moranga (*Curcubita máxima* Duchesne). Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG. 95p.
- ANDREWS, J. (1984) *Peppers: the domesticated Capsicum*. Austin: University of Texas Press. 170p.
- BAKER, H. G. (1954) Aperture membranes in studies of pollen morphology and taxonomy. *Studies of pollen morphology and taxonomy*, p. 350-352.
- BARTH, O.M. E MELHEM, T.S. (1988) *Glossário Ilustrado de Palinologia*. Campinas, Editora da Universidade Estadual de Campinas.

- BARTH, O.M. (1964) Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional – Glossário Palinológico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 63: 133-162.
- BELLETTI, P., MARZACHI, C., LANTERI, S. (1998) Flow cytometric measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 209:85-91.
- BENIN, G.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; KUREK, A. J.; SILVA, J. A. G.; CRUZ, P. J.; HARTWING, I.; SCHMIDT, D. A. M. (2003) Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatísticas multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.4, p.657-662. ISSN 0103-8478
- BENTO, C. S. (2008) Identificação de fontes de resistência ao *Pepper yellow mosaic virus* e resposta fisiológica de acessos de *Capsicum chinense* infectados com esse vírus. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 97p.
- BENTO, C. S., SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R., RIVA, E. M., PEREIRA, M. G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, 8, (2) 149-156.
- BIANCHETTI, L.B. (1996) *Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de Capsicum (Solanaceae) ocorrentes no Brasil*. Tese (Mestrado em Botânica) – Brasília – DF, Universidade de Brasília - UNB, 174p.
- BREWBAKER, J. L. (1967) The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. *Amer. J. Bot.* 54(9): 1069-1083.
- BOSLAND, P. W. (2004) Homage to the chile peppers. In: International Pepper Conference, 17, Naple, Florida, p.1.
- BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. (1999) Peppers: vegetable and spice *Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p.
- BOSLAND, P. W. (1996) *Capsicums: Innovative Uses of an Ancient Crop*. Arlington, VA: ASHS Press, p. 479-487.
- BOSLAND, P. W. (1993) Breeding for quality *Capsicum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, v. 12, p. 25-31.

- BOSLAND, P. W. (1992) Chiles: A diverse Crop. HortTechnology, v. 2(1), p. 7-10.
- BOTTO, V.O. 1997. Cruzamiento interspecíficos en *Eucalyptus* sp. In: Actas del XI Congreso Forestal Mundial, Antalya, Turquía 8:1-9. Disponível em http://www.fao.org/forestry/docrep/wfcxi/publi/v8/es/v8s_e5.htm (acesso em novembro/2009).
- BREWBAKER, J. L. (1967) The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the angiosperms. Amer. J. Bot. 54(9): 1069-1083.
- BREWBAKER, J. L. (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. J. Hered.48:271-77
- CANCELI, R. R.; SCHNEIDER, A. A.; BAUERMANN, S. G. (2006) Morfologia polínica do gênero *Pluchea* Cass. (Asteraceae), no Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Paleontologia 9(1):149-156
- CARDOSO, A. I. I. (2001) Melhoramento de hortaliças. In: Nass, L. L.; Valois, A. C. C.; Melo, I. S.; Valadares-Ingles, M. C. Recursos genéticos e melhoramento de plantas. Rondonópolis, MT: Fundação MT, cap. 12, p. 293-326.
- CARVALHO, L. P. (1993) Divergência genética e análise dialélica em *Gossypium hirsutum* L. var. *latifolium* Hutch. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG. 203p.
- CASALI, V. W. D.; COUTO, F. A. A. (1984) Origem e botânica de *Capsicum*. Informe Agropecuário, v.10, n. 113, p. 8-18.
- CASALI, V. W. D.; PÁDUA, J. G.; BRAZ, L. T. (1984) Melhoramento de pimentão e pimenta. Informe Agropecuário, v.10, n. 113, p. 19-22.
- COLINVAUX, P. A.; OLIVERIA, P. E.; PATÑO, J. E. M.; MORENO, E. (1999) Amazon pollen manual and atlas. Editor: CRC Press. 332 p.
- COSTA, F. R., PEREIRA, T. N. S., SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R. (2008) Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. Ciência Rural, Santa Maria, Online.
- COSTA, F. R., PEREIRA, T. N. S., VITÓRIA, A.P., CAMPOS, K.P., RODRIGUES, R., SILVA, D. H., PEREIRA, M. G. (2006) Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:18-23.

- COSTA, R. A., RODRIGUES, R., SUDRÉ, C. P. (2002) Resistência genética à mancha-bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20 (1): 86-89.
- CRESPO, S. R. M.; FERREIRA, W. M. (2006) Morfologia polínica dos gêneros *Curtia* Cham. e Schltld. e *Hockinia* Gardner (Gentianaceae Juss.). *Acta bot. bras.* 20(2): 273-284.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV. 480p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2003. 585p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. (2001) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2ed. rev. Viçosa: UFV, 390p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. (1994) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: Editora UFV, 394p.
- CRUZ, C. D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas (1990) Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 188p.
- DAFNI, A. (1992) Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press Inc. New York, 1ª. Ed., 250 p.
- DAJOZ, I.; BOTTRAUD, I. T.; GOUYON, P. H. (1991) Evolution of pollen morphology. *SCIENCE*, v. 253, p. 66-68
- DIAS, L.A.S. (1994) Divergência genética e fenética multivariada na predição de híbridos e preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.). 94p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba
- EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. D. C. B. (2006) Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, n.1, v. 28, p. 5-7.
- EMBRAPA (2009) *Capsicum* Pimentas e Pimentões no Brasil. <<http://www.cnph.embrapa.br/Capsicum/especies.htm>>. Acesso em: 15/09/2009, página mantida pela Embrapa.
- ERDTMAN, G. (1971) Pollen morphology and plant taxonomy. Hafner Publishing Company, New York.

- ERDTMAN, G. (1986) Pollen morphology and plant taxonomy: an introduction to palynology. 2nd Ed, Almqvist e Wiksell, Stockholm, Sweden. 553p.
- ERDTMAN, G. (1943) *An Introduction to Pollen Analysis*. Waltham, Mass.
- ESAU, K. (1977) Anatomy of seed plants. John Wiley e Sons (ed.). 2nd. Ed. USA, 550p.
- ESHBAUGH, W. H. (1993) Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J. e J.E. Simon (Eds), *New Crops*, p. 132-139. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- ESTEVEES, V. G. (1998) Palinotaxonomia de espécies brasileiras de *Tontelea aubl.* (Hippocrateaceae Juss.) Polinobotânica, Núm. 7, pp. 33-54, ISSN 1405-2768.
- FAEGRI, K., IVERSEN, J. (1964) Textbook of pollen analysis. 2nd ed. Blackwell, Oxford.
- FALCONER, D. S. (1981) Introduction to quantitative genetics. 2 ed. London: Longman. 340p
- FILHO, H (2009) Pimentas quentes. <http://www.geosites.com/napavalley/1819/index..htm>. Acesso em: 03/02/2009.
- FLOSS, E. L. (2003) Estratégias de pós-melhoramento. II Congresso Brasileiro De Melhoramento De Plantas. Porto seguro-BA, Anais.
- FRANKLIM, C. P. R. B.; ESTEVEES, V. G. (2008) Palinologia de espécies de *Solanum* L. (Solanaceae A. Juss.) ocorrentes nas restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta bot. bras.* 22(3): 782-793.
- FRANKLIM, C. P. R. B.; ESTEVEES, V. G. (2002) Morfologia polínica de espécies de *Brunfelsia* L. (Solanaceae) ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasil. Bot.*, V.25, n.2, p.137-145.
- GASPARINO, E. C.; BARROS, M. A. V. C. (2006) Palinologia. Curso de Capacitação de monitores e educadores. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica – IBt.
- GREENLEAF, W. H. (1986) Pepper breeding. In: BASSETT, M. J. (Ed.). *Breeding vegetable crops*. Connecticut: AVI Publishing Company. Cap.3, p.67-134.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHUAM, R. L.; BLACK, W. C. (2005) Análise multivariada de dados, Porto Alegre, Artmed Editora S. A. 593 p.

- HE, G., PRAKASH, C.S., JARRET, R.L. (1995) Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Genome*, 38: 938-945.
- HESSE, M.; HALBRITTER H.; ZETTER, R.; WEBER, M.; BUCHNER, R.; FROSCH-RADIVO, A.; ULRICH, S. (2009) Pollen terminology. An illustrated handbook. 264p.
- HESSE, M.; WAHA, M. (1989) A new look at the acetolysis method. *Pl. Syst. Evol.* 163, 147-152.
- HEISER JR., C. B. (1995) Peppers – *Capsicum* (Solanaceae). In: SMARTT, J.; SIMMONDS, N. W. *Evolution of crop plants*. London: Longman, p. 449-451.
- HEISER JR, C. B. (1979) Peppers – *Capsicum* (Solanaceae). IN: SIMMONDS, N. W. *Evolution of crop plants*. Longman, p. 265-273.
- HEISER JR, C. B. (1976) Peppers, *Capsicum* (Solanaceae). P. 256- 268. In: N.W. SIMMONDS. (ed.). *The evolution of crop plants*. Longman Press, London.
- HESLOP-HARRISON, J. S. (2000) RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. *Chromosome Today*, v. 13, p. 45-57.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. (1984) The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *TAG* 67:367-375.
- HISTORY VAVILOV (2009) Disponível em: <http://www.vir.nw.ru/history/vav_sp.htm>espécies>. Acesso em: 15/08/2009
- HUYSMANS, S., ROBBRECHT, E., SMETS, E. (1994) Are the genera *Hallea* and *Mitragyna* (Rubiaceae – *Coptosapelteae*) pollen morphologically distinct. *Blumea* 39: 321-340.
- HORNER, H. T.; PALMER, R. G. (1995) Mechanisms of genetic male sterility. *Crop Science*. Madison, v. 35, p. 1527-1535.
- IBPGR (1983) *Genetic resources of Capsicum*. Roma: IBPGR Secretariat
- JUDD, W. S., (1999) *Plant systematic: a phylogenetic approach*. Massachusetts, Sinauer Associates.
- KEARNS, C.A.; INOUE, D. (1993) *Techniques for pollinations biologists*. Niwot: University Press of Colorado.
- LANTERI, S., PICKERSGILL, B. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annum* L. e *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica*, 67 (1-2):155-160.

- LEAL, M. G.; LORSCHNEITZER, M. L. (2006) Pólen, esporos e demais palinófitos de sedimentos holocênicos de uma floresta paludosa, Encosta Inferior do Nordeste, Rio Grande do Sul, Brasil. *IHERINGIA, Sér. Bot.*, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 13-47.
- LEWIS, W.H.; ELVIN-LEWIS, M.P. (1995) Medicinal plants as sources of new therapeutics. *Annals of Missouri Botanical Garden*, v.82, p.16-24.
- LINS, T. C. L., LOURENÇO, R. T., TAVARES, H. M. F., REIFSCHNEIDER, F. J. 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_Resumo158.htm.
- LOARCE, Y.; GALLEGO, R.; FERRER, E. (1996) A comparative analysis of the genetic relationship between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. *Euphytica*, Wageningen, v. 88, p. 107-115.
- LUZ, F. J. F. L. (2007) Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense*, Jacq.). Tese de Doutorado em Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal – SP.
- MANLY, B. F. J. (1986) *Multivariate statistical methods: a primer*. London: Chapman and Hall. 159p.
- MARCOS FILHO, J. (2005) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: Fealq, 495p.
- MARDIA, A. K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. (1997) *Multivariate analysis*, London, Academic Press. 518 p.
- MARTINS, L. H. P.; MIRANDA, I. P. A.; NUNES, C. D. N. (2002) Morfologia polínica de populações amazônicas de *Elaeis oleifera*. *Acta amazônica* 33(2): 159-166.
- MARTINS, M.E., PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. (1981) Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético. Circular Técnica n.18, IPEF, Piracicaba.
- MARTIN, F. W.; SANTIAGO, J.; COOK, A. A. (1979) *Vegetables for the hot humid tropics (Part 7. the Peppers, Capsicum Series)*. Science and Education Administration / U. S. Department of Agriculture). New Orleans, 18p.
- MASCARENHAS, J. P. (1992) Pollen gene expression: Molecular evidence. *Int. Rev. Cytol.* 140, 3-18.

- McCORMICK, S. (1993) Male gametophyte development. *The plant cell*, v. 5, p. 1265-1275.
- MC LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H.(1986) Genetics of GOT in *Capsicum*. *J. Hered.*, v. 77, p. 469-470.
- MC LEOD, M.J., GUTTMAN, S.I., ESHBAUGH, W.H., RAYLE, R.E. (1983) An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (*Solanaceae*). *Evolution*, 37 (3):562-574.
- MC LEOD, M. J.; GUTTMAN, S. I.; ESHBAUGH, W. H. (1982) Early evolution of chille peppers (*Capsicum*). *Economic Botany.*, v. 36, n.4, p.361-368.
- MELHEM, T. S. (1978) Palinologia – suas aplicações e perspectivas no Brasil. Coleção Museu Paulista, série Ensaio.
- 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.
- MIRANDA, I., P. de A. (2003) Importância do estudo do pólen para apoiar programas de conservação da biodiversidade. In: Desafios da botânica brasileira no novo milênio: Inventário, sistematização e conservação da diversidade vegetal. Jardim, M.A.G.
- MIRANDA, J. E. C. de; CRUZ, D. C.; COSTA, C. P. da (1988) Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) pela divergência genética dos progenitores. *Ver. Brasil. Genet.* 11, 4, 929-937.
- MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- MOORE, P. D., WEBB, J. A. (1978) An illustrated guide to pollen analysis. 1.ed. New York: A Halsted Press Book, 133p.
- MOREIRA, G. R, CALIMAN, F. R. B., SILVA, D. J. H., RIBEIRO, C. S. C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, v.27, n. 235, p. 16-29.
- MOREIRA, B. A.; BARROS, M. A. V. C.; WANDERLEY, M. G. L. (2005) Morfologia polínica de algumas espécies dos gêneros *Neoregelia* L.B. Sm. e *Nidularium* Lem. (*Bromeliaceae*) do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta bot. bras.* 19(1): 61-70.

- MOSCONE, E. A., SCALDAFERRO, M. A., GRABIELE, M., CECCHINI, N. M., GARCÍA, Y. S., JARRET, R., DAVIÑA, J. R., DUCASSE, D. A., BARBOZA, G. E., EHRENDORFER, F. (2007) The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a Cytogenetic Perspective. VIth International Solanaceae Conference, Eds.: D.M. Spooner *et al.*, Acta Hort. 745, p. 137-169.
- MOSCONE, E. A.; BARANY, M.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; EHRENDORFER, F.; HUNZIER, A. (2003) Analysis of Nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany* 92: 21-29.
- MOSCONE, E. A., LAMBROU, M., EHRENDORFER, F. (1996). Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 202: 37-63.
- MOSCONE, E. A. (1993) Estudios cromosômicos en *Capsicum* (Solanaceae) II. Analisis cariotípico de *C. parvifolium* y *C. annum* var. *annuum*. *Kurtziana* 22: 9–18.
- MUÑOZ, A. M, CAETANO, C. M., VALLEJO, F. A., SANCHEZ. M. S. (2006) Comportamiento meiótico y descripción morfológica del polen de pronto alivio. Artigo derivado da ACCEPT.em 12-05-06.
- NASCIMENTO, W. M., DIAS, D. C. F. S., FREITAS, R. A. F. (2006) Produção de sementes de pimentas. Informe agropecuário, v. 27, n. 235, p. 30-39.
- NASCIMENTO, I. R.; MALUF, W. R.; FARIA, M. V.; VALLE, L. A. C.; MENESES, C. B.; BENITES, F. R. G. (2004) Capacidade combinatória e ação gênica na expressão de caracteres de importância econômica em pimentão. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 28, n. 2, p. 251-260.
- OLIVEIRA, M. S. P., MAUÉS, M. M., KALUME, M. A. (2001) Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de Açaizeiro. *Acta bot. Brás.* 15(1): 27-33.
- 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*, Brasília, v. 17, n. 1, p. 19-24.
- OLIVEIRA, E.J. de. (1989) Análise multivariada no estudo da divergência genética entre cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Viçosa: UFV, 91p. Dissertação de Mestrado.

- PAGLIARINI, M. S., POZZOBON, M. T. (2004) II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.
- PARAN, I.; AFTERGOOT, E.; SHIFRISS, C. (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99:167-173.
- PICKERSGILL, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp., *Euphytica*, Volume 96, Issue 1, Jan 1997, Pages 129-133
- PICKERSGILL, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In T. Tsuchiya and P.K. Gupta, Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B, 139-160. Elsevier: Amsterdam.
- PICKERSGILL, B. (1971) Relationship between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers, (genus *Capsicum*). *Evolution*, v. 25, p. 683-691.
- POZZOBON, M. T.; WITTMANN, M. T. (2006) A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). *Cytologia* 71(3): 275–287.
- 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? *Bot. J. Linn. Soc.* 151:259–269.
- 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 pepper cultivars. *Genome*, v. 38, p. 224-231.
- PUNT, W., BLACKMORE, S., NILSSON, S.; LE THOMAS, A. (1994) Glossary of pollen and spore terminology. Utrecht, L.P.P. Foundation.
- RAYNAL, A.; RAYNAL, J. (1971) Une technique de préparation des grains de pollen fragiles. *Adasonia* ser. 2, 11: 77-79.
- RAYNOR, G. S.; COHEN, L. A.; HAYES, J.; OGDEN, E. (1966) Dyed pollen grains and spores as tracers in dispersion and deposition studies. *Journal of applied meteorology*. V. 5, p. 728-729
- REIFSCHNEIDER, F. J. B. (2000) *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília. 113p.

- 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.
- REITSMA, T. (1970) Suggestions towards unification of descriptive terminology of angiosperms pollen grains. *Rev. Paleobot. Palynol* 10: 39-60.
- RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. (2002) Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of *Rotuma* Island. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 20:30-33.
- RIVA, E. M., RODRIGUES, R., SUDRÉ, C. P., PEREIRA, M. G., VIANA, A. P., AMARAL JÚNIOR, A. T. (2007) Obtaining pepper F2:3 lines with resistance to the bacterial spot using the pedigree method. *Horticultura Brasileira*, 25: 567-571.
- RODRIGUES, L. R.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. (2004) Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. *Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences - Porto Alegre*, V. 2 n. 3/4 p. 159-167
- RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. (2000) A new procedure to asses pollen viability. *Sex Plant Reprod.* 12:241-244.
- RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe agropecuário*, v. 27, n. 235, p. 7-15.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L. (1973) Contribuição à palinologia dos cerrados. *Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro.
- SANTOS, E. K.; ZANETTINI, M. H. B. (2002) Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n.1, p. 165-173.
- SANTOS, R. C.; MOREIRA, J. A. N., FARIAS, R. H., DUARTE, J. M. (2000) Classificação de genótipos de amendoim baseada nos descritores agromorfológicos e isoenzimáticos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.1, p.55-59.
- SCHUELTER, A. R. (1996) Análise isozimática, dialélica e diversidade genética em pimenta silvestre (*Capsicum flexuosum* Sendt.). *Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento*. Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG. 80p.

- SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. (1992) *Pollen biology*. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer- Verlag, Berlin/Heidelberg
- SHIVANNA, K.R.; JOHRI, B.M. (1985) *The angiosperm pollen:structure and function*. New Dehli: Wiley Eastern Ltd.
- SILVA, D. J. H. (2004) Pesquisa com *Capsicum* sp nas Universidades brasileiras. In: Encontro Nacional do Agronegócio Pimenta (*Capsicum* spp), 1, Brasília, DF, CD-ROM, 9p.
- SILVA, N. S.; CARVALHO, A. M. V.; SANTOS, F. A. R. (2003) Morfologia polínica de doze espécies de *Cestrum* L. (Solanaceae) da mata higrófila na Bahia, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, v. 25, no. 2, p. 439-443.
- SOLER J. B.; NOLLA J. M. R. (2002) Introducción. In: Valero-Santiago AL, Cadahia-García A (Eds): *Polinosis, Polen y Alergia*, 7-16. MRA ediciones, España.
- SOUZA, S. A. M. (2008) Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.
- STACE, C. A. (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. *Taxon*, v. 49, p. 451-477.
- STONE, J.L., THOMSON, J.D., DENT-ACOSTA, S.J. (1995) Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *Am. J. Bot.* 82:1186-1197.
- SUDRÉ C. P; CRUZ C. D; RODRIGUES R; RIVA E. M; AMARAL JÚNIOR A. T; SILVA DJH; PEREIRA T. N. S. (2006) Variáveis multcategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. *Horticultura Brasileira*, 24: 88-93.
- 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 (1):22-27.
- TAKAHASHI, M. (1983) Pollen Morphology in Asiatic Species of *Trillium*. *Bot. Mag. Tokyo* 96: 377-384.
- TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F.; GELINSKI, V. V. (2001) Catálogo polínico do parque estadual de Vila Velha, Paraná – 2ª parte. *Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences*, 7 (1): 7-18.

- TECHIO, V. H., DAVIDE, L. C., PEDROZO, C. A., PEREIRA, A. V. (2006) Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Sci. Biol. Sci.*, v. 28, n. 1, p. 7-12.
- TEIXEIRA, R. (1996) *Diversidade em Capsicum: análise molecular, morfoagronômica e química*. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, p.81.
- TONG, N.; BOSLAND, P. W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109
- VIÑALS, F.N.; ORTEGA, R.G. E GARCIA, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- WODEHOUSE, R. P. (1935) *Pollen grains, their structure, identification and significance in science and medicine*. McGraw-Hill, New York.