

ESTUDOS REPRODUTIVOS EM *Capsicum*: ANÁLISE MEIÓTICA  
DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO E EFEITO DA TEMPERATURA NO  
CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO

**NÁDIA FERNANDES MOREIRA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2015

ESTUDOS REPRODUTIVOS EM *Capsicum*: ANÁLISE MEIÓTICA  
DE HÍBRIDO INTERESPECÍFICO E EFEITO DA TEMPERATURA NO  
CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO

**NÁDIA FERNANDES MOREIRA**

“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.”

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

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO – 2015

ESTUDOS REPRODUTIVOS EM *Capsicum*: ANÁLISE MEIÓTICA DE  
HÍBRIDO INTERESPECÍFICO E EFEITO DA TEMPERATURA NO  
CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO

**NÁDIA FERNANDES MOREIRA**

“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 30 de março de 2015.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Ana Paula Candido Gabriel Berilli (D. Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) – IFES

---

Profa. Rosana Rodrigues (D. Sc. Produção Vegetal) – UENF

---

Dra. Cláudia Pombo Sudré (D. Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

---

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

À minha mãe, Sara, com todo o meu amor.

À minha irmã Bárbara.

Ao Lucas, pelo apoio e incentivo em minhas escolhas.

Dedico

***“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores...  
Tornam-se seu destino”***

***(Mahatma Gandhi)***

## **AGRADECIMENTO**

A Deus, por guiar meus caminhos, todas as vezes que coloquei minha vida em suas mãos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa.

À minha querida mãe, à minha irmã e aos meus familiares, pelo imenso apoio e incentivo a cada conquista. As motivações foram o que me impulsionaram a chegar até este momento único na minha jornada acadêmica e, sem vocês, tenho certeza de que tudo seria mais árduo.

Ao Lucas, pelo carinho, companheirismo e paciência durante toda esta etapa.

À minha orientadora, Telma Nair Santana Pereira, que me acolheu, que sempre acreditou que eu poderia fazer sempre mais e melhor, me dando a oportunidade de concretizar meu objetivo.

Aos docentes do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF pelos ensinamentos concedidos durante toda a realização do curso, bem como ao professor Derly José Henriques da Silva, da UFV, por sempre me incentivar a dar continuidade aos meus sonhos.

Ao José Daniel, secretário, pela dedicação e comprometimento que tem com cada aluno do programa.

Aos técnicos da UAP, pela disponibilidade em ajudar nos trabalhos.

Aos técnicos do LMGV que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível.

À minha querida amiga, Talitha Mayumi que esteve sempre ao meu lado nos últimos anos, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos da UENF, em especial Alinne, Camila, Jocarla, Elba, Milene e Kellen pelo companheirismo, pelos ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos da UFV e as HOMOGÊNEAS, amigas de infância, pela amizade dedicada sempre, mesmo na distância do dia-a-dia.

Aos amigos que fiz em Campos, pelos momentos divertidos e pelo apoio nos momentos difíceis.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. CAPÍTULOS.....	4
3.1. ANÁLISE MEIÓTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ENTRE <i>Capsicum frutescens</i> e <i>Capsicum chinense</i> .....	4
3.1.1. INTRODUÇÃO .....	4
3.1.2. REVISÃO .....	6
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1.5. CONCLUSÃO.....	20
3.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM PIMENTÃO .....	21
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	21
3.2.2. REVISÃO .....	23
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.2.5. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## RESUMO

MOREIRA, Nádia Fernandes; M.Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março, 2015; Estudos reprodutivos em *Capsicum*: análise meiótica de híbrido interespecífico e efeito da temperatura no crescimento do tubo polínico. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Messias Gonzaga Pereira e Rosana Rodrigues.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a relação genética entre as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* via comportamento meiótico do híbrido interespecífico obtido entre as espécies; e avaliar o efeito da temperatura sobre a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínica *in vivo* em pimentão variedade Casca Dura Ikeda (*Capsicum annum* var. *annuum*). Para a análise meiótica do híbrido, botões foram coletados e fixados por 24 horas em etanol: ácido acético (3:1), e conservados em etanol 70% no freezer. O preparo das lâminas para a meiose foi realizado via maceração (*squash*) conforme protocolo do laboratório. Anormalidades meióticas foram registradas à medida que ocorressem e foram estimados o índice meiótico (IM) e a viabilidade polínica. A meiose do híbrido foi normal, sendo observados 12 bivalentes na diacinese, e poucas anomalias meióticas. O IM foi de 88,2% e a viabilidade polínica foi de 72,5%. Considerando-se os resultados, conclui-se que as espécies apresentam uma proximidade genética, em função do perfeito pareamento dos cromossomos. Esses resultados estão de acordo com a literatura que classifica as duas espécies no mesmo complexo gênico, o complexo *annuum*. Na avaliação do efeito da temperatura na

germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico *in vivo*, botões na pré-antese foram protegidos com saco de papel e etiquetados com fio de lã vermelha pela manhã. Para cada temperatura testada foram coletados 20 pistilos vinte e quatro horas após a abertura floral. Dos 20 pistilos, 10 foram colocados em placa de Petri em BOD nas temperaturas teste (10°, 30° e 40°C), e os outros 10 pistilos foram colocados a 25°C (controle) em outra BOD, onde permaneceram por mais 24h. Após esse período de incubação, os pistilos foram amaciados em NaOH 8M por 8 horas. Em seguida, estes pistilos foram, cuidadosamente, lavados por 5 vezes em água destilada. Por último, o material foi colocado em frascos de vidro escuro de 20 mL recoberto com papel alumínio, com o corante anilina azul 1% e deixados a temperatura ambiente por 4 horas. Após esse procedimento, os pistilos foram observados em microscopia óptica de fluorescência, usando o filtro de emissão de ultravioleta de 509 nm e 370nm de excitação (Olympus BX60), e as imagens foram capturadas com o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, Media Cybernetics). A avaliação constou da observação da germinação do grão de pólen no estigma e do crescimento do tubo polínico *in vivo* ao longo do estilete nas diferentes temperaturas comparadas ao controle. A germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico *in vivo*, foram observados nas três temperaturas estudadas; embora, não tenha sido mensurado o comprimento do tubo polínico, houve diferenças de crescimento em função da temperatura. Nas temperaturas de 10°C e 40°C, observou-se que o grão de pólen germina, mas em menor quantidade e o crescimento do tubo polínico é desordenado em relação ao controle, indicando que a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico é afetada pela temperatura. A 30°C, a germinação do grão de pólen foi considerável e o crescimento do tubo polínico foi contínuo quando comparado ao controle. Portanto, conclui-se que 30°C foi a temperatura mais indicada para a germinação e crescimento do tubo polínico em pimentão, e que temperatura alta (40°C) e baixa (10°C) influenciam a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico em pimentão.

## ABSTRACT

MOREIRA, Nádia Fernandes; M.Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, March, 2015; Reproductive studies in *Capsicum*: meiotic analysis of interspecific hybrid and effect of temperature on germination and pollen tube growth in pepper. Advisor: Telma Nair Santana Pereira; Committee members: Messias Gonzaga and Rosana Pereira Rodrigues.

The objectives of this study were to analyze the genetic relationship between *C. frutescens* and *C. chinense* based on the meiotic behavior of interspecific hybrid obtained by crossing between the species, and to evaluate the effect of temperature on *in vivo* germination of pollen grains and the pollen tube growth in pepper variety Casca Dura Ikeda (*Capsicum annum* var. *annuum*). For meiotic behavior, flower buds were fixed for 24 hours in ethanol: acetic acid (3:1) and then stored at 70% ethanol in freezer. The slide preparation was done by squashing according to the laboratory protocol. Meiotic abnormalities were registered as much as they occur and the meiotic index (MI) and the pollen grain viability were also estimated. The hybrid meiosis was normal being observed 12 pairs bivalents in diakinesis and a few meiotic abnormalities were observed. The MI was 88.2% and the pollen viability was 72.5%. Considering the results, it might be concluded that the two species are genetically close, due to their perfect chromosome pairing; these results are consistent with the literature that classify the two species in the same complex gene, the *annuum* complex. To evaluate the effect of temperature on *in vivo* pollen germination and pollen tube growth, flower buds at pre-anthesis were protected with paper bag and tagged with red woolen in the

morning. Twenty-four hours after flower opening, 20 pistils were collected, which 10 were placed in Petri dishes in the BOD test temperatures (10 °C, 30 °C and 40°C) for 24h, and the other 10 pistils were placed at 25°C (control) in another BOD, for 24h. After that, the pistils were fixed in FAA solution (Formalin, Acetic Acid and Ethanol) for 24h. Subsequently, the pistils were transferred to 70% ethanol solution for at least 4 hours. After that, the pistils were softened in 8 M NaOH for 8 hours, and then they were washed 5 times in distilled water. Finally, the material was placed into the 1% aniline blue dye solution at room temperature for 4 hours. Later, the slides were prepared and observed in optical fluorescence microscopy, using the ultraviolet emission filter of 509 nm and 370 nm excitation (Olympus BX60). The images were captured using Image-Pro Plus software (version 5.1, Media Cybernetics). The evaluation consisted of observing *in vivo* germination of pollen grain; even though it was not measured the pollen tube, there was difference in the growth due to temperature. *In vivo* germination of pollen grain, was observed at in all temperatures studied. At temperatures of 10°C and 40°C, the pollen grain germinates, but in smaller quantities and the pollen tube growth was disordered compare to the control, indicating that the germination of pollen grains and growth the pollen tube is affected by temperature. At 30° C, the pollen grain germination was considerable and the pollen tube growth was continuous compared to control. Therefore, it is concluded that, 30°C is the temperature most suitable for the *in vivo* germination of pollen grain and pollen tube growth on pepper, and high (40°C) and low (10°C) temperatures are harmful to the *in vivo* germination of pollen grains and pollen tube growth in peppers.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, estima-se que o cultivo de hortaliças ocupou em 2011 uma área de aproximadamente 809 mil hectares, que produziram cerca de 19 milhões de toneladas (Embrapa, 2012). O cultivo de pimentas está difundido em todas as regiões do país, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (Costa et al., 2010). O Brasil é considerado um centro de diversidade do gênero *Capsicum*, abrigando espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres. Dentre as domesticadas, *C. chinense* e *C. frutescens* tem na Amazônia o seu centro de origem (Moscone et al., 2007).

O melhoramento de pimentão, espécie mais cultivada pode ser realizada via hibridação interespecífica, em se tratando, sobretudo da transferência de genes responsáveis pela resistência a patógenos. No entanto existe o desafio de se selecionar características de fruto e resistência ao mesmo tempo (Pickersgill, 1997). Wahid et al. (2007) afirmam que os melhoristas têm como desafio, a identificação de germoplasma e obtenção de variedades tolerantes a altas temperaturas.

De acordo com o quinto relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2013), com base na revisão de milhares de pesquisas realizadas nos últimos cinco anos, mostra que a temperatura do planeta poderá aumentar até 4,8°C neste século, o que deve gerar grande impacto nos ecossistemas de todo o planeta. Alguns estudos têm mostrado o efeito que o aquecimento global tem sobre a produtividade de determinadas culturas, e uma compreensão completa das respostas fisiológicas das plantas às

temperaturas elevadas, dos mecanismos de tolerância ao calor e possíveis estratégias para melhorar essa tolerância são indispensáveis (Wahid et al., 2007).

Pequenos aumentos na temperatura podem interferir na viabilidade polínica, na capacidade germinativa e nas taxas de crescimento do tubo polínico (Hedhly et al., 2008). Em *Capsicum*, a temperatura em torno de 41°C, além de interferir na germinação do pólen e no crescimento do tubo polínico (Reddy e Kakani, 2007; Kafizadeh et al., 2008), também pode afetar as flores (Erickson e Marhart, 2002) e os frutos (Pagamas e Nawata, 2008) das diferentes espécies.

Após a identificação de um germoplasma tolerante a altas temperaturas, o melhorista terá que transferir este gene via hibridação interespecífica. Considerando que o gênero tem cinco espécies domesticadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens*, o melhorista deverá partir destas espécies. Entretanto, nem sempre o melhorista é bem sucedido na hibridação interespecífica em *Capsicum* dependendo das espécies envolvidas no cruzamento, pois essas espécies são agrupadas em complexos gênicos distintos com base na obtenção de híbridos férteis. Sabe-se que quanto mais próximas geneticamente são as espécies envolvidas, maior a homologia cromossômica entre elas, maior a chance de sucesso na obtenção do híbrido e, conseqüentemente, mais normal será a formação dos gametas desse híbrido que se dá via meiose (Singh, 2002).

A meiose é o mecanismo biológico que reduz a metade o número cromossômico de um indivíduo ou organismo. O curso normal da meiose garante a fertilidade do gameta. Porém, esse evento sofre influência genética, bem como ambiental, pois irregularidades como cromossomos pegajosos ou cromossomos retardatários podem ocorrer devido a altas temperaturas ou a presença de genes mutantes na espécie (Kaul e Murthy, 1985). Essas irregularidades podem gerar produtos pós-meióticos anormais com gametas não reduzidos ( $2n$ ), ou gametas aneuploides o que poderá causar a infertilidade da planta (Pagliarini, 2000).

Esta pesquisa relata resultados de dois estudos, sendo o primeiro sobre a análise da relação genética de *Capsicum frutescens* e *Capsicum chinense* baseada no comportamento meiótico do híbrido interespecífico obtido do cruzamento entre as espécies supracitadas; e o segundo estudo, avalia o efeito da temperatura na germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico *in vivo* em *Capsicum annuum*.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa foram:

- i) Analisar a relação genética entre *Capsicum frutescens* e *Capsicum chinense* baseada no comportamento meiótico do híbrido interespecífico obtido entre essas espécies;
- ii) Avaliar o efeito de três temperaturas (10°C, 30°C, e 40°C) sobre a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico *in vivo* em pimentão (*Capsicum annuum* var. *annuum*).

### 3. CAPÍTULOS

#### 3.1. ANÁLISE MEIÓTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS ENTRE *Capsicum frutescens* E *Capsicum chinense*

##### 3.1.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* pertencente à família Solanaceae, representado por pimentões e pimentas, possui 38 espécies (Moscone et al., 2007; Barbosa et al, 2011), sendo cinco delas classificadas como domesticadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens* diferenciadas por suas características botânicas intrínsecas, sobretudo relacionadas à cor, ao número e à posição floral (Pickersgill 1997; Carrizo et al., 2013).

Em *Capsicum* é observada uma grande variação nos frutos, indo desde variação nos formatos, tamanhos, cores e sabores de fruto, assim como os diferentes graus de pungência, arquitetura de planta e composição nutricional (Bosland e Votava, 1999).

Dentro do gênero, as espécies podem ser distintas, de acordo com o número básico de cromossomos, em dois grupos: um com  $n=x=12$  e o outro grupo com  $n=x=13$  cromossomos (Moscone et al., 2007).

Harlan e De Wet (1971) estabeleceram um sistema conhecido como complexo gênico, que organiza os vários tipos de germoplasma sob a visão do melhorista. Os autores propuseram três categorias de complexo gênico com base na facilidade de cruzamento entre as espécies e fertilidade do híbrido: Complexo gênico primário, complexo gênico secundário, complexo gênico terciário. Em *Capsicum* as espécies são agrupadas em três complexos, com base na obtenção de híbridos férteis. O complexo *Capsicum annuum* reúne as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* e suas formas botânicas; o complexo *Capsicum baccatum* reúne *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *pendulum*, e o complexo *Capsicum pubescens* reúne espécies silvestres e apenas uma cultivada, *C. pubescens* (Pickersgill, 1991).

Os cruzamentos interespecíficos podem permitir o melhoramento de variedades pela introdução de importantes alelos, como os de resistência a patógenos (Pickersgill, 1997). Entretanto, para que seja bem sucedida a transferência de genes entre diferentes espécies, é necessário que as mesmas sejam geneticamente próximas, ou seja, apresentem certa homologia cromossômica, minimizando os problemas de incongruidade e, desse modo, viabilizando o híbrido (Prestes e Goulart, 1995). Além disso, é imprescindível o conhecimento sobre a direção do cruzamento, uma vez que, em algumas espécies, o cruzamento interespecífico é efetivo e exclusivo de uma determinada direção (Prestes e Goulart, 1995).

Espécies silvestres são consideradas repositórios de genes e, via hibridação interespecífica, tem sido possível o melhoramento de muitas variedades de culturas agronomicamente importantes (Hajjar & Hodgkin, 2007). Contudo, considerando o grande número de espécies em coleções de germoplasma, o emprego destas em programas de melhoramento genético ainda é incipiente e isso se deve provavelmente à existência de barreiras pré e pós-fertilização.

Híbridos interespecíficos podem ser obtidos entre as espécies domesticadas do gênero *Capsicum*, porém estes apresentam graus variados de fertilidade, o que pode ser devido a problemas de pareamento dos cromossomos no híbrido ou devido à presença de diferentes arranjos estruturais cromossômicos (Kumar et al. 1987; Lanteri e Pickersgill, 1993). De acordo com Shifriss (1997) o grau de macho esterilidade de híbridos interespecíficos de *Capsicum* depende

dos acessos usados no cruzamento. Monteiro et al. (2011) observaram que o grau de viabilidade de híbridos interespecíficos de *Capsicum* variou de alta, em combinações envolvendo *C. chinense* x *C. frutescens* à completa macho esterilidade ou inviabilidade do híbrido. Os autores também observaram que a viabilidade polínica do híbrido interespecífico dependeu dos acessos envolvidos na combinação, sendo essa viabilidade genótipo específica.

O conhecimento da fertilidade das espécies envolvidas em um programa de hibridação interespecífica é importante para que o melhorista possa ser bem-sucedido nos cruzamentos a serem realizados. A fertilidade de uma espécie, geralmente medida via viabilidade polínica, é consequência da formação de gametas normais e balanceados. De acordo com Defani-Scoarize et al. (1996), o sucesso da hibridação, tanto intra quanto interespecífica, em termos genéticos, também é determinada por uma meiose regular, resultando na formação de gametas viáveis.

Considerando a importância de avaliar a fertilidade de híbridos interespecíficos obtidos entre *C. frutescens* (UENF 1636) e *C. chinense* (UENF 1785), e dar sequência a pesquisas futuras com os mesmos. O presente estudo teve por objetivos analisar a meiose de um híbrido interespecífico; e estimar a viabilidade polínica e o índice meiótico deste híbrido.

### **3.1.2. REVISÃO**

#### **3.1.2.1. Importância econômica e nutricional**

No Continente Asiático, seguido pelos continentes Africano e Americano está concentrado cultivo das pimentas. Dentre os países com maior produção mundial destacam-se a China, seguida pelo México, Peru e Indonésia (FAOSTAT, 2013). Em se tratando de Brasil, a produção de pimentas tem crescido consideravelmente, tanto por suas características de rentabilidade, sobretudo quando há agregação de valor ao produto, quanto por sua importância social, por empregar elevado número de mão de obra, principalmente na época da colheita e processamento (Pinto e Silva, 2006).

O cultivo de pimentas e pimentões concentram-se nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, tendo os Estados de Goiás, Minas Gerais, Bahia e São Paulo como principais produtores. O Estado do Rio de Janeiro possui uma produção bem menor quando comparado com outros estados produtores, no entanto, esse mercado vem crescendo, conforme dados das Centrais de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro (CEASA-RJ, 2008).

O cultivo de pimentas é um importante segmento econômico no agronegócio brasileiro, o mercado dessa hortaliça vem se destacando ao longo dos anos devido à versatilidade de suas aplicações na culinária, na indústria, nos produtos medicinais e no mercado ornamental (Rufino e Penteado, 2006; Sudré et al., 2010). A produtividade das pimentas do gênero *Capsicum*, contudo, é bastante variável, principalmente em razão do tipo ou da variedade de pimenta cultivada, do nível tecnológico adotado pelo produtor, bem como da região e do período de cultivo, sendo a agricultura familiar, a principal responsável no Brasil pela expansão da área cultivada de pimentas (Finger et al., 2012; Moura et al., 2013). Em termos nutricionais, as pimentas são fontes de vitaminas A, B1, B2 e C, quando consumidas *in natura*. As pimentas de cor vermelha são ricas em carotenóides (Zancanaro, 2008).

Os frutos são consumidos na alimentação como condimento tanto na forma *in natura* quanto em conservas. Além disso, podem ser utilizados em outros setores industriais, como no mercado farmacêutico, medicinal e ornamental (Carvalho et al., 2006). As pimentas vêm sendo muito utilizadas como repelentes contra roedores que danificam cabos elétricos subterrâneos, percevejos, assim como *spray* de pimenta contra assaltos (Bosland, 1996).

### **3.1.2.2. O gênero *Capsicum***

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae sendo representado pelas pimentas e pimentões (Eshbaugh, 1993). A maioria das espécies de *Capsicum* são auto compatíveis com exceção da *C. cardenasii*, cuja incompatibilidade é do tipo gametofítica, encontrada em muitos outros gêneros de Solanaceae (Pickersgill, 1991). Segundo Barbosa et al. (2011), dentre as 38 espécies já identificadas cinco delas são cultivadas e utilizadas pelo homem: *C. annuum var. annuum*; *C. baccatum var. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens* (Moscone et al., 2007; Pickersgill, 1991; Belletti et al., 1998).

De acordo com Moscone et al. (2007) estudando a origem e evolução do gênero *Capsicum* com base em dados citológicos de dezenove espécies de *Capsicum* sugere ser a espécie *C. chacoense* o ancestral das espécies estudadas, sobretudo devido a presença de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) ativos em citótipos de *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*.

O gênero se originou na Bolívia, possuindo a espécie *Capsicum chacoense* como ancestral comum, que posteriormente passou por um processo de dispersão e especiação para os Andes e terras baixas da Amazônia (McLeod et al., 1982; Moscone, et al., 2007).

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

### **3.1.2.3. Aspectos botânicos e reprodutivos**

O gênero *Capsicum* é classificado como uma Angiosperma, Dicotyledonea, que pertence à divisão Magnoliophyta, ordem Solanales, família Solanaceae, subfamília Solanoideae e tribo Solaneae (Vinãls et al., 1996). As plantas são cultivadas como anuais (Filgueira, 2000), contudo existem espécies anuais, bienais e perenes (Bosland, 1996). As plantas têm altura e forma de desenvolvimentos variáveis, em função do genótipo e das condições de cultivo (Vinãls et al., 1996).

O gênero *Capsicum* apresenta flores hermafroditas, com cinco anteras e um único estigma. O comprimento do estilete varia entre as espécies e o estigma encontra-se receptivo na fase de botão, assim como duas a três horas após a abertura da flor (Casali e Couto, 1984). A espécie *C. annuum*, na qual está presente o pimentão, pode ser identificada por possuir flor isolada em cada nó, corola de cor branca leitosa, sem manchas difusas na base das pétalas e antera azul ou arroxeadas (Vinãls et al., 1996).

A espécie *C. frutescens*, cujo exemplar mais conhecido é a pimenta malagueta, pode ser distinguida das outras espécies por conter de duas a cinco flores por nó, corola paleácea ou branco-esverdeada e por ser altamente ramificada (Vinãls et al., 1996). Na espécie *C. chinense* tem-se a pimenta-de-cheiro, pimenta-de-bode, murici e a habanero (Albrecht et al., 2012), as quais apresentam frutos com uma constrição anular na junção do cálice com o pedicelo.

As plantas do gênero *Capsicum* são consideradas autógamas, porquanto nas espécies cultivadas o estigma encontra-se na mesma altura das anteras, o que aumenta a chance de autopolinização, a qual se encontra em torno de 95% (Pickersgill, 1991). Todavia, segundo Pickersgill (1997) em espécies silvestres, como *C. cardenasii*, é possível obter-se taxa de cruzamento de 90% devido, por exemplo, à presença de estilete mais comprido ultrapassando a altura das anteras, o que dificulta autopolinização e aumenta a possibilidade da ocorrência de polinização cruzada.

#### 3.1.2.4. Complexos gênicos

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

O gênero *Capsicum* é classificado em três complexos gênicos: O Complexo *annuum* (CA) contém *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. galapagoense*. O complexo *baccatum* (CB) contém *C. baccatum*, *C. praetermissum*, e *C. tovarii*. O complexo *pubescens* (CP) consiste de *C. pubescens*, *C. cardenasii*, e *C. eximium* (Pickersgill, 1991; Zijlstra et al., 1991). O cruzamento interespecífico entre espécies de um mesmo complexo é tido como

possível, o mesmo não acontece para cruzamento entre espécies de complexos diferentes em que podem ocorrer barreiras de pré e pós-fertilização.

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

### **3.1.2.5. Melhoramento de pimentas do gênero *Capsicum***

Os programas de melhoramento com o gênero *Capsicum* vem sendo conduzidos há tempos, principalmente por instituições públicas (Ribeiro e Cruz, 2002). Diversas cultivares desenvolvidas foi e continua sendo utilizadas devido sua grande importância no âmbito nacional, principalmente visando à resistência a doenças e o aumento da produtividade (Ribeiro e Cruz, 2002).

Dentre os programas de melhoramento de *Capsicum*, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem trabalhando no desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças e, recentemente, visando obter cultivares adaptadas para atender ao mercado ornamental (Rodrigues et al., 2014).

Os programas de melhoramento são responsáveis por sanar a necessidade de cultivares mais adaptadas, responsivas às condições climáticas e que atendam as demandas do mercado, sendo indispensável o uso de estratégias, como a hibridação, que promovam o desenvolvimento de novos produtos (Maluf, 2001).

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

A hibridação interespecífica permite a transferência de genes de interesse agrônomico entre espécies distintas, principalmente aqueles envolvidos na resistência a doenças, permitindo ao melhorista desenvolver genótipos superiores (Bosland e Votava, 2000). A introdução de genes que conferem resistência a doenças em *C. annuum*, a partir de outras espécies do gênero, é uma das mais bem sucedidas aplicações da hibridação interespecífica dentro do gênero para o melhoramento da cultura (Russo, 2012). Por exemplo, a introgressão de genes de resistência ao TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) de *C. chinense* e *C. chacoense* para *C. annuum* (Pickersgill, 1997).

Dentro do gênero *Capsicum*, o cruzamento entre espécies diferentes tem sido realizado com graus de sucesso variados (Monteiro, 2011; Martins, 2014). Limitações ocorrem devido a problemas como incompatibilidade unilateral e aborto das sementes (Pickersgill, 1997). A incompatibilidade unilateral ocorre quando, em um cruzamento recíproco, o tubo polínico atinge e fertiliza o óvulo em uma direção do cruzamento, mas é inibido no estigma, estilete ou ovário na outra direção.

Esse tipo de barreira ocorre no gênero *Capsicum* entre o complexo *C. pubescens* e em todas as demais espécies do gênero. Como resultado, os tubos polínicos das espécies do complexo *C. pubescens* crescem, normalmente, através do estigma e estilete de outras espécies, porém o pistilo inibe o crescimento do tubo polínico de todas as outras espécies (Onus e Pickersgill, 2004). Fruto obtido via hibridações interespecíficas podem apresentar sementes inviáveis, porque a fertilização não ocorreu ou porque as sementes abortaram após a fertilização (Pickersgill, 1991).

No caso do aborto da semente, o endosperma se desenvolve de forma lenta, retardando o desenvolvimento do embrião. Como consequência, cerca de duas semanas depois, o saco embrionário colapsa (Pickersgill, 1997). Yoon et al., (2006) afirmam que, em cruzamentos entre *C. annuum* x *C. baccatum*, o aborto do embrião ocorre 15 dias após a polinização; porém, eles conseguiram plantas híbridas, utilizando a técnica resgate de embrião e, posteriormente, usaram as plantas híbridas estéreis, como receptoras de pólen em retrocruzamentos, obtendo as gerações necessárias para a continuidade do programa de melhoramento.

### **3.1.2.7. Aspectos meióticos**

A meiose é um evento de elevada estabilidade durante o processo evolutivo, que resulta na redução do número de cromossomos (Pagliarini, 2000). O processo de divisão meiótica caracteriza-se por uma série de eventos sequenciais de elevada complexidade, tanto mecânica quanto bioquímica (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Os estudos citogenéticos do gênero *Capsicum* estão relacionados principalmente à determinação do número cromossômico para muitas espécies, e alguns autores tem encontrado diferenças em relação ao número básico de cromossomos dentro desse gênero, como Pozzobon et al.

(2006) que reportaram em *Capsicum*, espécies diplóides com número de  $2n=2x=24$  e  $2n=2x=26$  cromossomos. Segundo Moscone et al. (2007),  $n=12$  corresponde à condição ancestral em *Capsicum*, enquanto  $n=13$  teria surgido depois, na evolução do gênero, provavelmente devido a uma fissão cêntrica. Já Pozzobon et al. (2006) sugerem que a direção filogenética do número básico de cromossomos de *Capsicum* teria sido de  $n=13$  para  $n=12$  cromossomos devido à perda de um par de cromossomos.

Em *Capsicum*, são encontradas espécies diplóides com número de  $2n=2x=24$  e  $2n=2x=26$  cromossomos (Pozzobon et al., 2006). Segundo Moscone et al. (2007),  $n=12$  corresponde à condição ancestral em *Capsicum*, enquanto  $n=13$  teria surgido depois, na evolução do gênero, provavelmente devido a uma fissão cêntrica. Já Pozzobon et al. (2006) sugerem que a direção filogenética do número básico de cromossomos de *Capsicum* teria sido de  $n=13$  para  $n=12$  cromossomos devido à perda de um par de cromossomos.

A meiose, que resulta na formação de células haploides, é importante mecanismo por permitir a perpetuação do número de cromossomo original da espécie, recompondo após a fecundação, o número de cromossomos igual ao dos genitores. É durante a meiose que ocorre também a recombinação dos genes, evento de máxima importância na adaptação das populações e evolução (Guerra, 1986).

Os estudos meióticos são de grande relevância, pois explicam fenômenos reprodutivos, mecanismos de hereditariedade e de variabilidade genética nas espécies. Pois a meiose é a principal fonte de variabilidade genética através do mecanismo de recombinação genética e que pode ser utilizada pelos organismos na adaptação e na perpetuação da espécie (Caetano et al., 2003). A permuta ou recombinação genética é um evento que ocorre durante a meiose, mais precisamente na prófase I, e tem grande importância para o melhoramento, pois é durante tal processo que se tem a troca de alelos, o que pode gerar variabilidade.

O curso normal e harmonioso da meiose garante a viabilidade do gameta (Pagliarini, 2000); entretanto, os eventos da meiose são controlados por fatores genéticos, sendo assim, mutáveis e responsáveis por algumas das irregularidades meióticas (Kaul e Murthy, 1985), como os cromossomos retardatários (Consolaro et al., 1996) e o processo de orientação diferenciada das fibras do fuso acromático (Shamina, 2005).

Segundo Defani-Scoarize et al. (1996), as irregularidades meióticas são indesejáveis, pois alteram os genótipos, ocasionando a instabilidade meiótica, característica indesejada por dificultar trabalhos de hibridação em programas de melhoramento. A ocorrência dessas anomalias pode dificultar a produção de híbridos por ter como consequência a variação cromossômica em função da perda ou por ganho de cromossomos nas novas gerações além da redução ou perda da capacidade reprodutiva.

Love (1951), ao trabalhar com linhagens de trigo, estabeleceu o Índice Meiótico (IM) como forma de avaliação da estabilidade meiótica dos genótipos. Esse índice analisa a relação entre o número de produtos pós-meióticos normais, as tétrades com todos os produtos pós-meióticos formados como tétrades, tríades, díades, monades e políades. Para uma meiose normal, esperam-se maiores números de tétrades normais nos produtos pós-meiótico.

Dessa forma, genótipos que apresentam os índices meióticos abaixo de 90% descrevem uma espécie com baixa estabilidade meiótica. Isso sugere uma tendência para a ocorrência de anormalidades durante o processo de gametogênese, já as espécies portadoras de um índice superior a 90% são consideradas de alta estabilidade meiótica, sendo indicadas em programas de hibridação.

A normalidade da meiose gera gametas viáveis, e, normalmente, uma alta porcentagem de grãos de pólen também viáveis é esperada como resultado de um alto percentual de tétrades normais, as quais refletem um processo meiótico regular (Techio et al., 2006).

### **3.1.2.8. Viabilidade polínica**

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 porcentagem de frutos aumentam se uma quantidade de grãos de pólen viáveis acima do requerido for depositada sobre o estigma (Dafni, 1992).

Para Alexander (1980) estudos sobre a viabilidade polínica contribuem para estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a agricultura, para o planejamento de programas de melhoramento ou cultivo, e é muito empregada no monitoramento do grão de pólen armazenado,

de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial econômico com floração em épocas distintas.

Monteiro (2011) analisando a viabilidade polínica em híbridos  $F_1$  obtidos entre espécies domesticadas de *Capsicum* observou que a viabilidade polínica dos acessos de um modo geral foi alta (91,16%), com exceção da viabilidade polínica do acesso representante da espécie *C. pubescens*, com média de 27%. Os híbridos obtidos entre as espécies *C. chinense* Jacq e *C. frutescens* L apresentaram uma viabilidade polínica alta, em torno de 94%; enquanto que combinações híbridas envolvendo *C. baccatum* L var *pendulum* (UENF 1500) x *C. annuum* L var *glabriusculum* (UENF 1576), *C. frutescens* L x *C. baccatum* L var *pendulum* e *C. frutescens* L x *C. annuum* L var *glabriusculum* apresentaram viabilidade polínica baixa, inferior a 50%.

Fatores climáticos, como a temperatura baixa e a umidade relativa do ar, durante o florescimento, podem inibir a abertura das flores, prejudicando a germinação do grão de pólen e o desenvolvimento do tubo polínico, o que ressalta a importância de se estimar a viabilidade polínica das espécies, bem como de híbridos interespecíficos. Considerando a importância de se conhecer o potencial reprodutivo da planta, várias técnicas foram definidas visando sempre à eficiência do método em definir com rapidez e precisão a viabilidade polínica (Dafni, 1992). Um método comum para avaliar a viabilidade polínica é o método de coloração e contagem direta (Kelly et al., 2002). Os corantes nucleares e vitais mais utilizados são o corante de Alexander, acetocarmim, azul de anilina em lactofenol e sais do tetrazolio (Rodrigues-Riano e Dafni, 2000).

Techio et al. (2006) relatam que as análises usando a coloração tripla de Alexander parecem fornecer dados mais acurados sobre a viabilidade do grão de pólen, pois se obtém coloração diferencial dos grãos de pólen viáveis e inviáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam coloração reversa. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Desta maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos de pólen inviáveis coram-se de verde e os viáveis adquirem uma coloração púrpura (Alexander, 1980).

### 3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas plantas de um híbrido interespecífico obtidas entre acessos, UENF 1785 (*C. chinense*) e UENF 1636 (*C. frutescens*) (Martins et al. 2014). As sementes do híbrido 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 bandejas de isopor com substrato vegetal Vivatto® em casa de vegetação na UAP (Unidade de Apoio a Pesquisa) no campus da UENF. Quando as mudas estavam com quatro a seis folhas definitivas foram transplantadas da bandeja para copos de plástico de 500mL com substrato vegetal Vivatto®, em casa de vegetação na UAP (Unidade de Apoio a Pesquisa) da UENF. Cerca de dois meses após a germinação, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 5L, utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal, sendo conduzidas as 15 plantas do híbrido. Os tratos culturais foram empregados de acordo com as recomendações para a cultura (Filgueira, 2000).

Durante o período de floração, botões florais de diferentes tamanhos e em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados ao acaso em bulk, em quinze plantas do híbrido interespecífico e fixados solução de etanol: ácido acético, na proporção de 3:1, por 24h. Em seguida, foram transferidos para uma solução de álcool 70% e conservados em geladeira até serem utilizados. Para o preparo das lâminas, três anteras por botão floral, foram maceradas (*squash*) sobre a lâmina em gotas de carmim acético 1%, conforme protocolo rotineiro do laboratório. As lâminas assim preparadas foram observadas sob microscópio ótico, em campo claro, e as diferentes fases da meiose foram analisadas. Foram também registradas as possíveis anomalias meióticas como cromossomos retardatários, segregação precoce dos cromossomos, e problemas nas fibras do fuso.

Para a estimativa do índice meiótico (IM), conforme Love (1951), botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados na geladeira. No momento de preparo das lâminas, três anteras foram maceradas em solução de carmim acético 1% e observadas sob microscópio, sendo preparadas cinco lâminas. Para a estimativa do índice meiótico foram contados

os números de produtos pós-meióticos nas cinco lâminas analisadas, sendo contados 500 grãos de pólen num total de 1500 produtos pós-meióticos. O índice meiótico é estimado pela relação entre o total de tétrades normais e o total de produtos pós-meióticos. Tétrade com quatro núcleos do mesmo tamanho foi considerada normal e qualquer desvio (mônade, díade, tríade e políade) foi considerado anormal.

Índice Meiótico – IM  
(Love, 1951)

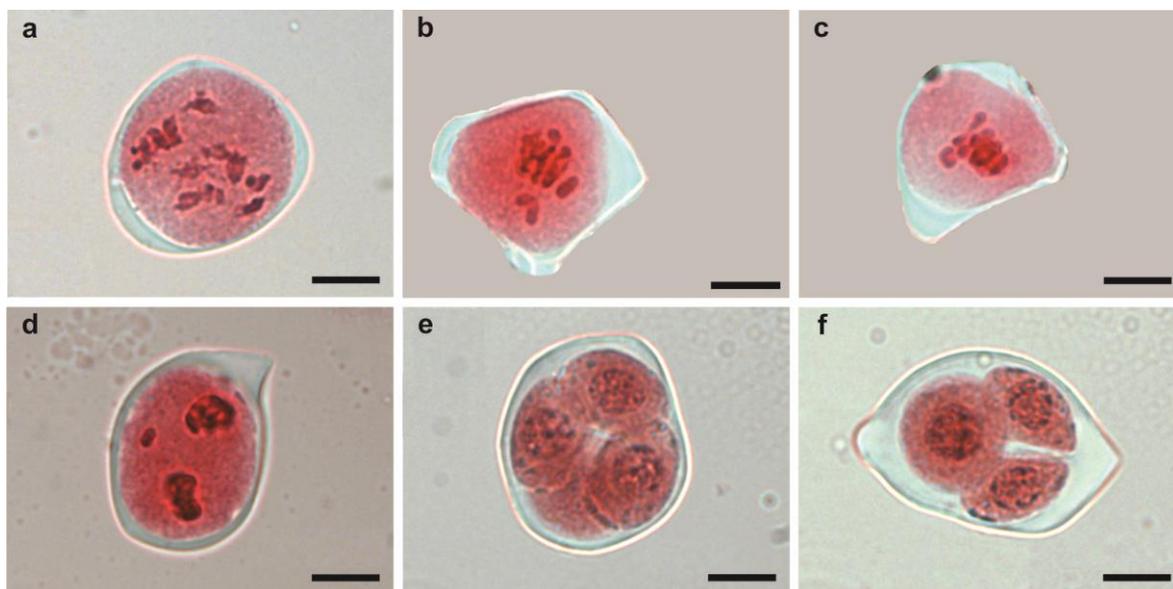
$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de tétrades normais}}{\text{N}^\circ \text{ total de produtos pós-meióticos}} \times 100$$

A viabilidade polínica dos acessos foi estimada via coloração tripla de Alexander (Alexander, 1969). Para tal, botões florais na antese foram coletados em solução de etanol 70% e conservados a 4°C. Na preparação das lâminas, as anteras foram maceradas em uma gota do corante, na qual os grãos de pólen viáveis coram-se de vermelho e os inviáveis de verde a fim de se obter uma amostragem ao acaso dos grãos de pólen corados. Foi utilizado o método de varredura, e foram feitas oito lâminas, sendo contados 250 grãos de pólen/lâmina. Todas as lâminas foram observadas sob microscópio óptico (Olympus BX60), e as imagens foram capturadas com o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, Media Cybernetics). A análise dos dados do índice meiótico foi realizada por intervalo de confiança para proporção com auxílio do programa EXCEL versão 2013.

### 3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise meiótica do híbrido permitiu observar 12 cromossomos em associação bivalente, em diacinese (Figura 1a), confirmando o que a literatura registra para as espécies parentais que são diplóides, com  $2n=2x=24$  cromossomos (Pozzobon et al., 2006; Moscone et al., 2007). Esse resultado está dentro do esperado já que as espécies parentais, *C. frutescens* e *C. chinense*, diferem apenas pela presença de uma constrição anular no cálice, característica da espécie *C. chinense* (IPGRI, 1995). Para alguns autores as duas espécies seriam na realidade uma única espécie, em função dos resultados de análise

morfológica (Pickersgill et al., 1979), análise enzimática (Jensen et al., 1979) e citogenética (Egawa e Tanaka, 1984). Porém, Baral e Bosland (2004), investigando a morfologia, cruzabilidade e o polimorfismo do DNA de acessos dessas duas espécies, concluíram que elas representam duas espécies distintas.



**Figura 1.** Fases observadas na meiose do híbrido interespecífico: a) Diacinese; b) Segregação cromossômica precoce; c e d) Cromossomos retardatários; e) Tétrades; f) Tríades. Barra = 10 $\mu$

Anormalidades meióticas foram observadas como segregação cromossômica precoce (Figura 1b) na segunda divisão meiótica, cromossomos retardatários (Fig. 1c e d) e a falta de sincronia. Normalmente os cromossomos retardatários são perdidos durante a divisão celular, gerando células filhas aneuploides. (Martins et al., 2010).

As anormalidades encontradas podem resultar em gametas desbalanceados ao final da divisão celular. De acordo com Pagliarini (2000), as anormalidades meióticas mais comuns observadas em diversas espécies é justamente a segregação cromossômica irregular, caracterizada pela migração precoce ou por cromossomos retardatários em metáfase I e em anáfase I. Tendo em vista que o comportamento meiótico de uma planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade, as alterações observadas durante a divisão celular poderão refletir-se na viabilidade dos grãos de pólen (Defani-Scoarize et al., 1996).

No híbrido analisado foi possível observar que a citocinese não foi simétrica, tendo ocorrido produtos pós-meióticos do tipo tríade (Figura 1f). No entanto, houve predominância de tétrades normais, o que é esperado ao final de uma divisão meiótica normal. Tríades podem ser originadas a partir de falhas ocorridas no momento da divisão do citoplasma durante a meiose I ou II e estão normalmente relacionadas com a formação de gametas não reduzidos, podendo ser assim relevante em se tratando de uma espécie que a poliploidia seja uma alternativa evolutiva (Pickersgill, 1997).

Todo o processo de divisão celular é governado por genes que podem se manifestar em qualquer fase da divisão meiótica. De acordo com Singh (1993) a maioria dos genes mutantes que ocasionam erros da meiose se manifesta no final da divisão – fase de tétrade e mitose dos grãos de pólen. Os genes mutantes que se manifestam na fase de tétrades são os que afetam a disjunção dos cromossomos, devido a erros no fuso acromático (Singh, 1993).

Love (1951) estabeleceu que plantas com índices meióticos abaixo de 90% são meioticamente instáveis, entretanto, o híbrido em estudo apresentou IM de 88,2%, o que o classificaria como um híbrido instável, porém a partir de um intervalo de confiança ( $\alpha=5\%$ ) de 93,63% (limite superior) a 82,77% (limite inferior); considerando que o IM médio foi de 88,2% o mesmo se encontra dentro do intervalo de confiança.

A formação do grão de pólen segue dois padrões de citocinese, determinados pelo momento em que ela ocorre durante a meiose. Na citocinese simultânea, nenhuma parede é formada depois da meiose I (Esau, 1977). Nesse caso, os micrósporos são arranjados em uma tétrade tetraédrica (Hesse et al., 2009), já na citocinese sucessiva uma parede é formada depois da primeira e da segunda divisão, levando à formação de vários tipos de tétrades (Schulz & Jensen, 1968). Conforme pode ser observado na figura 1d, em *Capsicum*, prevalece a citocinese do tipo simultânea, e o arranjo das tétrades é do tipo tetragonal (Esau, 1977).

Observou-se também que ocorre a ausência de sincronia durante a divisão celular, ou seja, diferentes fases da meiose presentes em um mesmo botão floral. A literatura reporta esse comportamento, o qual está de acordo com o observado por Picoli et al. (2003), que definiram seis classes de botão, baseadas na relação de tamanho entre cálice e corola, forma da margem do cálice e

presença de pigmentos nas anteras, constatando a presença de diferentes fases da meiose em uma mesma classe de botão.

A viabilidade polínica foi de 72,5%, com predominância de grãos de pólen viáveis, resultante de uma divisão nuclear satisfatória para um híbrido interespecífico, dessa maneira uma relação satisfatória entre o número de tétrades normais e a viabilidade dos grãos de pólen pode ser observada. Monteiro et al. (2011) ao avaliar a fertilidade de híbridos interespecíficos obtidos entre espécies de *Capsicum* observou que a fertilidade variou indo desde combinações férteis (*C. chinense* x *C. frutescens*) a combinações macho estéreis (*C. baccatum* var. *pendulum* x *C. chinense*).

Kumar et al. (1987) mencionam em seus trabalhos sobre híbridos interespecíficos de *Capsicum* a ocorrência de meiose irregular, onde o genoma de *C. annuum* difere de *C. chinense* por duas translocações e algumas alterações estruturais, e de *C. baccatum* por duas translocações, uma única inversão e algumas alterações estruturais secundárias.

De modo geral, obtenção de híbridos entre as espécies *C. frutescens* x *C. chinense* são possíveis, não apresentando, grandes problemas. Casali (1970) obteve plantas híbridas no cruzamento entre essas espécies, contudo a viabilidade do híbrido foi variável. Pickersgill (1966) relatou que *C. chinense* e *C. frutescens* são bastante próximas, revelando um alto grau de compatibilidade. É sabido que as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* pertencem a um mesmo complexo gênico (Pickersgill 1991; Zijlstra et al., 1991), o que favorece e facilita o cruzamento entre essas espécies, produzindo plantas F<sub>1</sub> férteis. Porém, há dificuldade na formação de híbridos interespecíficos férteis oriundos dos cruzamentos entre espécies pertencentes a complexos gênicos distintos.

Considerando que a viabilidade polínica foi satisfatória, com uma média de 72,5%, esses resultados indicam que o híbrido apresenta uma divisão celular regular, que resulta em grãos de pólen viáveis, portanto capazes de germinar no estigma da flor, fertilizar e gerar frutos viáveis. A esterilidade do pólen ou mesmo a baixa fertilidade dos indivíduos são fatores extremamente negativos quando se pretende utiliza-los em programas de melhoramento (Manara, 1974).

### 3.1.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados conclui-se que as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* são geneticamente próximas, em função da homologia cromossômica, considerando que o híbrido interespecífico apresentou uma meiose normal, com 12 bivalentes resultando em gametas reduzidos. A viabilidade do híbrido foi de 72,5%, valor este considerado satisfatório.

## **3.2. EFEITO DA TEMPERATURA NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO TUBO POLÍNICO EM PIMENTÃO**

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

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

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

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

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

Dados indicam que estresse causado pela temperatura, sofrido durante o desenvolvimento do gameta, a fase entre a polinização e o desenvolvimento do zigoto e a fase do desenvolvimento do embrião, diminuem a frutificação e o número de sementes (Hedhly et al., 2008). Entre os efeitos da temperatura também se pode citar a falta de sincronia no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos (Herrero, 2003), defeitos na estrutura e função dos tecidos da corola, dos carpelos, e estames (Morrison & Stewart, 2002).

Altas temperaturas afetam a quantidade, a morfologia, a arquitetura da parede, a composição química e o metabolismo do grão de pólen, a viabilidade polínica, a capacidade de germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico, além de afetar a deiscência das anteras (Hedhly et al., 2008).

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

Os efeitos adversos causados pelo estresse da temperatura podem ser atenuados pelo desenvolvimento de cultivares com maior tolerância as alterações de temperatura. No entanto, para isso, uma compreensão completa das respostas fisiológicas das plantas a temperaturas elevadas, dos mecanismos de tolerância ao calor e possíveis estratégias para melhorar essa tolerância é indispensável (Wahid et al., 2007).

Diferentes ferramentas estão disponíveis, tais como: a avaliação do estigma, a receptividade do óvulo, a germinação do pólen, o comportamento do tubo polínico e sua influência sobre a subsequente frutificação (Hedhly et al.,

2008). Devido ao seu papel fundamental no processo de fertilização, o tubo polínico tem sido objeto de vários estudos com o objetivo de analisar o efeito da temperatura sobre seu crescimento e germinação do grão de pólen.

Em *Capsicum* o efeito da temperatura também tem sido estudado. Aloni et al. (2001) trabalhando com *C. annuum* concluíram que altas concentrações de sacarose e amido nos grãos de pólen de plantas tolerantes a alta temperatura podem resultar da redução no metabolismo dos grãos de pólen sob estresse do aquecimento.

Martins (2014) ao avaliar acessos de *Capsicum* observou que as baixas temperaturas não influenciam negativamente à germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *Capsicum*. Em contrapartida, temperaturas acima de 40°C são limitantes para a germinação dos grãos de pólen das espécies. O autor afirma ainda que existe uma relação entre a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico, ocorrendo um maior alongamento dos tubos nas temperaturas que proporcionaram maiores percentagens de germinação, o que indica que a temperatura afeta tanto a germinação quanto o crescimento dos tubos polínicos em *Capsicum*. Assim, esse estudo teve por objetivo avaliar o efeito da temperatura sobre a germinação *in vivo* do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico em botões florais fechados e autopolinizados.

### 3.2.2. REVISÃO

#### 3.2.2.1. Efeito da Temperatura na Reprodução Sexual de Plantas

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

As plantas, como um organismo sésil, estão frequentemente a mercê de fatores ambientais, como seca, frio, salinidade e altas temperaturas. Tais fatores podem afetar significativamente o sucesso dos processos de reprodução (Giorno et al., 2013). Em se tratando do aquecimento global, efeitos imediatos já são

observáveis, tanto em populações naturais como nos sistemas agrícolas, sendo o desenvolvimento reprodutivo mais afetado do que o vegetativo (Sato et al., 2006).

Esses efeitos estão relacionados, principalmente, ao início precoce do desenvolvimento sexual reprodutivo, dependendo das regiões e espécies em estudo, a expansão das plantas cultivadas e mudanças na distribuição geográfica de populações naturais para latitudes mais altas (Hedhly et al., 2008).

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

O estresse gerado por alterações nas temperaturas pode ter vários efeitos sobre os tecidos reprodutivos, que acabam por contribuir com diminuição da produção de sementes. Entre essas consequências, estão: o florescimento tardio ou precoce; assincronismo no desenvolvimento reprodutivo masculino e feminino; deformidades e diminuição de números e tamanho dos órgãos florais; defeitos nos gametas masculinos e femininos, como esterilidade, deformação dos ovários e diminuição do número de óvulos (Zinn et al., 2010).

O florescimento pode ser acelerado pelo aumento na temperatura, o que pode ocasionar a reprodução antes das plantas acumularem recursos adequados, como a biomassa, para destinar ao desenvolvimento das sementes (Zinn et al., 2010). Assim como também, durante a germinação das sementes, elevadas temperaturas podem retardar ou inibir totalmente a germinação, dependendo da espécie e da intensidade do estresse (Wahid et al., 2007).

Diante da importância dos efeitos da temperatura sobre a reprodução sexuada e à observação de que o desenvolvimento do pólen possa ser o processo reprodutivo mais termossensível (Hedhly et al., 2008), estudos têm investigado a resposta ao estresse de temperatura, da germinação e do crescimento do tubo polínico como as temperaturas cardinais (máxima, ótima e mínima) em várias culturas (Sorkheh et al., 2011).

A reprodução sexual em espécies do gênero *Capsicum*, também é suscetível aos estresses ambientais, sendo a temperatura o principal fator ambiental, influenciando a frutificação em pimentas, uma vez que condições de

temperaturas elevadas, geralmente, causam abscisão das flores e aborto das sementes devido à falha de polinização (Aloni et al., 2001).

### 3.2.2.2. O Efeito da Temperatura na Reprodução do Gênero *Capsicum*

Devido à maior sensibilidade do gametófito masculino e ao fato de que o efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen é variável e dependente da espécie ou cultivar estudada (Sukhvibul et al., 2000). Reddy e Kakani (2007) determinaram o efeito da temperatura sobre a germinação do grão de pólen e identificaram diferenças entre espécies/genótipos em *Capsicum*. Para isso, os autores determinaram as temperaturas cardinais dos genótipos estudados e diferenciaram aqueles tolerantes (*C. annum* – México), intermediários (*C. chacoense* - Argentina e Guatemala) e sensíveis (*C. frutescens* - China, *C. annum* - Coreia do Sul, e *C. pubescens* - Guatemala) a altas temperaturas. Os genótipos tolerantes poderão ser utilizados em programas de melhoramento, visando o desenvolvimento de novos genótipos que sejam capazes de suportar condições de altas temperaturas.

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

Gajanayake et al. (2011) analisaram aspectos polínicos e fisiológicos, visando observar a tolerância de pimentas ornamentais (*C. annum*) a altas e baixas temperaturas. A germinação do pólen *in vitro* e o crescimento do tubo polínico de 12 cultivares foram mensurados em diferentes temperaturas (10 a 45°C), sendo estimadas as temperaturas cardinais (máxima, ótima e mínima). Foi, também, mensurado, durante o florescimento a termo-estabilidade da membrana, o índice de estabilidade da clorofila e a viabilidade do pólen.

Os autores observaram que existiu uma diferença significativa entre as cultivares em todos os parâmetros analisados, sendo distinguidas cultivares com alta sensibilidade, intermediárias e tolerantes a altas temperaturas. Além disso, as cultivares foram classificadas em sensíveis e moderadamente sensíveis ao frio e tolerantes e moderadamente tolerantes ao frio.

Além de afetar a germinação do pólen, o crescimento do tubo polínico e a fertilização, as altas temperaturas, durante a época de florescimento, também afetam as flores e os frutos de pimentas. Alguns trabalhos, envolvendo a observação da produção de pimentas em ambientes de campo e controlados, mostram que ocorre aborto dos botões florais quando as temperaturas do dia são maiores que 34°C ou as temperaturas noturnas são maiores que 21°C por longos períodos de tempo (Erickson e Marhart, 2002).

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

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

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

além da inibição do acúmulo de carboidratos, afetando a germinação e o vigor das sementes.

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

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

### **3.2.2.3. Grão de Pólen**

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

A 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 vegetativo 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).

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. Dentro de um mesmo gênero, a ocorrência de pólen binucleados e trinucleados são raras e nunca ocorre dentro de uma mesma espécie (Brewbaker, 1957). Em cerca de 70% das famílias como Solanaceae e Liliaceae, a segunda divisão mitótica da célula generativa, a qual 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). De acordo com Horner e Palmer (1995), a literatura relata diversos 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 pólen anormais ou inviáveis.

O tubo polínico é um alongamento da parede celular interna do grão de pólen que recebe estímulos para a germinação quando depositado no estigma da flor. A função do tubo polínico é conduzir os gametas do pólen até o ovário, permitindo que isso ocorra a longas distâncias, vários centímetros em alguns casos (Cresti et al., 1992).

#### **3.2.2.4. Efeito da Temperatura nos Grãos de Pólen**

O desenvolvimento reprodutivo masculino é altamente organizado e mais sensível a vários estresses ambientais, incluindo altas temperaturas (Endo et al., 2009). Estudos abordando o efeito da temperatura sobre a morfologia dos grãos de pólen, deiscências das anteras (Koti et al., 2005), composição química e metabolismo do grão de pólen (Aloni et al., 2001) têm sido realizados.

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

viáveis, o que reduz a frutificação (Sato et al., 2000). Kumar et al. (2013), trabalhando com grão de bico, observaram um declínio na viabilidade polínica, na germinação do pólen, no crescimento do tubo polínico e na receptividade do estigma com o aumento da temperatura.

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

Endo et al. (2009) testando o efeito de altas temperaturas em plantas de arroz, obtiveram resultados que sugerem que nem todos os genes do tapetum são inibidos com temperaturas elevadas e que nem o próprio tapetum é degradado. Em trigo, o estresse pelo calor pode induzir a degradação do tapete, tecido que nutre as células mães de grão de pólen durante a microsporogênese, e isso pode levar à esterilidade do pólen (Sakata et al., 2000), já que os micrósporos não podem completar a primeira mitose ou, em alguns casos, mesmo completando a mitose I, não conseguem se dividir novamente (Saini et al., 1984). Já em tomate e arroz, altas temperaturas causam má deiscência das anteras, reduzindo a dispersão de grãos de pólen (Matsui e Omasa, 2002).

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

Alguns fatores podem afetar a manutenção da capacidade germinativa do grão de pólen, como a umidade relativa, a temperatura ambiente, o vigor e o estágio fisiológico da planta e a idade da flor (Shivanna e Rangaswamy, 1992).

### 3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

Sementes da cultivar Cascadura Ikeda (*Capsicum annuum* var. *annuum*) da empresa Topseed Garden, foram semeadas em bandejas de isopor com substrato vegetal Vivatto® em casa de vegetação na Unidade de Apoio a Pesquisa (UAP) no campus da UENF. Vinte dias após germinação as plântulas foram transplantadas para copos de plástico de 500mL com substrato vegetal Vivatto®. Cerca de dois meses após a germinação, as mudas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 5L, utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal, sendo conduzidas 20 plantas. Os tratos culturais foram empregados de acordo com as recomendações para a cultura (Filgueira, 2000).

Durante o período de floração, 20 botões florais na pré-antese foram identificados e etiquetados com fio de lã entre 8 e 9 horas da manhã. Vinte e quatro horas após a abertura floral foram coletadas as 20 flores. Pétalas e sépalas foram removidas das flores, deixando apenas os pistilos, sendo que 10 foram colocadas em placa de Petri abertas na BOD a 10°C, e os outros 10 pistilos a 25°C (controle) em outra BOD, simultaneamente, onde permaneceram por mais 24 horas. Ambas as BODs a 60% de umidade relativa em 8 horas de luz e 16 horas de escuro. O mesmo procedimento foi realizado para as demais temperaturas (30°C; 40°C) em estudo e seus respectivos controles. Essas temperaturas foram definidas com base nos resultados obtidos por Martins (2014).

Após a exposição por 24 horas às temperaturas, os pistilos foram colocados em solução fixadora de FAA (Formalina, Álcool e Ácido Acético) e deixados por mais 24 horas. Posteriormente, os pistilos foram transferidos para a solução de álcool 70% e deixados por pelo menos 4 horas antes da próxima etapa.

No preparo do tecido para a visualização, os pistilos foram colocados em NaOH 8M por 8 horas, para o amaciamento do tecido da amostra. Em seguida, estes pistilos foram, cuidadosamente, lavados por 5 vezes em água destilada. Por último, o material foi colocado em frascos de vidro escuro de 20 mL recoberto com papel alumínio, com o corante anilina azul 1% e deixados a temperatura ambiente por 4 horas (Dafni, 1992).

Em seguida, separaram-se os pistilos em duas partes em uma mesma lâmina, a primeira porção contendo estigma e estilete e a segunda o ovário, sendo feitas 10 lâminas por temperatura testada e 10 para cada controle, totalizando 60 lâminas a serem observadas.

Os pistilos foram observados utilizando-se microscopia óptica de fluorescência, usando o filtro de emissão de ultravioleta de 509nm e 370nm de excitação (Olympus BX60), e as imagens foram capturadas com o *Image-Pro Plus Software* (versão 5.1, Media Cybernetics). A avaliação constou na observação dos grãos de pólen germinados e no crescimento do tubo polínico ao longo do estilete em diferentes temperaturas.

Os procedimentos laboratoriais foram executados no Setor de Citogenética do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### 3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

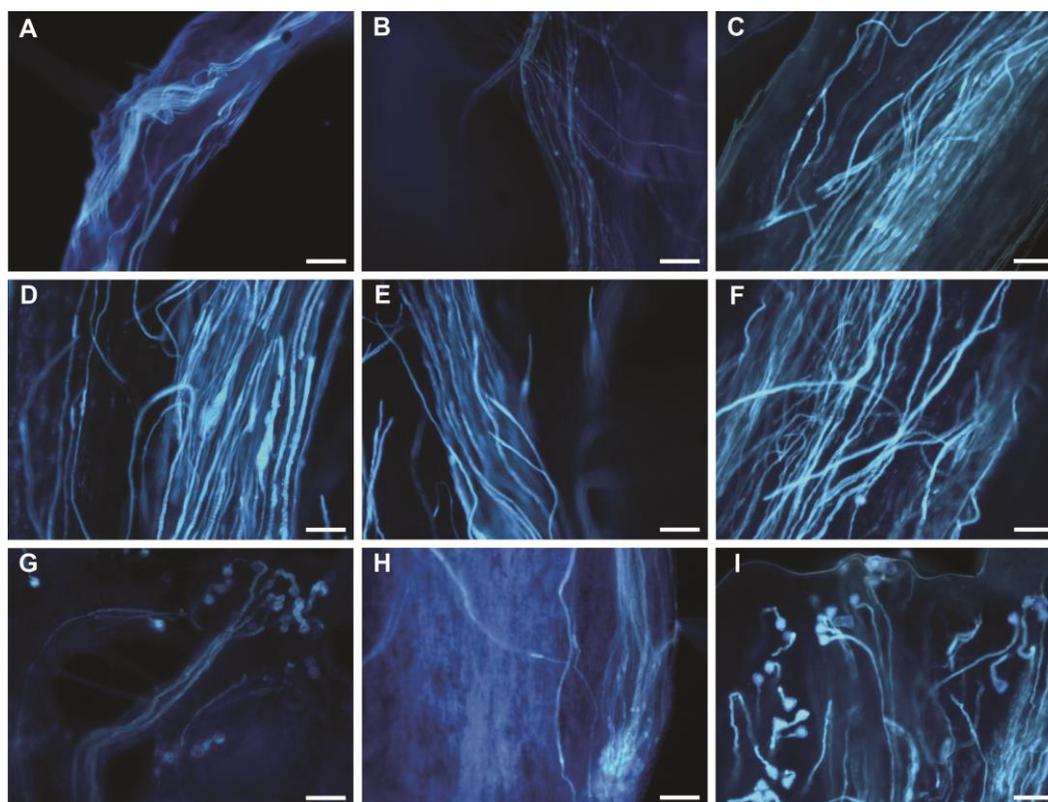
A germinação do grão de pólen no estigma e o crescimento do tubo polínico *in vivo*, ao longo do estilete, foram observados nas três temperaturas estudadas (10, 30 e 40°C) bem como no controle (25°C). Porém houve diferença na observação da quantidade de grão de pólen germinado e no crescimento do tubo polínico.

Na temperatura de 10°C (Figura 1A e B), pôde-se observar que o grão de pólen germina, porém em menor quantidade em relação ao controle a 25°C (Fig. 1C) e o crescimento do tubo polínico ocorre de forma desordenada. Além disto, a 10°C ocorre uma condensação dos tubos polínicos (Fig. 1A) quando comparado ao controle. Pressman et al. (2006) analisando o efeito da temperatura em plantas de duas cultivares de pimenta (*C. annuum*), quando submetidas a baixas temperaturas noturnas (10°C) e moderada temperatura diurna (25°C), observaram uma redução no número e qualidade dos grãos de pólen, esta última característica associada à redução do acúmulo de amido e decréscimo de mais do que duas vezes no total de açúcares solúveis nos pólenes maduros. No entanto,

os autores observaram que todos esses sintomas não ocorreram com a exposição das plantas a altas temperaturas (36°C) durante o dia.

Efeitos negativos, também foram reportados em plantas de pimentão submetidas a baixas temperaturas, no trabalho de Polowick e Sawhney (1985) no qual foi observado que plantas de *C. annuum* submetidas a temperaturas de 18°C dia e 15°C noite produziram pólen inviáveis.

Uma germinação considerável do grão de pólen e um crescimento do tubo polínico contínuo, foi observado a 30°C (Fig. 1D e E), o que pode favorecer o alcance ao ovário, indicando que nesta temperatura o crescimento não foi prejudicado pela temperatura quando comparado ao controle (Fig. 1F), corroborando com o trabalho de Reddy e Kakani (2007), que observaram a resposta da germinação e do crescimento do tubo polínico de diferentes espécies de *Capsicum* à variação da temperatura, e obtiveram valores de temperatura mínima para *C. annuum* temperatura ótima de 29,1 e 30,8 °C.



**Figura 1.** Efeito da temperatura no crescimento do tubo polínico *in vivo* de grãos de pólen de pimentão cultivar Cascadura Ikeda ao longo do estilete. A e B) Germinação do grão de pólen a 10°C; C) Germinação do grão de pólen ao longo a 25°C; D e E) Germinação do grão de pólen a 30°C; F) Germinação do grão de pólen a 25°C; G) Grãos de pólen no estigma a 40°C; H) Germinação do grão de pólen a 40°C; I) Germinação do grão de pólen a 25°C. Barra = 10μ.

A quantidade de grão de pólen germinado 40°C (Figura 1G e H), foi menor em comparação ao controle (Fig. 1I), e o crescimento foi desordenado e descontínuo. Kafizadeh et al. (2008) estudando o efeito de temperaturas elevadas sobre os grãos de pólen de pimentas, observaram que temperatura de 38°C, além de diminuir a germinação, também diminuiu o crescimento do tubo polínico e afetou sua estrutura. Segundo os autores, temperaturas acima de 34°C, durante a germinação do pólen, resultam em uma redução na percentagem de germinação e no crescimento do tubo polínico, sendo esse dano significativo quando os grãos de pólen são obtidos de flores que cresceram sob altas temperaturas. De acordo com o mesmo autor, o ambiente e a composição celular do estilo exercem efeito específico sobre o processo de crescimento do tubo polínico.

Aloni et al. (2001) observaram que, em plantas de *Capsicum annuum* submetidas a temperaturas diurnas e noturnas de 32°C e 26°C, respectivamente, a germinação do pólen *in vitro* foi muito reduzida. Resultados semelhantes a esses, foram obtidos por Kafizadeh et al. (2008) que observaram uma redução drástica na germinação polínica em plantas cultivadas à temperatura de 38°C em comparação com as plantas cultivadas a 25°C.

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

### 3.2.5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados conclui-se que a temperatura influencia a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico em pimentão. Trinta graus (30°C) foi a temperatura mais indicada neste estudo para a germinação do grão de pólen e o crescimento do tubo polínico do genótipo de pimentão testado, já que nesta temperatura se teve uma maior uniformidade de germinação e tubos polínicos mais íntegros. Porém, 10°C e 40°C afetam negativamente a germinação dos grãos de pólen e, conseqüentemente, o crescimento do tubo polínico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, I., Kakani, V.G. (2010) The effects of temperature on in vitro pollen germination and pollen tube growth of *Pistacia* spp. *Scientia Horticulturae*, 125:569–572.
- Albrecht, E., Zhang, D., Saftner, R.A., Stommel, R.J. (2012) Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59:517–538.
- Alexander, M. P. (1969) Differential staining of aborted non aborted pollen. *Satain Techonology*44: 117-122.
- Alexander, M.P. (1980) A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol*, Baltimore, 55 (1) 13-18.
- Aloni, B., Peet, M.M., Pharr, M., Karni, L., 2001. The effect of high temperature and high atmospheric CO<sub>2</sub> on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiol Plant*, 112: 505–512.
- Baral, J.B., Bosland, P. W. (2004) Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): A multiple evidence approach using morphology, molecular analysis and sexual compatibility. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129: 826-832.

- Barbosa, G.E., Agra, M.F., Romero, M.V., Scaldaferrro, M.A., Moscone, E.A. (2011) New endemic species of *Capsicum* (Solanaceae) from the Brazilian Caatinga: comparison with the re-circumscribed *C. parvifolium*. *Systematic Botany*, 36:768-781.
- Belletti, P., Marzachi, C., Lanteri, S. (1998) Flow cytometry measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 209:85–91.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2000) *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p.
- Bosland, P. W., Votava, E. J. (1999) *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Wallingford: CAB International, 204 p.
- Bosland, P.W. (1996) *Capsicum: innovative uses of ancient crop*. In: Janick, J. (eds.) *Progress in New Crop*. ASHS Press, Arlington, Virginia, p. 479-487
- Brewbaker, J.L. (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *Journal of Heredity*, 48:271-77.
- Caetano, C. M., d’Eeckenbruggge, G. C., Olaya, C. A., Jimenez, D. R., Veja, J. (2003) Spindle absence in *Vasconcellea cundinamarzensis* (Caricaceae). *The Nucleus*, 46(3): 86 – 89.
- Campos, K.P. (2006) *Obtenção, caracterização morfológica e reprodutiva de híbridos interespecíficos entre espécies domesticadas de Capsicum L.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild *Capsicums*: identification and in situ analysis of Brazilian species. XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and Eggplant. Torino, Italy. P. 205-213.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2008) *Botânica e Recursos Genéticos*. In: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. (ed.) *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p 39-54.

- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Ribeiro, C.S.C.; Lopes, C.A. (2006). Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças. 27.
- Casali, V.W.D., Couto, F.A.A. (1984) Origem e botânica de *Capsicum*. Informe Agropecuário, 10: 8-18.
- Casali, V.W.D. (1970) Cruzamento interespecífico no gênero *Capsicum*. Viçosa, MG: UFV, 58p. Tese de Mestrado.
- CEASA (2008) Centrais de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro. Versão eletrônica. Disponível em: <http://www.ceasa.rj.gov.br> em 03/01/2007. Acesso em novembro de 2014.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J.K. (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, 12: 444-451.
- Consolaro, M. E., Pagliarini, M. S., Chaves, L. J. (1996) Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). *Cytologia*, Tokyo, 61:375 – 381.
- Costa, L.M., Moura, N.F., Marangoni, C., Mendes, C.E., Teixeira, A.O. (2010) Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:51-59.
- Cresti, M., Blackmore S., Van Went J.L. (1992) *Atlas of Sexual Reproduction in Flowering Plants*, Springer, Berlin, 249p.
- Dafni, A. (1992) *Pollination ecology – a practical approach*. Oxford University Press, New York, 250p.
- Defani-Scoarize, M. A., Pagliarini, M. S., Aguiar, C. G. (1996) Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Nucleus*. 39: 10 – 18.
- Defani-Scoarize, M. A. *et al* (1995) Evolution of meiotic behavior in double-cross maize hybrids and their parents. *Maydica* 40: n.1, 2 p. 319-324.
- Egawa, Y. and Tanaka, M. (1986) Cytogenetical study of the interespecific hybrid between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*. *Japanese Journal of Breeding* 36:16-21.

- Egawa, Y., Tanaka, M. (1984) Cytogenetical relationships among three species of chili peppers, *Capsicum chinense*, *C. frutescens* and *C. baccatum*. *Japanese Journal of Breeding*, 34: 50-56.
- Embrapa (2012) Hortaliças em número. Produção de hortaliças no Brasil. Disponível em: [http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas\\_em\\_numeros/producao\\_hortalicas\\_brasil\\_2000\\_2011.pdf](http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/producao_hortalicas_brasil_2000_2011.pdf) Acesso em: 10/12/2014.
- Endo, M., Tsuchiya, T., Hamada, K., Kawamura, S., Yano, K., Ohshima, M., Higashitani, A., Watanabe, M., Kawagishi-Kobayashi, M. (2009) High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiology*, 50: 1911–1922.
- Erickson, A.N., Markhart, A.H. (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant, Cell and Environment*, 25: 123–130.
- Esau, K. (1977) *Anatomy of seed plants*. 2.ed. USA: John Wiley & Sons. 550p.
- Eshbaugh, W.H. (1993) Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: Janick, J., J.E. Simon (eds.). *New Crops*. New York: Wiley and Sons, Inc., p. 132-139.
- FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Versão eletrônica. Disponível em: [http:// faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org). Acesso em: Nov. de 2014.
- FAPESP (2013) Agência de notícias da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/17944>. Acesso em: 12/10/2013.
- Filgueira, F.A.R. (2000) *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: Editora UFV, 402p.
- Finger, F.L., Rêgo, E.R., Segatto, F.B, Nascimento, N.F.F, Rêgo, M.M. (2012) Produção e potencial de mercado para pimenta ornamental. *Informe Agropecuário*, 33:14-20.

- Gajanayake, B., Trader, B.W., Reddy, K.R., Harkess, R. (2011) Screening ornamental pepper cultivars for temperature tolerance using pollen and physiological parameters. *HortScience*, 46:878-884.
- Giorno, F., Wolters-Arts, M., Mariani, C., Rieu, I. (2013) Ensuring reproduction at high temperatures: the heat stress response during anther and pollen development. *Plants*, 2: 489-506.
- Guerra, M.S., Souza, M.J. (2001) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, 131p.
- Guerra, M.S. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética*, 9 (4):741-743.
- Gupta, P.K., Priyadarshan, P. M. (1987) Analysis of meiosis in triticales (Triticosecale X Wittmack) X rye (*Secale cereale* L.) F1 hybrids at three ploidy levels. *Theoretical and Applied Genetics*. 73: 893 – 898.
- Hajjar, R., Hodgkin, T. (2007) The use of wild relative in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*.156 (1-2): 1 – 13.
- Harlan, J. R. and De Wet, J. M. J. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*. 20:509-517.
- Hatfield, J.L. (2013) Climate change: Challenges for future crop adjustments. In: Tuteja, N.; Gill, S.S. (eds.) *Climate change and plant abiotic stress tolerance*. Wiley Blackwell. 1208 p.
- Hedhly, A., Hormaza, J.I., Herrero, M. (2008) Global warming and plant sexual reproduction. *Trends in Plant Science*, 14:30-36.
- Herrero, M. (2003) Male and female synchrony and the regulation of mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358:1019-1024.
- Heslop-Harrison, J.S. (2000) RNA, genes, genomes and chromosomes: repetitive DNA sequences in plants. *Chromosome today*, 13:45-57.

- Hesse, M. et al (2009) Pollen terminology. An illustrated handbook. Vienna, Springer, 264p.
- Horner, H.T., Palmer, R.G. (1995) Mechanisms of genetic male sterility. *Crop Science*, 35: 1527-1535.
- IBPGR (1983) Genetic resources of Capsicum. Roma: IBPGR secretariat, p. 113.
- IPCC (2013) Climate change 2013: the physical science basis. Summary for policymakers. Disponível em: [http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI\\_AR5\\_SPM\\_brochure.pdf](http://www.climatechange2013.org/images/uploads/WGI_AR5_SPM_brochure.pdf). Acesso em 15/11/2014.
- IPGRI (1995) Descriptores for Capsicum (*Capsicum* spp). Roma: IPGRI, 51p.
- Jensen, R.J., McLeod, M.J., Eshbaugh, W.H., Guttman, S.I. (1979) Numerical taxonomic analyses of allozymic variation in *Capsicum* (Solanaceae). *Taxon*, 28: 315-327.
- Jong, J. H., Wolters, A. M. A., Kok, J. M., Verhaar, H., Van Eden, J. (1993) Chromosome pairing and potential for intergeneric recombination in some Hypotetraploid somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*. *Genome*, 36: 1032 – 1041.
- Kafizadeh, N., Carapetian, J., Kalantari, K.M. (2008) Effects of heat on pollen viability and pollen tube growth in pepper. *Research Journal of Biological Sciences*, 3: 1159-1162.
- Karni, L., Aloni, B. (2002) Fructokinase and hexokinase from pollen grains of bell pepper (*Capsicum annuum* L.): Possible role in pollen germination under conditions of high temperature and CO<sub>2</sub> enrichment. *Annals of Botany*, 90: 607-612.
- Kaul, M. L. H., Murthy, T. G. K. (1985) Mutant genes affecting higher plants meiosis. *Theoretical and Applied Genetics*. 70: 449 – 466.
- Kelly, J.K., Rasch, A., Kalisz, S. (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*, 89 (6):1021-1023.

- Koti, S., Reddy, K.R., Reddy, V.R., Kakani, V.G., Zhao, D. (2005) Interactive effects of carbon dioxide, temperature, and ultraviolet-B radiation on soybean (*Glycine max* L.) flower and pollen morphology, pollen production, germination, and tube lengths. *Journal of Experimental Botany*, 56: 725–736.
- Kumar, S., Thakur, P., Kaushal, N., Malik, J.A., Gaur, P., Nayyar, H. (2013) Effect of varying high temperatures during reproductive growth on reproductive function, oxidative stress and seed yield in chickpea genotypes differing in heat sensitivity. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59: 823-843.
- Kumar, A. O., Ramesh, C., Panda, K. G., Raja, R. (1988) Cytogenetics of interspecific hybrids in the genus *Capsicum* L. *Euphytica* 39: 47 – 51.
- Kumar, O. A., Panda, R.C., Rao, K. G. R. (1987) Cytogenetic studies of the F1 hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. *Theoretical and Applied Genetics* 74: 242-246.
- Lanteri, S. and Pickersgill, B. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. e *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica* 67: 155-160.
- Larcher, W. (2003) *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, 513 p.
- Lopes, C.A. (2008) Ardume, picância e pungência. In: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa hortaliças, p 25-30.
- Love, R. M. (1951) Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. *Agronomy Journal* 43:72-76.
- Maluf, W.R. (2001). Heterose e emprego de híbridos F1 em hortaliças. NASS, L.L.; Valosis, A.C.C.; Melo, I.S.; Valadares, M.C. (ed) *Recursos genéticos e melhoramento: plantas*. Rondonópolis, Fundação MT. 650-671p.
- Manara, N. T. F. (1974) Viabilidade dos grãos de pólen em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Centro Ciências Rurais* 4: 309-316.

- Martins, K. C. (2014) Cruzabilidade, tamanho do genoma e viabilidade polínica em *capsicum* spp. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro, 135p.
- Martins, K. C., Pereira, T. N. S., Souza, S. A. M., Rodrigues, R. e Amaral Junior, A. T. Cruzabilidade e avaliação das barreiras de incongruidade em cruzamentos entre espécies de *Capsicum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. (No prelo)
- Martins, K. C., Pereira, T. N. S, Souza, S. A. M., Costa, F. R. (2010) Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural*40: 1746-1751.
- Mascarenhas, J.P. (1992) Pollen gene expression: Molecular evidence. *International Review of Cytology*, 140: 3-18.
- Matsui, T., Omasa, K. (2002) Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars tolerant to high temperature at flowering: anther characteristics. *Annals of Botany*, 89: 683–687.
- Mayeda, L.Y. (1997) Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP, 89p.
- Melo, D. M., Charlo, H. C. O., Botelho, A. P., Castoldi, R. and Braz, L. T. (2010) Cruzamentos interespecíficos entre *Capsicum chinense* e *C. frutescens*. *Horticultura Brasileira* 28: 2598-2603.
- Mezard, C. (2006) Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* 34 (part 4).
- Miranda, J.E.C., Casali, V.W.D.(1988). Métodos de melhoramento aplicados as espécies autógamas. *Simpósio Brasileiro sobre Capsicum*,1. Dourado, Anais. 15-30p.

- Monteiro, C. E. S., Pereira, T. N. P. and Campos, K. P. (2011) Reproductive characterization of interspecific hybrids among *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 241-249.
- Monteiro, E.R., Bastos, E.M., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Nunes, J.A.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40:288-283.
- Moore, P.D., Webb, J.A. (1978) An illustrated guide to pollen analysis. 1. ed., New York: A Halsted Press Book, 133p.
- Morrison, M.J., Stewart, D.W. (2002) Heat stress during flowering in summer Brassica. *Crop Science* 42:797-803.
- Moscone, E. A., Scaldaferrro, M. A., Grabiele, M., Cecchini, N. M., García, Y. S., Jarret, R., Daviña, J. R., Ducasse, D. A., Barboza, G. E. and Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum* – solanaceae): a cytogenetic perspective. VI The International Solanaceae Conference. *Acta Hort.* 745:137-169.
- Moscone, E. A., Barany, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F. and 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 Syst Evol*, 202:37-63.
- Moura, A.P., Michereff Filho, M., Guimarães, J.A., Amaro, G.B., Liz, R.S. (2013) Manejo integrado de pragas de pimentas do gênero *Capsicum*. Circular Técnica 115. Brasília, DF.
- Olszewska, D., Jedrzejczyk, I., Nowaczyk, P. (2011) Biomterical assessment of interespecific hybrids of *Capsicum* genus. *Vegetable Crop Research Bulletin* 75: 21-30

- Onus, A.N., Pickersgill, B. (2004) Unilateral Incompatibility in Capsicum (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution. *Annals of Botany*, 94: 289-295.
- Pagamas, P., Nawata, E. (2008) Sensitive stages of fruit and seed development of chili pepper (*Capsicum annuum* L. var. Shishito) exposed to high-temperature stress. *Scientia Horticulturae*, 117: 21–25.
- Pagliarini, M.S., Pozzobon, M.T. (2004) Il Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.
- Pagliarini, M. S. (2000) Meiotic behavior of economically important plant species: The relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4): 997 – 1002.
- Pereira, L.P., Luz, L.P., Tedesco, S.B., Silva, A.C.F.S. (2006) Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. *Ciência rural*, 36 (2):678-681.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96: 29-133.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B*, Amsterdam: Elsevier. p.139-160.
- Pickersgill, B. (1971) Relationships between Weedy and Cultivated forms in some Species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 25:683-691.
- Pickersgill, B., Heiser, C.B., Mcneill, J. (1979) Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic, London. p. 679-700.
- Pickersgill, B. (1966). *The variability and relationships of Capsicum chinense* Jacq. Indiana University. 98p.

- Picoli, E. A. T., Carvalho C. R., Fári M., Otoni, W. C. (2003) Associação de fases meióticas e estádios dos micrósporos com características morfológicas de botões florais de pimentão. *Ciênc. Agrotec.* 27: 708-713.
- Pinto, C.M.F., Silva, D.J.H. (2006) Cultivo da Pimenta. EPAMIG: Informe agropecuário, 27 (235): 108.
- Polowick, P.L., Sawhney, V.K. (1985) Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae*, 25: 117-127.
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T., Bianchetti, L.B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x = 12$  and  $x = 13$  represent two evolutionary lines? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 259-269.
- Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen, L.H. (2006) Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain-sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) are more severe at elevated carbondioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology*, 139: 237-251.
- Pressman, E., Shaked, R., Firon, N. (2006) Exposing pepper plants to high day temperatures prevents the adverse low night temperature symptoms. *Physiologia Plantarum* 126: 618-626.
- Pressman, E., Moshkovitch, H., Rosenfeld, K., Shaked, R., Gamliel, B., Aloni, B. (1998) Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit set. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73: 131-136.
- Prestes, A. M. e Goulart, L. R. (1995) Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 3: 315-363.
- Prince, J.P., Lackney, V.K., Angeles, C., Blauth, J.R., Kyle, M.M. (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, 38: 224-231.

- Reddy, K.R., Kakani, V.G. (2007) Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. *Scientia horticultrae*, 112:130-135.
- Rêgo, E.R.; Finger, F.L.; Nascimento, N.F.B; Araújo, E.R.; Sapucay, M.J.L.C. Genética e melhoramento de pimenteiras. In: Rêgo, E.R.; Finger, F.L.; Rêgo, M.M. *Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (Capsicum spp.)*, 117-130p, mar. 2011.
- Reifschneider, F.J.B. (2008) *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília. Embrapa Comunicação Transferência de Tecnologia, p. 113.
- Ribeiro, C.S. da; Cruz, D.M.R. (2002). Tendências de mercado. Disponível em:<http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=406>. Acesso: Dezembro de 2014.
- Ribeiro, C.S.C., Melo, R.A.C. (2005) Hibridação interespecífica entre *Capsicum annum* e *Capsicum chinense* visando resistência à *Phytophthora capsici*. In: 45º Congresso Brasileiro de Olericultura, Revista Horticultura Brasileira, Brasília, p. 368- 368.
- Rodrigues, L.R., De Oliveira, J.M.S., Mariath, J.E.A. (2004) Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos in vitro. *Revista Brasileira de Biociências/Brazilian Journal of Biosciences*, 2: 159-167.
- Rodrigues, R., Sudré, C.P., Bento, C.S., Pimenta,S., Medeiros, A.M., Moulin, M.M., Gonçalves, L.S.A., Cunha, M., Neves, L.G., Gomes, V.M. (2014). *Capsicum Working Group: a Collaborative Multidisciplinary Effort to Improve Sweet and Chili Pepper* -10. The 22nd International Pepper Conference 2014. Vinã del Mar, Chile. 137p.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. (2000) A new procedure to asses pollen viability. *Sex Plant Reprod.* 12:241-244.
- Rufino, J.L.S., Pentead, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe agropecuário*, 27: 7-15.
- Russo, V.M. (2012) *Peppers: botany, production and uses*. CABI. 280 p.

- Saini, H.S., Sedgley, M., Aspinall, D. (1984) Developmental anatomy in wheat of male sterility induced by heat stress, water deficit or abscisic acid. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 243–253.
- Sakata, T., Higashitani, A. (2008) Male sterility accompanied with abnormal anther development in plants-genes and environmental stresses with special reference to high temperature injury. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 2: 42-51.
- Santos, E.K., Zanettini, M.H.B. (2002) Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. *Ciência Rural*, 32: 165-173.
- Sato, S., Kamiyama, M., Iwata, T., Makita, N., Furukawa, H., Ikeda, H. (2006) Moderate increase of mean daily temperature adversely affects fruit set of *Lycopersicon esculentum* by disrupting specific physiological processes in male reproductive development. *Annals of Botany*, 97: 731–738.
- Sato, S., Peet, M.M., Thomas, J.F. (2000) Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environment*, 23: 719-726.
- Schoffl, F., Prandl, R., Reindl, A. (1999) Molecular responses to heat stress. In: Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (eds.), *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*. R.G. Austin, Texas: Landes Co. p. 81-98.
- Schulz, S. R and Jensen, W. A. (1968) *Capsella* embryogenesis: the egg, zygote, and young embryo. *American Journal of Botany* 55: 807-819.
- Shaked, R., Rosenfeld, K., Pressman, E. (2004) The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. *Scientia Horticulturae*, 102: 29–36.
- Shamina, N. V. (2005) A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. *Cell Biology International*. 29: 384 - 391.

- Shifriss, C. 1997. Male sterility in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 93:83–88.
- Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. (1992) Pollen biology. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 210p.
- Singh, R. J. (2002) Plant cytogenetics. 2<sup>a</sup> ed. CRC Press.
- Singh, R.J. (1993) Plant Cytogenetics. The Handling of Plant Chromosomes.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Rouhi, V., Khodambashi, M., Wolukau, J.N., Ercisli, S. (2011) Response of in vitro pollen germination and pollen tube growth of almond (*Prunus dulcis* Mill.) to temperature, polyamines and polyamine synthesis inhibitor. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 749–757.
- Srinivasan, A., Saxena, N.P., Johansen, C. (1999) Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Research*, 60: 209-222.
- Stace, C.A. (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon*, 49:451-477.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C.S. (2010). Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9(1):283-294.
- Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Vithanage, V., Smith, M.K., Doogan, V.J., Hetherington, S.E. (2000) Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75:64-68.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Techio, V.H., Lisete, C.D., PEREIRA, A.V. (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2):35-42.

- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109: 71-77.
- Usman, I.S., Mamat, A.S., Mohd, H.S.Z., Aishah, H.S., Anuar, A.R. (1999) The non-impairment of pollination and fertilization in the abscission of chilli (*Capsicum annuum* L. Var. Kulai) flowers under high temperature and humid conditions. *Scientia Horticulturae*, 79: 1-11.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., GARCIA, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental Experimental Botany*, 61:199-223.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Wahng, 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.
- Zancanaro, Raquel Daneliczen. (2008). *Pimentas: tipos, utilização na culinária e funções no organismo*. Monografia (Especialização em Gastronomia e Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília. 43f.
- Zijlstra, S.C., Purimahua, C. and Lindout, P. (1991) Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. *Hortscience* 26: 585–586.
- Zinn, K.E., Tunc-Ozdemir, M., Harper, J.F. (2010) Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1959-1968.