



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

LEONILDO DE PAULA FARIAS FILHO

**CALOGÊNESE EM ANTERAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
PIMENTA (*CAPSICUM* spp.) DO BANCO DE GERMOPLASMA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA COM BASE EM MARCADOR RAPD**

Boa Vista

2006

LEONILDO DE PAULA FARIAS FILHO

**CALOGÊNESE EM ANTERAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
PIMENTA (*CAPSICUM* spp.) DO BANCO DE GERMOPLASMA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA COM BASE EM MARCADOR RAPD**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Recursos Naturais do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais – PRONAT da Universidade Federal de Roraima como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais, com área de concentração Bioprospecção.

Orientador: Prof. Dr. Maílson Monteiro do Rêgo

Boa Vista

2006

LEONILDO DE PAULA FARIAS FILHO

**CALOGÊNESE EM ANTERAS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE
PIMENTA (*CAPSICUM* spp.) DO BANCO DE GERMOPLASMA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA COM BASE EM MARCADOR RAPD**

Dissertação apresentada como pré-requisito para a conclusão do curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 24 de agosto de 2006 e avaliada pela seguinte banca examinadora.

Prof. Dr Maílson Monteiro do Rego
Orientador

Prof^a. Dr^a Elizanilda Ramalho do Rego
UFRR

Prof^a. Dr^a Lucianne B.O. Vilarínio
UFRR

Prof^a. Dr^a Maria Teresa Lopes Gomes
UFAM

A mulher mais especial de todas
Geralda, meus irmãos e ao meu pai, por tudo e por
todos os momentos que contribuíram para a
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos Deus que me guiou e apontou os caminhos para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, CAPES e a FINEP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao PRONAT pela oportunidade de crescimento;

Ao Prof^o Dr. Mailson Monteiro do Rêgo, pela orientação e pela confiança em mim depositada;

À professora Elizanilda pelas críticas sempre bem vindas, pelo auxílio na análise estatística e pelas correções feitas;

Ao Prof^o Dr. Pablo pela colaboração e empréstimo de material e reagentes;

À minha família pelo amor e pelo apoio dado nos momentos difíceis;

À Inayara Moraes pelo carinho, afeto e compreensão durante a jornada;

À Marlise (Diretora da Escola Oswaldo Cruz) pela compreensão durante a finalização deste trabalho

À Rosa Maria Benezar pelos momentos de longas conversas, pelo apoio nas pesquisas e pela companhia durante as noites de estudo;

Ao Ozimar, companheiro de estudo e de conversas lá no bloco cinco;

À Vanja Xaud pelo companheirismo na pesquisa;

Aos colegas de mestrado por caminharmos juntos nessa longa jornada;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi analisar a resposta a calogênese em dois acessos de pimenta, acesso 43- *Capsicum annuum* e acesso 40- *C. chinense*, por meio da cultura de anteras visando à regeneração de plantas haplóides, correlacionar o tamanho do botão com o estágio do desenvolvimento do micrósporo e avaliar a diversidade genética de 29 acessos de pimentas do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Roraima (UFRR) utilizando marcadores RAPD. Botões florais de vários tamanhos foram coletados e medidos, sendo então submetidos à técnica de squash em uma solução de 1% de orceína acética. Anteras de dois acessos de pimenta foram inoculadas em meio MS contendo várias concentrações de 2,4-D (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) na tentativa de induzir a androgênese de haplóides. Para o estudo de diversidade genética, foi extraído o DNA de 29 acessos de pimenta que foram submetidos à amplificação com 10 primers. Os resultados obtidos mostraram que o desenvolvimento do micrósporo em anteras não se apresenta sincrônico, uma vez que foi possível observar a presença de vários estádios de desenvolvimento na mesma antera. Com o acesso 43 (*C. annuum*) obteve-se 80% de calogênese utilizando 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, enquanto no acesso 40 (*C. chinense*) o percentual de formação de calos, utilizando 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D, foi de 66,6%. Não foi possível a regeneração de embriões. Quanto à diversidade genética, o menor e o maior valor de distância obtida entre pares de indivíduos foram, respectivamente, 0,05 (entre os acessos 75 e 76) e 1,00. Os marcadores RAPD, não foram eficientes em agrupar as diferentes espécies de *Capsicum*. A informações obtidas neste estudo deve ser de uso prático para mapeamento do genoma de pimenta, bem como para os programas de melhoramento. Na escolha dos pais para mapeamento de populações necessita de avaliação do nível de polimorfismo entre os potenciais parentais.

Palavras-chaves: *Capsicum*, micrósporo, calogênese, RAPD.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the androgenesis in two pepper accessions, accession 43- *C. annuum* and access 40- *C. chinense*, by the anther culture aiming to regenerate of haploids plants, to correlate the size of the bud with the development stadium of the of microspore and to evaluate the genetic diversity of 29 pepper accessions of Germoplasm of the Federal University of Roraima (UFRR) using RAPD markers. Floral buds different sizes were collected and measured, they were then submitted to the squash technique of in 1% of ascetic orcein solution. Anthers of two pepper accessions had been inoculated in MS medium with the 2,4-D concentrations (0, 0,5, 1,0, 1,5 and 2,0 mg.L⁻¹) induce haploids androgenesis. In the study of genetic diversity, the DNA of 29 pepper accessions was extracted and submitted to the amplification with 10 primers. The results showed that the macrospore development in anthers was not synchronous, since that was possible to observe the presence of different development stadiums of in the same anther. With accession 43 (*C. annuum*) 80% of calogenesis was take using 2 mg.L⁻¹ of 2.4-D, while in accession 40 (*C. chinense*) the formation of callus, using 1,5 mg.L⁻¹ of 2.4-D, was 66,6%. The regeneration of embryos was not possible. The genetic diversity, the values of distance between pairs of individuals was, respectively minim and maxime, 0,05 the 1,00 (between the accesses 75 and 76). RAPD markers was not efficient in grouping the different species of *Capsicum*. The information taken in this study had as practical use for mapping of the pepper genome, as well as for the breeding programs. In the choice of the parents for populations mapping is needs evaluation of the polymorphism level between the parental.

Key words: *Capsicum*, microspore, calogenesis, RAPD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Protocolo de extração de DNA de pimenta	26
FIGURA 2 -	Perfil do o DNA extraído de acessos de pimenta, onde se observa um grande arraste do material por toda a extensão do gel, a numeração corresponde aos acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR.....	27
FIGURA 3 -	DNA de acessos de pimentas após a padronização, observa-se uma maior homogeneidade do material, a numeração corresponde aos acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR.....	28
FIGURA 4 -	Características do botão floral e da antera em relação ao estágio do desenvolvimento do micrósporo em <i>C. chinense</i>	32
FIGURA 5 -	Distribuição dos estágios de desenvolvimento de micrósporo em relação aos valores médios dos comprimentos de botão e antera. As médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	34
FIGURA 6 -	Desenvolvimento assincrônico do micrósporo em <i>C. chinense</i> , pode-se observar a presença de uma tétrade com a camada de calosa (1), uma tétrade desprovida da camada de calose (2) e um micrósporo uninucleado proveniente de uma mesma antera	35
FIGURA 7 -	Microsporogênese em <i>Capsicum</i> : observa-se a presença de célula-mãe do micrósporo (A); uma célula-mãe em metáfase (B); micrósporos em estágio de díade (C); díade em metáfase (D); tétrades (E); tétrade com a ausência da camada de calose (F); micrósporos uninucleados (G).....	36
FIGURA 8 -	Calos obtidos a partir da inoculação de anteras de <i>Capsicum</i> : (A) acesso 43, <i>C. annuum</i> ; (B) acesso 40 <i>C. chinense</i> , no detalhe uma antera em tamanho normal.....	39
FIGURA 9 -	Gel de agarose a 1,2% mostrando o produto de amplificação de 20 acessos de <i>Capsicum spp</i> obtido com o primer UBC 228.....	42
FIGURA 10-	Dendrograma dos 29 acessos de <i>Capsicum spp.</i> obtido pelo método de UPGMA. Ca, <i>Capsicum annuum</i> ; Cb, <i>Capsicum baccatum</i> ; Cc, <i>Capsicum chinense</i> ; e Cf, <i>Capsicum frutescens</i>	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Acessos do banco de germoplasma que foram utilizados na indução androgenética.....	22
TABELA 2 -	Genótipos do BGH UFRR utilizados no estudo da diversidade genética.....	23
TABELA 3 -	Concentrações de 2,4 D para formação de calos em pimenta em mg.L ⁻¹	25
TABELA 4 -	Lista dos <i>primers</i> utilizados na amplificação de DNA de pimenta, com as respectivas seqüências.....	28
TABELA 5 -	Estádio de desenvolvimento do micrósporo associado comprimento e diâmetro do botão floral, comprimento das pétalas, comprimento das sépalas e do comprimento da antera, em mm.....	31
TABELA 6 -	Resumo da análise de variância entre os tratamentos célula-mãe de micrósporo, tetrade e micrósporo uninucleado em relação as variáveis: comprimento do botão floral (CBF) e comprimento da antera (CAN).....	33
TABELA 7 -	Resumo da análise de variância entre o número de calos produzidos em resposta aos tratamentos de concentração de 2,4-D na indução de calos em acessos de pimentas.....	37
TABELA 8 -	Comparação entre as médias do número de calos obtidos em resposta às diferentes concentrações de 2,4-D utilizados na indução de calos em pimentas em mg.L ⁻¹	38
TABELA 9 -	Percentual de calogênese por tratamento em anteras de <i>Capsicum spp.</i>	40
TABELA 10 -	Acessos de <i>Capsicum</i> do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima que foram amplificados pelos 08 <i>primers</i> utilizados.....	41
TABELA 11 -	Matriz de distância genética entre 29 pares de acessos de pimenta obtida com base na distancia de Nei e Li.....	43

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTAS DE TABELAS	
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Microsporangênese.....	14
1.2	Androgênese.....	16
1.3	Marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA – DNA polimórfico amplificado ao acaso).	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Material vegetal.....	22
3.2	Desinfestação.....	22
3.3	Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo.....	24
3.4	Cultura de anteras.....	24
3.5	Extração do DNA.....	25
3.6	Determinação da concentração do DNA genômico.....	27
3.7	Padronização do DNA para RAPD.....	27
3.8	Análise dos produtos da RAPD.....	29
3.9	Análise dos dados moleculares.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Associação entre o comprimento do botão floral e da antera e o estágio de desenvolvimento do micrósporo.....	31
4.2	Microgametogênese em <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	34
4.3	Calogênese em anteras de pimentas.....	37
4.4	Análise da diversidade genética entre 29 acessos de pimenta por meio de marcador RAPD.....	41
5	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A família Solanaceae apresenta cerca de 90 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. São plantas cosmopolitas e amplamente distribuídas nas regiões tropicais e nas zonas temperadas (BARROSO, 1991). Dentre os gêneros desta família alguns se destacam pelo uso na alimentação humana: *Solanum* (batata, jiló e berinjela), *Lycopersicon* (tomate), *Capsicum* (pimentas e pimentões) e *Cyphomandra* (tomate francês originário da América central) (JOLY, 1987).

O gênero *Capsicum* é um dos mais importantes dessa família, apresentando cerca de 25 espécies, sendo apenas cinco cultivadas: *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens*. No Brasil, somente *C. pubescens* não é produzida (LINS et al., 2001). A maioria dessas espécies tem como centro de origem os países da América do Sul, com exceção de *C. annuum*, cuja origem é o México e a América Central. Todas as espécies cultivadas possuem espécies selvagens afins com as quais podem permutar genes, no Brasil são encontradas algumas espécies selvagens, com destaque para três: *C. praetermissum*, *C. buforum*, *C. schottianum* (CASALI; COUTO, 1984).

O centro de origem da espécie *C. chinense* é o mesmo de *C. frutescens*. Sendo que a maior diversidade de *C. chinense* existe na Bacia Amazônica. Nesta espécie, são conhecidas as pimentas “de cheiro”, “de bode”, “murupi” e “olho de peixe”, sendo possivelmente a espécie cultivada mais importante da região andina e da América do sul (IBPGR, 1983). Pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) são importantes produtos do mercado de hortaliças frescas no Brasil. Destacam-se mundialmente como base para o desenvolvimento de condimentos e temperos em escala doméstica e industrial (CASALI, 1984; RIBEIRO et al., 2003).

Os frutos das pimentas picantes estão cada vez mais presentes na dieta dos países das regiões tropicais das Américas, da África e da Ásia. As pimentas doces são preferidas por consumidores das regiões temperadas como a Europa e a América do Norte. *C. annuum* é provavelmente a mais cultivada das espécies do gênero, nessa espécie incluem-se os pimentões e cultivares de pimentas, algumas das quais ornamentais (PICKERSGILL, 1997).

O cultivo de *Capsicum* ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria. Para que seja possível o crescimento deste agronegócio, é fundamental o aumento da produtividade agrícola mediante o desenvolvimento de cultivares de diferentes tipos de

pimenta com resistência múltipla a doenças e com características agrônômicas e industriais de interesse (RIBEIRO et al., 2003).

A sensação organoléptica de ardência é produzida pela presença de alcalóides (capsaicinóides) contidos na placenta e nas sementes de seus frutos (BOSLAND, 1993). Pimentas deste gênero são uma excelente fonte de β -caroteno e nutrientes (proteínas, glicídios, lipídeos, minerais, vitaminas A e C, água e celulose), que quando em proporções adequadas na dieta, são capazes de assegurar a manutenção das funções vitais do organismo, suprimindo as suas necessidades de produção de energia, de elaboração e manutenção tecidual e de equilíbrio biológico. Todos esses componentes são encontrados nos frutos de *Capsicum* em quantidades variáveis (REIFSCHNEIDER, 2000).

Na Amazônia brasileira, o cultivo de pimentas do gênero *Capsicum* é uma importante fonte alternativa de geração de divisas para as populações agrícolas da região (indígenas e não-indígenas), uma vez que o Brasil e, principalmente, a Amazônia, são um importante centro secundário de espécies domesticadas desse gênero (REIFSCHNEIDER, 2000). As pimentas são muito utilizadas principalmente na alimentação das populações indígenas na “damorida”, um caldo à base de água, proteína animal e pimenta.

Em Roraima, foi possível encontrar vestígios do uso de plantas do gênero *Capsicum* entre populações locais. De acordo com Barbosa et al. (2002), foram encontradas em Roraima as quatro espécies do gênero *Capsicum* cultivadas no Brasil. Esse autor afirma que, atualmente o cultivo e a comercialização de pimentas e pimentões têm se desenvolvido bastante no Estado de Roraima, encontrando uma enorme diversidade de tamanho, forma, cor e pungência. Os morfotipos como “malagueta” (*C. frutescens*), “murupi” (*C. chinense*) e “olho de peixe” (*C. chinense*) são os mais comercializados entre as comunidades indígenas e não-indígenas. Segundo esse mesmo autor *C. chinense* foi a espécie que apresentou a maior diversidade na forma de frutos.

Geralmente, as pimentas e pimentões são plantas autógamas, com flores hermafroditas e autocompatíveis, apresentando um número diplóide de cromossomos $2n=2x=24$ (KIMBER; RILEY, 1963; PICKERSGILL, 1997).

Há entre as pimentas uma grande variabilidade, Inoue e Reifschneider (1989) descreveram 91 acessos na coleção do banco de germoplasma do CNPH (Centro Nacional de Pesquisa em Hortaliças) verificando grande diversidade entre as espécies estudadas. Dentre as espécies de *Capsicum* a que possui maior diversidade é *C. annum*, e a que possui menor variabilidade é *C. frutescens* (CASALI; COUTO, 1984). As relações evolutivas entre e dentro de populações e a variabilidade genética em pimentas, têm sido investigados em muitos

estudos usando características morfoagronômicas (RÊGO, 2001; MATOS, 2004), eletroforese de proteínas (ODEIGAH; BOH; AGHALOKOE, 1999; HERNÁNDEZ-VERDUGO; LUNAREYES; OYAMA, 2001) e via marcador molecular (PARAN, AFTERGOOT, SHIFRISS, 1998; RODRIGUES et al., 1999; LANTERI et al., 2003; OYAMA et al., 2006; COSTA et al., 2006).

Os estudos de sistemática e variabilidade genética das pimentas e pimentões têm sido baseados, principalmente, em características morfológicas, cruzamentos interespecíficos e fertilidade dos híbridos interespecíficos (RÊGO, 2001; RÊGO et al., 2001; RÊGO, RÊGO, CRUZ, 2003). Pouco se sabe sobre as espécies silvestres brasileiras, sua variabilidade genética e relações filogenéticas com as espécies conhecidas de *Capsicum*. O conhecimento biológico deste germoplasma é importante para o entendimento do gênero em sua totalidade, bem como para o desenvolvimento de estratégias apropriadas de coleta e conservação de espécies. Adicionalmente, é provável que este germoplasma contenha genes de importância agrônômica, como aqueles relacionados ao controle de resistência a doenças, produtividade e qualidade de fruto, de grande valor para o melhoramento genético vegetal. Um pré-requisito para o uso eficiente dos recursos genéticos nos programas de melhoramento de plantas é o conhecimento detalhado da extensão e distribuição da variação genética disponível nas espécies cultivadas e seus parentes silvestres. A necessidade de ampliar a base genética dos programas de melhoramento das plantas cultivadas tem aumentado o interesse no estudo da estrutura genética de populações, na filogenia e na mensuração da variabilidade genética de plantas silvestres (NASS et al., 2001).

Estudos de divergência genética são importantes para o conhecimento da variabilidade das populações e possibilitam o monitoramento de bancos de germoplasmas, pois geram informações úteis para preservação e uso dos acessos e sua utilização no auxílio aos programas de melhoramento. Esses estudos auxiliam a identificação de possíveis duplicatas, e fornecem parâmetros para escolha de progenitores, que ao serem cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie, isto é, aumentam as chances de obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes. Tais estimativas são de grande utilidade nos programas de melhoramento, e também na escolha de progenitores para mapeamento de genes (PARAN et al., 1998; CRUZ; CARNEIRO, 2003).

A conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um dos tópicos mais proeminentes na atualidade. Com elevadas taxas de destruição das comunidades naturais, a extinção de espécies é eminente, acarretando assim com perda de diversidade biológica.

Há muito tempo, a conservação dos recursos genéticos tem sido reconhecida como um componente essencial do melhoramento de plantas. Há duas formas básicas para a conservação desses recursos, *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ* a espécie é mantida em seu ambiente natural permitindo a continuidade dos processos evolutivos, quando a conservação *in situ* não pode ser implementada recorre-se a conservação *ex situ*. Porém acredita-se que na conservação *ex situ* a variabilidade genética ainda está muito longe de contemplar uma amostra significativa da variabilidade da espécie (WITTERS; WILLIANS, 1999).

A manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo pode causar muitas injúrias: a planta é exposta ao ataque de pragas e variação de clima, além de necessitar de grandes áreas e muita mão-dobra. A manutenção de culturas *in vitro* vem se mostrando uma excelente ferramenta para a conservação dos recursos genéticos de plantas, uma vez que requer espaços menores, e pouca mão-de-obra. Entretanto, este tipo de conservação é muito delicado sendo também vulnerável, o material pode facilmente ser perdido devido à contaminação microbiana, acidentes ou falha nos equipamentos, além da variação somaclonal. A técnica de conservação *in vitro* que vem sendo cada vez mais utilizada é a criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C), nessa temperatura, todos os processos metabólicos, como a respiração e a atividade enzimática, são inativados (WITTERS; WILLIANS, 1999).

Em recente revisão sobre as pimentas utilizadas por diferentes comunidades do estado de Roraima, Barbosa et al. (2002) descreveram o uso e o cultivo das quatro espécies produzidas no Brasil. A caracterização morfológica de acessos de pimentas no estado de Roraima foi realizada por Matos (2004), que realizou um estudo caracterizando 69 acessos do banco de germoplasma da UFRR (Universidade Federal de Roraima). Em estudo realizado sobre a diversidade genética e importância de caracteres de pimenta por Matos et al. (2003) e Portela et al. (2003), as características que menos contribuíram com a divergência genética observada, foram comprimento do pedúnculo e o menor diâmetro do fruto e as que mais contribuíram foram o maior diâmetro do fruto e o peso médio do fruto.

O melhoramento de espécies de pimenta tem sido realizado por meio de seleção massal, através da seleção inconsciente, onde as plantas mais adaptadas a uma determinada região geográfica são selecionadas para a obtenção de sementes. Hoje em dia, os programas de melhoramento dessas espécies vem introduzindo o uso da biotecnologia, o qual objetiva a obtenção de variedades mais produtivas e mais resistentes a doenças e pragas (BOSLAND; VOTAVA, 2000).

O gênero *Capsicum* é amplamente cultivado em vários países do mundo, e é uma das culturas que movimentam agricultura familiar em várias regiões do Brasil. No mundo inteiro são plantados mais de 3.000.000 ha ao ano. No Brasil, a área de produção é estimada em 13.000 ha, com produção anual em torno de 280.000 t.ano⁻¹. Pimentas deste gênero cultivadas em Roraima possuem uma enorme diversidade de formas, de cor e de nível de ardência. As pimentas malagueta, murupi e olho-de-peixe são as usadas com maior intensidade e volume nas comunidades indígenas locais. Os plantios variam de 2.000 a 5.000 pés.ha⁻¹, sempre em unidades familiares. A produção é vendida no mercado local *in natura* ou na forma de molhos e, também, em pó. O agronegócio tem crescido muito entre os feirantes, demonstrando ser atraente para produtores, vendedores e consumidores. A demanda de mercado é cada vez maior, o que impulsiona os novos plantios. Por serem muito cultivadas, as pimentas apresentam problemas sanitários dentre as quais existem doenças bacterianas, fúngicas, viróticas, entre outras. É necessário melhoramento genético dessas plantas visando a produção de novas variedades que apresentem resistência contra algumas dessas doenças.

O conhecimento prévio das características dos acessos que compõe um banco de germoplasma é de fundamental importância, com esse conhecimento prévio pode-se prever quais os melhores acessos a serem utilizados em determinado trabalho, pesquisa ou na criação de uma nova variedade.

Depende-se de muitos recursos e tempo para se conseguir uma nova variedade pelo sistema convencional de melhoramento, que envolve vários ciclos de autofecundação para a obtenção de homozigose num processo que pode levar anos. Na cultura de anteras se obtêm uma planta haplóide em apenas um ciclo. Nessas plantas é fácil de se identificar mutações e características que sejam favoráveis, auxiliando os programas de melhoramento.

1.1 Microsporogênese

A meiose é um evento de alta estabilidade evolucionária cujo produto final das divisões nucleares culmina na formação de células com a metade do número de cromossomos do núcleo diplóide original. As conseqüências genéticas desse processo são importantes devido à permutação que ocorre entre os cromossomos, que possui segmentos originados de ambos parentais, o que leva a um enorme potencial de variabilidade genética (GRIFFITHS et al., 2001).

Nos vegetais, um curso normal e harmônico da meiose leva a formação de gametas viáveis. O grau de fertilidade das plantas é demonstrado pelo comportamento meiótico, sendo a formação de gametas funcionais controlada por genes que garantem um processo meiótico normal. Entretanto, os genes podem sofrer mutações, ocasionando irregularidades que comprometem a fertilidade dos indivíduos. As mutações meióticas que afetam o pareamento cromossômico são importantes, pois podem levar à esterilidade total ou à formação de indivíduos poliplóides e aneuplóides. Desse modo, a determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas da infertilidade das plantas, assim como para o conhecimento do potencial de reprodução de uma população e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (KALTCHUK-SANTOS; BONDANESE-ZANETINNI, 2002).

Dois processos distintos levam à formação do microgametófito, a microsporogênese que culmina com a formação dos micrósporos (grãos de pólen uninucleados) dentro dos sacos polínicos, e a microgametogênese que é o desenvolvimento do microgametófito dentro do grão de pólen maduro. Inicialmente a antera é formada por várias camadas de células estéreis, seguindo-se de uma diferenciação em quatro grupos de células férteis, as esrógenas que dão origem à célula mãe do micrósporo. Dentre as células estéreis encontra-se o tapetum, conjunto de células nutritivas, mais internas do saco polínico. Essas células suprem a necessidade de alimento dos micrósporos em desenvolvimento. A célula mãe se divide meioticamente dando origem a tétrades de micrósporos haplóides. A microsporogênese se completa com a formação de micrósporos uninucleados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Nas angiospermas, são conhecidos geralmente tipos básicos de microsporogênese: sucessiva e simultânea. Na microsporogênese sucessiva, uma parede calose que separa as duas células filhas é formada após a primeira divisão meiótica, este é conhecido como estágio de díade. As tétrades que resultam da divisão sucessiva são tetragonal (ou isobilateral). Na microsporogênese simultânea, a segunda divisão meiótica segue-se imediatamente à primeira, sem formação de parede até que quatro núcleos estejam presentes. As tétrades resultantes são tetraédricas (FURNESS; RUDALL, 1999).

Muitos autores, na tentativa de monitorar o processo de divisão meiótica, tentam associar o tamanho do botão floral com as diferentes fases meióticas ou estádios de desenvolvimento do grão de pólen (SOUZA, PEREIRA, 2000; LAUXEN et al., 2003). Esse tipo de informação é importante para o sucesso de pesquisas que envolvem a técnica de cultura de anteras, em que um dos pontos de entrave é o estágio da microgametogênese, uma vez que, para a maioria das espécies, é necessária a manipulação da célula gamética uninucleada (KALTCHUK-SANTOS; BONDANESE-ZANETINNI, 2002).

Um importante fator para o sucesso da cultura de anteras é conhecer para cada cultura o estágio ideal de desenvolvimento das anteras a serem cultivadas, de maneira que este estágio contenha os micrósporos em uma fase de desenvolvimento de melhor resposta androgênica, que geralmente são os micrósporos recém liberados da tétrade meiótica até no máximo, estágio binucleado, pois Grando e Moraes-Fernandes (1997) sugerem que o potencial embriogênico do grão de pólen pode ser determinado tanto no período da meiose como no período da pré-mitose do micrósporo, pois nestes dois momentos o micrósporo ainda teria metabolicamente características esporofíticas, o que permite a diferenciação do grão de pólen em embrião e posterior formação de uma planta.

1.2 Androgênese

A androgênese é o fenômeno no qual um grão de pólen é capaz de alterar sua rota de desenvolvimento e originar um esporófito haplóide. Este processo ontogenético alternativo ainda é pouco conhecido, apesar de sua potencialidade tanto para estudos básicos como àqueles aplicados para melhoramento de plantas (KALTCHUK-SANTOS; BONDANESE-ZANETINNI, 2002).

Quando inoculadas em meio nutritivo, as anteras deixam a rota gametofítica normal e toma uma nova rota atingindo um padrão esporofítico de desenvolvimento onde os gametas masculinos deixam de ser produzidos, e os micrósporos desenvolvem pré-embriões ou calos (GEORGE, 1993). A indução androgênica tem sido realizada em várias espécies de plantas, obtendo uma progênie F_1 de indivíduos haplóides que são muito utilizados em programas de melhoramento e em estudos genéticos, devido à presença de somente um dos conjuntos dos cromossomos do indivíduo diplóide, do qual a planta se origina (REED, 2000a). A cultura de anteras, através da androgênese, é atualmente a técnica mais utilizada para a obtenção de indivíduos haplóides em várias famílias de plantas como cereais, crucíferas e solanáceas (PETERS; BOBROWKI; ROSINHA, 1999; MORAES-FERNANDES et al., 1999). Porém uma planta haplóide só terá metade do seu genoma, constituindo assim, um indivíduo estéril. Algumas plantas apresentam duplicação cromossômica espontânea, em outras essa duplicação pode ser induzida através da aplicação de colchicina, uma droga antimicrotúbulo que impede a formação do fuso durante a mitose (ZHAO; SIMMONDS; NEWCOMB, 1996; FOISSET et al., 1997; REDHA et al., 1998).

A cultura de micrósporos isolados, também tem sido muito utilizada para a obtenção de haplóides em muitas cultivares de brássicas (ZHAO; SIMMONDS; NEWCOMB, 1996), arroz (RAINIA; IRFAN, 1998), cevada (RYAN et al., 1999), e trigo (HOLME et al., 1999). Segundo George (1993), a cultura de anteras é mais favorável a embriogênese que a cultura de micrósporos isolados. Entretanto, Höfer (2004) afirma que a cultura de micrósporos pode obter resultados bastante expressivos na embriogênese em diferentes genótipos de maçã em relação à cultura de anteras.

O número de espécies nas quais a cultura de anteras tem resultado em plantas haplóides é relativamente baixo compreendendo 70 espécies na década de 70, e 121 espécies ou híbridos na década de 80, sendo que cerca da metade dos relatos de embriogênese via cultura de anteras são atribuídos a espécies pertencentes à família Solanaceae (GEORGE, 1993). Em leguminosas, há uma grande dificuldade na aplicação da androgênese (KALTCHUK-SANTOS; BONDANESE-ZANETINNI, 2002), embora não sejam conhecidos os motivos.

A homozigose alcançada por essa técnica é uma excelente ferramenta para os melhoristas. No sistema convencional de melhoramento nas autógamas, são necessários vários ciclos (entre 7 e 8 ciclos) de auto-fecundação para o estabelecimento da homozigose, além de ser um processo muito trabalhoso e demorado, principalmente quando se trata de uma cultura de ciclo de vida longo, onde são necessários vários anos para a obtenção da homozigose (KALTCHUK-SANTOS; BONDANESE-ZANETINNI, 2002).

Segundo Grando e Moraes-Fernandes (1997) existem dois pontos que determinam a resposta androgenética, o primeiro ponto é o início da meiose e o segundo é o estágio uninucleado do micrósporo. Segundo Reynolds (1990 apud LUZ; PINTO; PEREIRA, 2000) a indução da embriogênese inicia-se 6 horas após a inoculação das anteras em meio nutritivo.

Vários fatores influenciam na resposta androgenética, tais como o genótipo, as condições da planta doadora, o estágio de desenvolvimento do micrósporo, o pré-tratamento, a cultura e o meio. Dentre esses fatores o mais crítico é o estágio de desenvolvimento do micrósporo, sendo que o estágio uninucleado do micrósporo é o mais apropriado na resposta androgenética (REED, 2000a). Segundo Zagaroska et al. (1998) em tomate, o genótipo é o fator que mais afeta a androgênese. A combinação de vários meios de cultura com pré-tratamento a frio, pode resultar em altas taxas de embriogênese em anteras (NURHIDAYGAH et al., 1996).

O tabaco possui vários genótipos responsivos a haploidização via cultura de anteras, por isso é a planta mais estudada até hoje empregando essa tecnologia. Nessa espécie quando

as pétalas têm o mesmo comprimento das sépalas, as anteras usualmente apresentam micrósporos uninucleados (REED, 2000b), esse fato também é observado em pimentão (LUZ; PINTO; PEREIRA, 2000). Para confirmar se as plantas regeneradas são haplóides, as metodologias mais empregadas são a contagem do número de cromossomos de células da ponta da raiz ou de outros tecidos meristemáticos e a contagem do número de cloroplastos das células-guarda (REED, 2000a; REED, 2000b).

Um dos problemas da cultura de anteras é a regeneração de plantas a partir de tecidos somáticos das mesmas, sendo necessário a determinação da origem dos regenerantes, para tanto, recomenda-se a utilização de marcadores moleculares (NURHIDAYGAH et al., 1996). Segundo Rizza et al. (2002) marcadores baseados em RAPD e isoenzimas são apropriados para checar a condição híbrida e a origem de plantas obtidas por cultura de anteras.

1.3 Marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA – DNA polimórfico amplificado ao acaso).

Os marcadores genéticos podem ser fenotípicos ou moleculares, os primeiros correspondem à expressão do genótipo e da interação do genótipo com o ambiente. Os marcadores moleculares detectam o polimorfismo diretamente no DNA, descartando assim a influência do ambiente. Os marcadores baseados em DNA variam de acordo com a habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência. Esses tipos de marcadores permitiram uma ampla cobertura do genômica tornando-se poderosas ferramentas para o estudo de genética (SOUZA, 2001; ZUCHI, 2002).

Nas últimas décadas, os marcadores moleculares tem sido de importância fundamental nos estudos de melhoramento, diversidade genética em muitas áreas da biologia e da agronomia. Muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade molecular para populações de plantas, incluindo a identificação de: isoenzimas, RFLP (restriction fragment length polymorphism – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) e AFLP (polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados) (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1995).

Os marcadores baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase) têm sido os mais utilizados. A reação em cadeia da polimerase resulta da amplificação enzimática *in vitro* de milhões de cópias específicas de DNA na presença de uma enzima DNA polimerase e partir de um oligonucleotídeo conhecido *primer*. Esse processo se baseia em três passos básicos: a

desnaturação térmica do DNA, o anelamento do *primer* no DNA molde, e a extensão do *primer* pela DNA polimerase na presença de DNTPs (SAIKI et al., 1985). Primeiramente, essa técnica utilizava o fragmento termosensível Klenow (de *Escherichia coli*) que era adicionado à reação após cada ciclo. Um dos grandes passos dessa técnica foi a descoberta da DNA polimerase de *Thermus aquaticus* que é termoestável e da automatização dos ciclos de amplificação de DNA (AZEVEDO et al., 2003).

Marcadores RAPD têm sido muito utilizados no estudo de populações naturais e de coleção de germoplasma nos últimos anos, sendo tecnicamente mais simples que outros tipos de marcadores. Williams et al. (1990) foram os primeiros a descrever os marcadores RAPD. Na mesma época um outro grupo publicou um trabalho com o mesmo princípio e denominaram a técnica de AP-PCR (Arbitrarily primed-polymerase chain reaction) (WELSH; MCCLELLAND, 1990). Essa técnica com utilização de *primers* arbitrários ficou mais comumente conhecida como RAPD, que é a denominação mais encontrada na literatura.

Esses marcadores são utilizados em nível de DNA, e usam *primers* curtos e de seqüência arbitrária, o que elimina a necessidade do conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos da região onde vai ocorrer o anelamento dos *primers*. Desde a sua descrição, a técnica de RAPD tem sido muito utilizada em análise genética e melhoramento de plantas. Dentre as suas aplicações temos: obtenção de “fingerprints” genômico, a análise de estrutura e diversidade de populações naturais, de melhoramento e de bancos de germoplasma. Uma das características dos marcadores RAPD é o fato de se comportar como um marcador dominante, onde ao se observar uma banda no gel, não é possível se distinguir se ela originou-se de uma ou de duas cópias amplificadas. Ao compararmos a técnica de RAPD com as demais, ela apresenta várias vantagens em relação às outras: simplicidade, rapidez, não requer o uso de sondas radioativas, necessita de pouca quantidade de DNA (apenas algumas dezenas de nanogramas), permite gerar grande quantidade de polimorfismo em seguimentos de DNA por todo o genoma do organismo, além de ser mais barata e pode ser aplicável a qualquer espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). O número de fragmentos de DNA que são amplificados vai depender do *primer* e do DNA genômico utilizado. Uma simples substituição de um único nucleotídeo em um *primer* resulta em uma completa mudança no padrão de bandas produzidas, isso é uma indicação da sensibilidade do sistema (GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 1995; SOUZA, 2001).

Em plantas, os marcadores RAPD têm facilitado a realização de estudos em genética e melhoramento, até então, considerados inexequíveis com as técnicas tradicionais. A utilização de marcadores moleculares RAPD proporciona a análise da variabilidade genética, gerando

informações que podem ser aplicadas em programa de melhoramento genético e contribuem na seleção de acessos para formação de banco de germoplasma. Os dados gerados por esse tipo de marcador (RAPD) normalmente são interpretados como: bandas em comum entre genótipos representam similaridades genéticas, enquanto que bandas não comuns representam diferenças genéticas. Deve-se ter cuidado, na técnica de RAPD, a homologia de seqüência ocorre apenas na região onde o *primer* hibridiza. Por tanto, dois segmentos RAPD amplificados com o mesmo *primer* e que possuam a mesma distância de migração eletroforética podem ser caracteres homólogos ou homoplásticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Em função de alelismo entre diferentes fragmentos e/ou ligação gênica entre marcadores, a premissa de independência dos caracteres não é inteiramente satisfeita à medida que um maior número de marcadores é utilizado. Diversos métodos estatísticos como a análise multivariada, podem ser aplicados sobre matrizes de coeficientes de distância ou similaridade para análise e apresentação destes tipos de dados. Dependendo do tipo de marcador utilizado, a interpretação de fragmentos no gel com a mesma distância de migração eletroforética pode, ocasionalmente, apresentar problemas. Os marcadores RFLP, por exemplo, são detectados através da hibridização com sondas de DNA. Os fragmentos detectados por estas sondas compartilham de extensiva homologia de seqüência.

Em *Capsicum* os marcadores baseados em RAPD têm sido utilizados principalmente no estudo de diversidade genética entre as cultivares e na diferenciação entre os híbridos (PARAN; AFTERGoot; SHIFRISS, 1998; BOSLAND; VOTAVA, 2000), em estudos de fertilidade (BAOXI et al., 2000). Segundo Paran, Aftergoot e Shifriss (1998) o percentual de polimorfismo causado por marcadores RAPD em *C. annuum* é satisfatório para o estudo de variabilidade genética entre os indivíduos. Esses marcadores também vêm sendo utilizados no estudo de variabilidade genética dentro de espécies de *Capsicum* (RODRIGUEZ et al., 1999).

Essa técnica tem sido utilizada na comparação de estrutura genética de populações selvagens e domesticada, apresentando diferenças claras entre as duas populações (OYAMA et al., 2006), além da caracterização de banco de germoplasma por todo o mundo (LANTERI et al., 2003; COSTA et al., 2006). Em Roraima, essa técnica foi utilizada por Santos (2004), no estudo da variabilidade genética entre 15 acessos da coleção de germoplasma de pimenta da UFRR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a androgênese e a diversidade genética de acessos de pimenta (*Capsicum* spp.).

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Relacionar o tamanho do botão floral com o estágio de desenvolvimento do micrósporo;
- ✓ Induzir androgênese em pimentas;
- ✓ Analisar a diversidade genética de acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR, utilizando marcadores do tipo RAPD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Na determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo, foram utilizadas apenas anteras do acesso 40 (*C. chinense*). No experimento da androgênese, foram utilizadas anteras de dois acessos de pimentas do banco de germoplasma da UFRR (tabela 1). Essas plantas utilizadas foram cultivadas em vasos sob condições de estufa. Botões florais de vários comprimentos foram coletados das plantas e acondicionados em caixa térmica com gelo e levadas para laboratório. Para a extração de DNA, a ser utilizado no estudo da diversidade genética, foram utilizadas folhas jovens de 46 acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR (tabela 2).

Tabela 1. Acessos do banco de germoplasma que foram utilizados na indução androgenética.

Acesso	Espécie	Característica
Acesso 43	<i>C. annuum</i>	Fruto vermelho pequeno com baixa pungência
Acesso 40	<i>C. chinense</i>	Fruto pequeno redondo amarelo com alta pungência

3.2 Desinfestação

Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram desinfestados, primeiramente mergulhou-se os botões florais em etanol a 70% por 1 min e em seguida foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 5 min contendo três gotas de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) sendo, posteriormente enxaguados por três vezes em água destilada deionizada e autoclavada (DDA). Sob luz de um microscópio estereoscópio MODELO OLYMPUS SZ40 em aumento de 40 vezes, as anteras foram extraídas dos botões que foram cortados com uma incisão em um dos seus lados. Posteriormente removeram-se os estames com auxílio de pinças finas e bisturi, previamente autoclavados. As anteras foram assepticamente retiradas do botão floral e inoculadas em meio nutritivo.

Tabela 2. Genótipos do BGH UFRR utilizados no estudo da diversidade genética.

Acessos (n°)	Espécie	Local de Coleta	Ano de Coleta
03	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
05	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2001
06	<i>C. baccatum</i>	Iracema	2002
07	<i>C. chinense</i>	Iracema	2002
08	<i>C. chinense</i>	Iracema	2002
09	<i>C. chinense</i>	Alto Alegre	2002
20	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
21	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
22	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2001
23	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2001
24	<i>C. frutescens</i>	Iracema	2002
25	<i>C. chinense</i>	Baixo Rio Branco	2002
27	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
30	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
31	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
32	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2001
33	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
34	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
37	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
38	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
39	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
40	<i>C. chinense</i>	Iracema	2002
43	<i>C. annuum</i>	Boa Vista	2002
44	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
45	<i>C. annuum</i>	Viçosa	2001
49	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
51	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
52	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
55	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
56	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
58	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
59	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
60	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
61	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
64	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
65	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
67	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
68	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
69	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
70	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
71	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
72	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
73	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
74	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
75	<i>C. frutescens</i>	Boa Vista	2002
76	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002

3.3 Determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo

Botões florais de vários tamanhos foram coletados aleatoriamente em 3 plantas do acesso 40 e levados ao laboratório. Com auxílio de um paquímetro (precisão 150x0.02mm) em milímetros, foram tomadas medidas de comprimento e diâmetro dos botões florais, do comprimento da antera, do comprimento da pétala e da sépala. O estágio de desenvolvimento do micrósporo foi determinado pela técnica squash, que consistiu na retirada das anteras do botão floral e colocá-las sobre uma lâmina limpa onde se adicionou uma gota de orceína acética. O preparado foi coberto por uma lamínula, e foi exercida uma pressão sobre a mesma de modo que a antera fosse rompida e os micrósporos expelidos para o exterior, em seguida o material foi levado para análise em microscópio óptico BIOVAL (640X). O experimento foi realizado em DIC (delineamento inteiramente casualizado) com 3 repetições. A análise de variância foi realizada com teste F a 1% de probabilidade, e para o teste de médias foi utilizado o teste de Tukey a 5%. A análise estatística foi realizada mediante o uso do software GENES (CRUZ, 2001).

3.4 Cultura de anteras

Após a determinação do estágio de desenvolvimento do micrósporo e desinfestação, das anteras contendo micrósporos uninucleados (pertencentes aos acessos 40 e 43), estas foram inoculadas em placas de Petri de poliestireno, 90 mm de diâmetro, contendo 25 ml de meio previamente esterilizado em autoclave. O meio utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) pH 5.7 suplementado com 2,4 D (Ácido diclorofenoxiacético) em várias concentrações (0; 0,5mg.L; 1 mg.L; 1,5 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) para a formação de calos (tabela 2). As anteras foram armazenadas em sala escura por 7 dias, em seguida foram transferidas para outro meio contendo os mesmos sais e vitaminas do meio MS que foram suplementados com reguladores de crescimento: 0,5 mgL⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) e 0.5mgL⁻¹ de 2ip (2-isopenteniladenina) pH 5.8, para a regeneração de embriões (ZAGAROSKA et al. 1998). O experimento foi em fatorial simples, totalizando 10 tratamentos (2x5) com 3 repetições. A análise de variância será realizada com teste F a 1% de probabilidade, e para o teste de médias foi utilizado o teste de Tukey a 1%. A análise estatística foi realizada mediante o uso do software GENES (CRUZ, 2001).

Tabela 3. Concentrações de 2,4 D para a formação de calos em pimenta em mg.L⁻¹

Tratamento	Concentração
T1	0,0
T2	0,5
T3	1,0
T4	1,5
T5	2,0

3.5 Extração do DNA

Folhas jovens de 46 genótipos (tabela 3) foram coletadas, três plantas por acesso, no qual foi coletada uma folha de cada planta, e encaminhadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Biofábrica da Universidade Federal de Roraima - UFRR.

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Grattapaglia e Ferreira (1995), com modificações (figura 1). Cerca de 200mg de cada amostra foi macerada no cadinho utilizando pistilo (previamente congelados) até formar um pó que foi depositado em tubos de Eppendorf de 1,5 µL, os quais receberam identificação individual. Foi adicionado em cada tubo 600 µL do tampão de extração. Este material foi levado ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, e foram agitados manualmente a cada 5 minutos. Em seguida, o material foi retirado do banho-maria, permanecendo em temperatura ambiente, para que ocorresse o resfriamento do mesmo.

Após o resfriamento, foi adicionado em cada tubo 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 (v:v)), foram agitados manualmente por 5 minutos invertendo-os aproximadamente 20 vezes. Os tubos foram centrifugados a 7.000 rpm durante 5 minutos. Com cuidado os tubos foram retirados da centrífuga e pipetado o sobrenadante que foi colocado em um novo tubo de mesma capacidade; foi adicionado 600 µL de isopropanol gelado (-20°C) em cada tubo misturado por inversão dos tubos. Em seguida foi centrifugado a 7.000 rpm durante 15 minutos para a formação do pellet no fundo do tubo. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300µL de álcool a 70%, para limpeza do pellet, e levou-se novamente o material para ser centrifugado a 7.000 rpm por 15 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado. Essa etapa foi repetida com álcool na concentração de 95% e centrifugado por 5 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e os tubos foram levados à câmara de fluxo laminar por 20 minutos para secagem completa do pellet. Finalizando a etapa de extração do DNA, foi adicionado 100 µL de água DDA em cada tubo que foram colocados no freezer a -20°C até o uso.

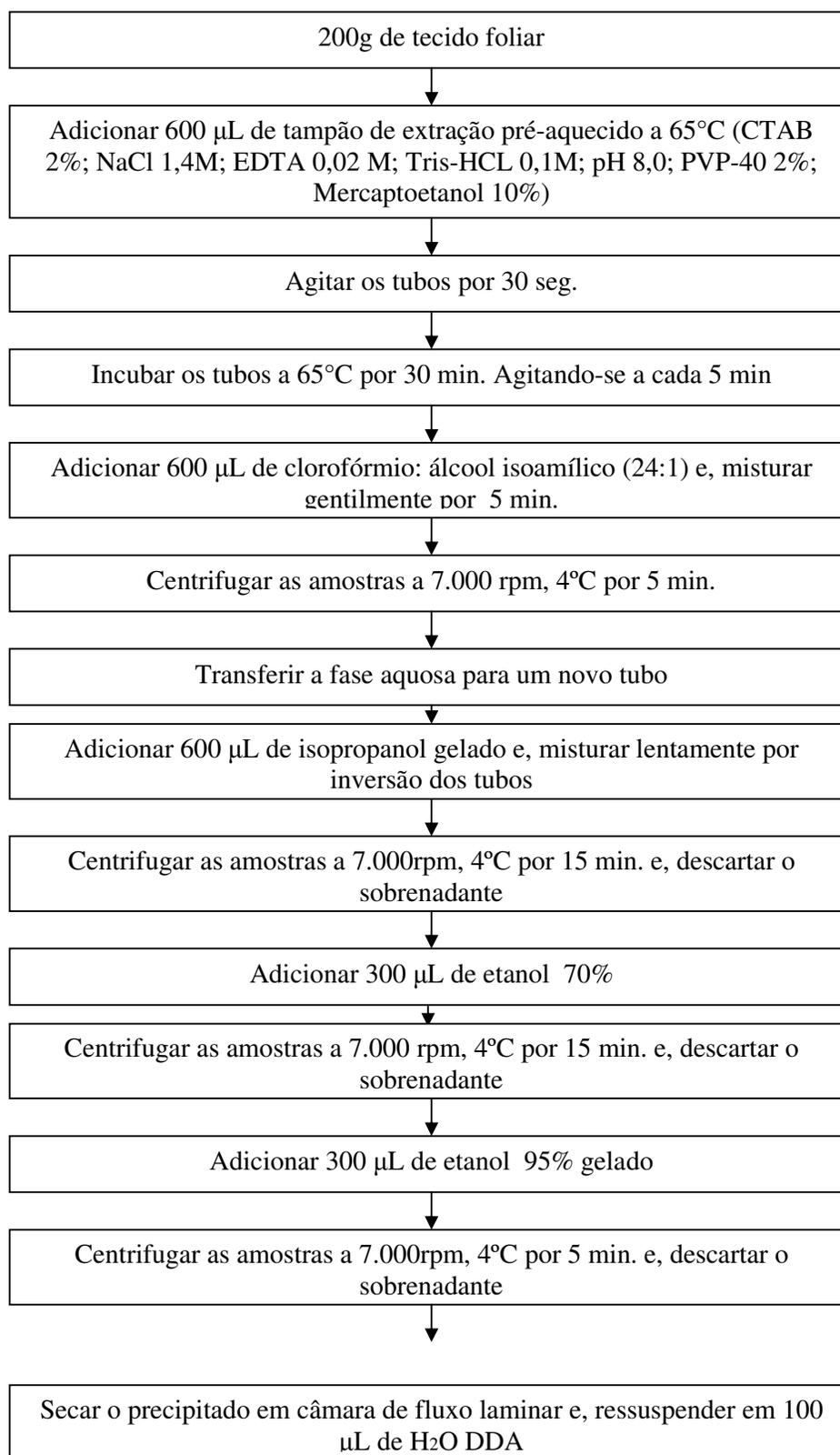


Figura 1. Protocolo de extração de DNA de pimenta.

3.6 Determinação da concentração do DNA genômico

Para determinação da concentração do DNA genômico, uma alíquota de 2 μL de cada amostra dos genótipos foi preparada adicionando-se 5 μl de água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) e 3 μl de tampão de corrida, em seguida foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 0,8%, utilizando como padrão uma concentração de DNA de $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ (figura 2).

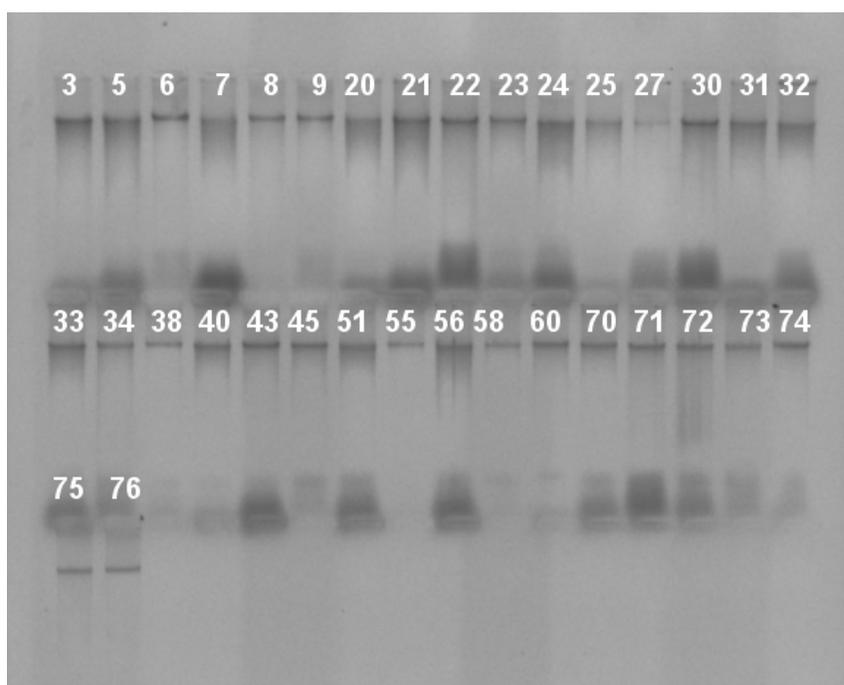


Figura 2. Perfil do o DNA extraído de acessos de pimenta, onde se observa um grande arraste do material por toda a extensão do gel, a numeração corresponde aos acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR.

3.7 Padronização do DNA para RAPD

Após a determinação da concentração do DNA de cada amostra, foi realizada uma padronização para uma concentração final de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, por meio de sucessivas diluições das amostras (figura 3).

Para a reação de amplificação foi utilizada alíquotas de 30 μL contendo: 10,6 μL de água (DDA), 3 μL de MgCl_2 (2,5 mM), 3,0 μL de tampão 10X, 3 μL de DNTP (25 mM), 5 μL de *primers* ($5 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) e 0,4 μL de Taq DNA polimerase I ($5 \text{ u} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), e 5 μL do DNA genômico. Os tubos foram levados ao Termociclador, programado para os seguintes ciclos:

dois ciclos (94° C por 1 min; 36° C por 1 min; 72° C por 2 min) e 35 ciclos (94° C por 10 seg; 40° C por 20 seg; 72° C por 2 min) e finalmente a 72° C por 5 min, para polimerização final.



Figura 3: DNA de acessos de pimentas após a padronização, observa-se uma maior homogeneidade do material, a numeração corresponde aos acessos de pimenta do banco de germoplasma da UFRR.

Para a amplificação do DNA genômico de pimentas foram testados 10 *primers* (UBC-74, UBC -135, UBC-146, UBC-155, UBC-168, UBC-228, UBC-247, UBC-253, UBC-288, UBC-296) da Invitrogen do Brasil (tabela 4).

Tabela 4. Lista dos *primers* utilizados na amplificação de DNA de pimenta, com as respectivas seqüências.

<i>Primer</i>	Seqüência
UBC-74	5'-GAGCACGTGA-3'
UBC -135	5'-AAGCTGCGAG-3'
UBC-146	5'-ATGTGTTGCG-3'
UBC-155	5'-CTGGCGGCTG-3'
UBC-168	5'-CTAGATGTGC-3'
UBC-228	5'-GTCGGGCCGA-3'
UBC-247	5'-TACCGACGGA-3'
UBC-253	5'-CCGTGCAGTA-3'
UBC-288	5'-CGTCCTTGAC-3'
UBC-296	5'-CCGCTGGGAG-3'

3.8 Análise dos produtos do RAPD

Uma alíquota de 4 µl dos produtos amplificados através do RAPD foram transferidos para novos tubos *eppendorf* e adicionados 4 µl de água DDA, 2 µl de tampão de carregamento em seguida essa amostra foi colocada com o auxílio de uma pipeta de 10 µl em cada poço do gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1,0X e corados com brometo de etídio na concentração de 0,15 µl.ml⁻¹, em cuba de eletroforese horizontal. Utilizou-se como marcador de peso molecular o DNA Ladder – 100 pb da Invitrogen do Brasil, aplicado no início de cada gel como padrão de peso molecular, para determinação do peso molecular dos respectivos fragmentos de DNA amplificados. O desenvolvimento da eletroforese foi realizado com o gel submerso em tampão TBE 1,0 X, o mesmo usado no preparo do gel, submetido à eletroforese a 110 V por aproximadamente 1:30 hora. Depois de transcorrido o tempo, o gel foi visualizado em transiluminador UV, modelo M-20E sob luz ultravioleta (UV) e a fotografado em câmara digital canon, modelo powershot S70, as imagens capturadas foram transferidas para o computador para posterior contagem das bandas. As bandas foram contadas pela inspeção visual das fotografias do gel, atribuindo 1 para presença e 0 para ausência de bandas, esses dados binários foram submetidos a análise de distância.

3.9 Análise dos dados moleculares

Análise de agrupamento pelo método das ligações medias entre pares não ponderados (UPGMA)

Adotou-se o software genes (CRUZ, 2001) para os cálculos. Como medida de similaridade genética adotou-se o coeficiente de Nei e Li ($S = 2a/(2a + b + c)$) e para o agrupamento o método hierárquico não ponderado de agrupamento aos pares pela média aritmética (UPGMA)).

Os valores para as variáveis são:

a: quantifica o número de coincidência do tipo 1-1 para cada par de genótipo;

b: quantifica o número de discordância do tipo 1-0 para cada par de genótipo;

c: quantifica o número de discordância do tipo 0-1 para cada par de genótipo.

Esse método requer como similaridade entre dois grupos aquela dada pelos dois membros mais parecidos. Assim na matriz de distância genética $D = (dik)$ é identificado o par

mais próximo (U e V) de acessos que iriam formar o primeiro grupo UV. As distâncias entre UV e qualquer outro grupo W são determinados por:

$$d(UV, W) = (\sum \sum dik) / N_{(UV)} N_w \text{ em que:}$$

dik , é a distância entre o acesso i no grupo UV e o acesso k no grupo W;

$N_{(UV)}$ e N_w , são os números de acessos nos grupos UV e W, respectivamente.

Após calcular e identificar a distância entre os pares de acessos mais próximos, formando o primeiro grupo, adota-se o procedimento UPGMA para inclusão de novos acessos no grupo, comparando-se o acréscimo no valor médio da distância dentro do grupo e o nível máximo permitido (α) para a distância media intragrupo seja inferior a qualquer distância intergrupos.

O método UPGMA é aglomerativo e hierárquico que parte dos n acessos separados e os agrupam em conjuntos sucessivos até que na última etapa estejam agrupados em um só conjunto, cujo gráfico é o dendrograma. A técnica adota a distância entre dois grupos como a média das distâncias entre todos os pares de acessos, sendo que os pares são formados por um acesso de cada grupo. Os acessos são agrupados pela similaridade que é resultante da divergência genética, dada pelo inverso da expressão:

$$DG = (1,0 - S)100$$

Em que: S é a similaridade entre os pares obtidos através do coeficiente de Nei e Li.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Associação entre comprimento do botão floral e da antera e o estágio de desenvolvimento do micrósporo.

Os valores mínimos e máximos de comprimento de botão floral, diâmetro de antera, comprimento de pétala, comprimento de sépala e comprimento da antera, acessos de *Capsicum chinense* estão descritos na tabela 5. Ao analisar-se os dados, constatou-se que há uma sobreposição entre os estádios de desenvolvimento dos micrósporos e as características avaliadas, mostrando que não há um sincronismo no desenvolvimento da meiose nos micrósporos de uma mesma antera. A aparência e o tamanho dos botões, das anteras, o estágio do micrósporo e as suas características são mostrados figura 4. A análise microscópica mostra que podemos obter micrósporos uninucleados em diferentes tamanho do botão floral, com maior frequência quando o comprimento da sépala é aproximadamente o mesmo da pétala. Fato também observado por Luz, Pinto e Pereira (2000) e por Çiner e Tipirdamaz (2002). A célula-mãe do micrósporo pode ser observada quando os botões tinham em média comprimento de 1.76 mm de comprimento, enquanto o estágio de tetrade pôde ser observado quando o comprimento do botão floral apresentava em média 2 mm.

Tabela 5. Estádio de desenvolvimento do micrósporo associado comprimento e diâmetro do botão floral, comprimento das pétalas, comprimento das sépalas e do comprimento da antera, em mm.

Estádios	Comprimento do botão floral min-máx.	Diâmetro do botão floral min-máx	Comprimento da pétala min-máx	Comprimento da sépala min-máx	Comprimento da antera min-máx
Célula-mãe	1.6-2	1.5-2	0.8-1.1	1.2-1.4	0.8-1
Tetrade	2-2.1	1.8-2	1.4-1.5	1.7-1.9	0.9-1
Micrósporo	2.2-2.6	2.1-2.4	1.9-2.3	2.1-2.3	1.3-1.6

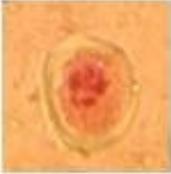
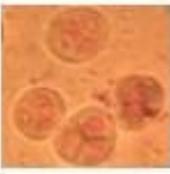
Aparência do botão	Aparência da antera	Estádio da microsporogênese	Comprimento do botão (mm) $\bar{X} \pm DP$	Diâmetro do botão floral (mm) $\bar{X} \pm DP$	Característica do botão, da antera e do microsporo
			$1,76 \pm 0,21$	$1,73 \pm 0,25$	Nesse estágio, o botão floral apresenta a antera com uma coloração verde luminescente, contendo célula-mãe do microsporo.
			$2 \pm 0,1$	$1,93 \pm 0,11$	Nesse estágio, o botão floral apresenta a antera com um tom de verde mais escuro e contém microsporos no estágio de tetrade.
			$2,4 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,15$	Nesse estágio, o botão apresenta a sépala com aproximadamente o mesmo tamanho das pétalas, a antera encontra-se numa coloração mais esbranquiçada contendo em sua maioria microsporos uninucleados.

Figura 4. Características do botão floral e da antera em relação ao estágio do desenvolvimento do microsporo em *C. chinense*

Neste trabalho foi possível verificar que há diferença significativa entre os estádios desenvolvimento do micrósporo e o comprimento do botão floral (CBF) e comprimento da antera (CAN) (Tabela 6). Entretanto, não é apropriado indicá-los como parâmetros para monitorar o desenvolvimento de todos os estágios de desenvolvimento do micrósporo, em função da falta de sincronia dentro de anteras de um mesmo botão, ou seja, botões de mesmo tamanho foram encontradas anteras em estágios de célula mãe de micrósporo e tétrades ou em tétrades e micrósporos maduros. Contudo, o comprimento de antera permite identificar a maioria dos micrósporos uninucleados (figura 5). Resultados similares foram observados por Andrade et al., (1996), trabalhando com café (*Coffea arabica* L.), e em todos os genótipos houve associação entre tamanho de botões florais e anteras apenas com estágio de desenvolvimento do micrósporo. Por outro lado, Lauxen et al., (1995), relacionaram os estádios da microsporogênese a quatro intervalos preestabelecidos de comprimento de botão floral, em três cultivares brasileiras de soja e constataram a falta de sincronismo entre as anteras de um mesmo botão. Souza, Pereira e Martins (2002), também encontraram falta de sincronia entre o tamanho de botão e comprimento de antera e os diversos estádios de desenvolvimento durante a microgametogênese em maracujazeiro.

Tabela 6. Resumo da análise de variância entre os tratamentos célula-mãe de micrósporo, tétrade e micrósporo uninucleado em relação as variáveis comprimento do botão floral (CBF) e comprimento da antera (CAN).

Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Médio das Variáveis	
		CBF (mm)	CAN (mm)
Tratamentos	2	0,3078**	0,2533**
Resíduo	6	0,0311	0,0122
Total	8		
Média		2,0556	1,10
CV(%)		8,5792	10,04

** Significativo a 1% pelo teste F.

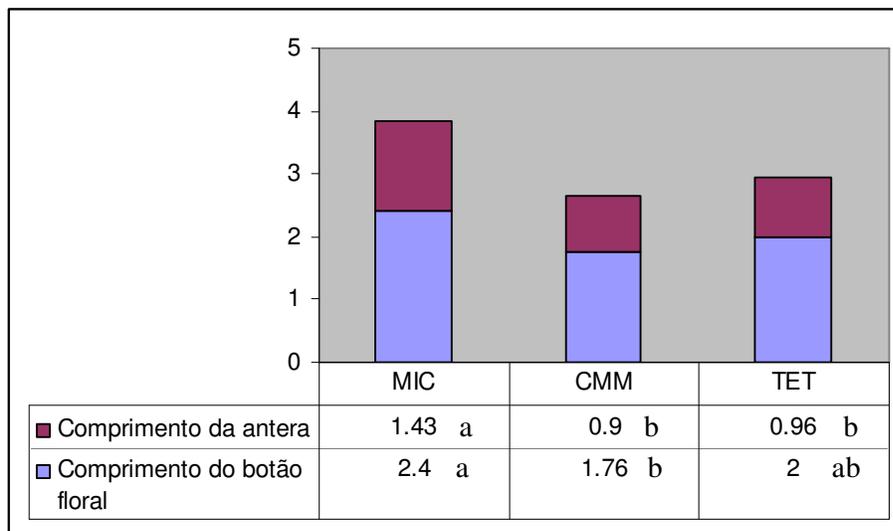


Figura 5. Distribuição dos estágios de desenvolvimento de micrósporo em relação aos valores médios dos comprimentos de botão e antera. As médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em alguns casos, pôde-se observar a presença de mais de um estágio de desenvolvimento do micrósporo numa mesma antera (dados não mostrados) observando-se assim uma ausência de sincronia no desenvolvimento do micrósporo, fato também observado por Çiner e Tipirdamaz (2002). Souza, Pereira e Martins (2002) ao trabalhar com *Passiflora* observaram que em botões do mesmo comprimento existiam anteras em diferentes fases de divisão meiótica. Lauxen et al., (1995) constataram a falta de sincronismo em soja, observando em anteras do mesmo botão micrósporo em meiose I e meiose II. Resultados diferentes foram observados em café, no qual foi observada associação em todos os genótipos entre os tamanhos dos botões florais e anteras contendo apenas um estágio de desenvolvimento do micrósporo.

4.2 Microgametogênese em *Capsicum chinense* Jacq

O desenvolvimento do grão de pólen ou microgametogênese em pimentas (*Capsicum chinense*) segue um padrão usual da maioria das angiospermas, em que o tecido esporogênico sofre divisão meiótica para formar a célula mãe de micrósporo e ocorre assincronicamente (figura 6).

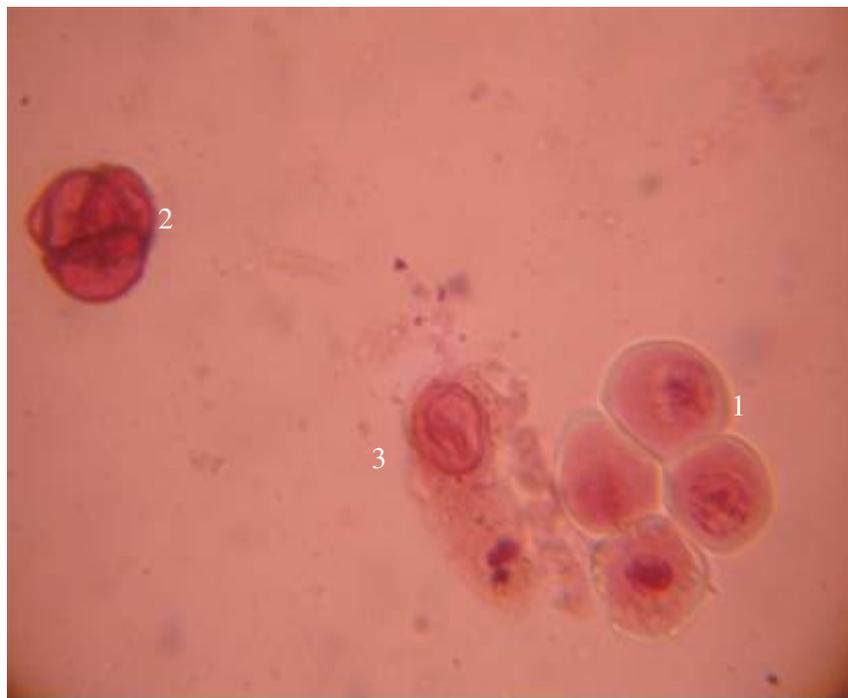


Figura 6. Desenvolvimento assincrônico do micrósporo em *C. chinense*, pode-se observar a presença de uma tétrade com a camada de calose (1), uma tétrade desprovida da camada de calose (2) e um micrósporo uninucleado (3), provenientes de uma mesma antera.

A primeira divisão meiótica ocorreu assincronicamente em *C. chinense*, fato que conduz a um desenvolvimento assincrônico na formação dos grãos de pólen. Resultados diferentes dos encontrados neste trabalho foram obtidos por Souza e Pereira (2000), trabalhando com microsporogênese de *Passiflora edulis*, onde observaram que a primeira divisão meiótica ocorre sincronicamente. De acordo com Frankel (1973), existe uma interdependência entre os meiócitos, e entre estes e as células tapetum da antera, o que é evidente no início da prófase. Após a formação da célula mãe de micrósporo (figura 7a e 7b) esta sofre divisão meiótica reducional produzindo duas células filhas com metade do número de cromossomos, denominadas díades, em função de formar uma estrutura com dois núcleos individualizados por paredes de calose (figura 7c e 7d). McCormick (1993) demonstrou que as conexões citoplasmáticas entre o tapetum e os meiócitos são interrompidas pela deposição de calose nos meiócitos, formando as díades. Porém, segundo o mesmo autor, filamentos protoplasmáticos entre os meiócitos mantêm a matriz citoplasmática em comum, impondo um sincronismo no comportamento do núcleo dos 4 micrósporos derivados de uma única célula mãe de micrósporo. Segundo Frankel (1973) esta independência nuclear dos meiócitos, causando possível assincronia ocorre também, geralmente, na segunda divisão meiótica, no

estágio de anáfase II. Os resultados obtidos neste estudo corroboram a afirmação desse autor. Aqui foram observados diferentes estágios de desenvolvimento de tétrades, formados a partir da segunda divisão meiótica (figura 7e 7f).

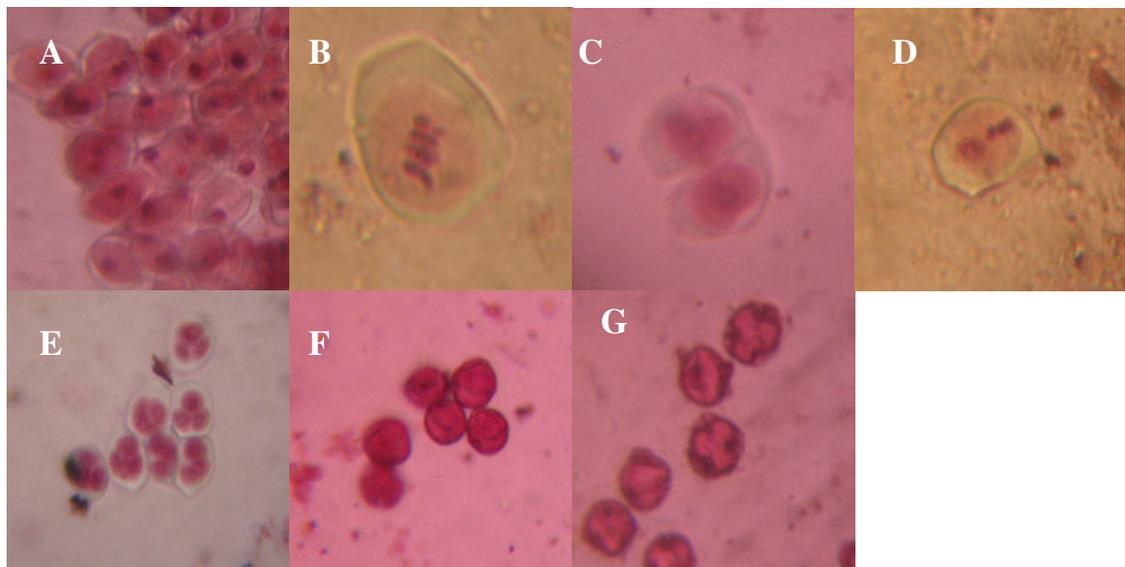


Figura 7. Microsporogênese em *Capsicum*: observa-se a presença de célula-mãe do microsporo (A); uma célula-mãe em metáfase (B); microsporos em estágio de díade (C); díade em metáfase (D); tétrades (E); tétrede com a ausência da camada de calose (F); microsporos uninucleados(G).

A ocorrência simultânea de diferentes estágios do da meiose II foi citado também por Souza e Pereira (2000). No final do estágio de tétrade, iniciou-se o processo de erosão da parede celular radial e tangencial das células do tapetum. Observações similares foram feitas por Palmer et al., (1992), trabalhando com microgametogênese de soja. Em *Curcubita pepo*, o que caracteriza o termino da segunda divisão meiótica, é a fina camada da parede celular tangencial das células do tapetum, devido a reabsorção dos polissacarídeos durante o desenvolvimento do microsporo.

Os microsporos individualizados e mononucleados foram identificados após a perda total de sua parede no final do estágio de tétrade (figura 7g). Segundo Ciampolini et al., (1993), células de secreção do tapetum podem iniciar sua principal atividade, formação e transporte de substância passando por meio dele até o microsporângio ou grão de pólen. Em maracujazeiro, os microsporos maduros estão envolvidos por uma substância gelatinosa

derivada de material citoplasmático e células do tapetum degeneradas, as quais são depositadas sobre a superfície do grão de pólen antes da antese (SOUZA; PEREIRA, 2000).

4.3 Calogênese em anteras de pimentas

Todas as interações entre os tratamentos e genótipos foram significativas (tabela 7). Foi possível observar a formação de calos provenientes de cultura de anteras na maioria dos tratamentos utilizados para ambos os acessos, exceto para o tratamento 1, onde a concentração de 2,4-D foi igual a zero e a resposta a calogênese também foi negativa, mostrando a necessidade de um regulador na indução da mesma.

Tabela 7. Resumo da análise de variância entre o número de calos produzidos em resposta aos tratamentos de concentração de 2,4-D na indução de calos em acessos de pimentas.

FV	GL	QM
TRATAMENTOS	4	11.25**
GENÓTIPOS	1	0.53333ns
TRATxGEN	4	1.28333ns
TRAT/GEN	8	6.26667**
TRAT/GEN-1	4	7.26667**
TRAT/GEN-2	4	5.26667**
RESÍDUO	20	0.2
TOTAL	29	54.6667
MÉDIA	1.667	
CV(%)	26.832	

** Significativo a 1% pelo teste F, ns não significativo

Para o acesso 43, o melhor tratamento na indução de calos a partir de anteras de pimentas foi o tratamento 5 (2 mg.L⁻¹ de 2,4-D), por outro lado, o acesso 40 foi mais responsivo ao tratamento 4 (1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D) (tabela 8). Kim et al. (2004), utilizando o mesmo meio de cultura, porém com reguladores e concentrações diferentes (ANA e cinetina, 0,1 mg.L⁻¹), obtiveram percentuais de calogênese de 1% das anteras de *C. annuum*

inoculadas. Apesar do baixo percentual de calogênese, esses autores conseguiram obter cerca de 18% de embriogênese direta com esse tratamento.

Neste trabalho, não foi possível a regeneração de embriões a partir das anteras, tal fato pode ter ocorrido pela utilização de reguladores diferentes daqueles utilizados pelos autores acima citados. Em algumas espécies, a regeneração de embriões ocorre após a calogênese, como observado em tomate por Zagaroska et al. (1998), que verificou a presença de embriões somente após a formação de calos.

Tabela 8. Comparação entre as médias do número de calos obtidos em resposta às diferentes concentrações de 2,4-D utilizados na indução de calos em pimentas em mg.L⁻¹.

Tratamentos	Genótipos	
	Acesso 43	Acesso 40
1(0.0)	0,0c	0,0c
2(0.5)	1.33bc	0.66c
3(1.0)	1,0c	1.33bc
4(1.5)	2.66ab	3.33 ^a
5(2.0)	4,0a	2.33ab

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P< 0,01).

O desenvolvimento assincrônico do micrósporo é outro fator importante que possivelmente tenha levado a não obtenção de embriões, uma vez que, como citado anteriormente, pode-se encontrar anteras com micrósporos em diferentes estádios de desenvolvimento. Essa hipótese foi confirmada por Bárány et al. (2005), que ao trabalhar com cultura de anteras de *C. annuum* observou a presença de vários estádios de desenvolvimento em anteras inoculadas em meio nutritivo contendo 2,4-D e cinetina, a concentrações de 0,1 mg.L⁻¹, que não responderam a androgênese.

A formação de calos neste experimento ocorreu a partir do sétimo dia de inoculação, onde foi observada a presença de calos friáveis. Mesmo após transferência de meio, os calos continuaram a crescer (figura 8). O crescimento de calos por um período de tempo foi

relatado por Amaral (2003), que ao trabalhar com explante de cenoura, verificou um aumento significativo entre os calos cultivados com 30 e 60 dias de inoculação em meio MS acrescido de 0.1 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Bárány et al. (2005), verificaram a presença de calos em *C. annuum* após 6 dias de inoculação. Em tomate, a calogênese se inicia poucos dias após a inoculação das anteras, adquirindo uma coloração verde amarelada (ZAGAROSKA et al., 1998). Segundo esses autores, o genótipo é um outro importante fator para a obtenção de calos a partir de anteras. Esses mesmos autores estudando diferentes genótipos de tomate observaram altas taxas de regeneração para alguns genótipos, sendo 100% de regeneração obtida para a variedade Cristi, e em outros casos, alguns genótipos foram inviáveis para a calogênese. Neste trabalho foi possível observar que os genótipos utilizados, responderam de forma diferente (tabelas 7, 8 e 9). Com o acesso 43 (*C. annuum*) obteve-se 80% de calogênese utilizando 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, enquanto no acesso 40 (*C. chinense*) o percentual de formação de calos, utilizando $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, foi de 66,6% (tabela 9).

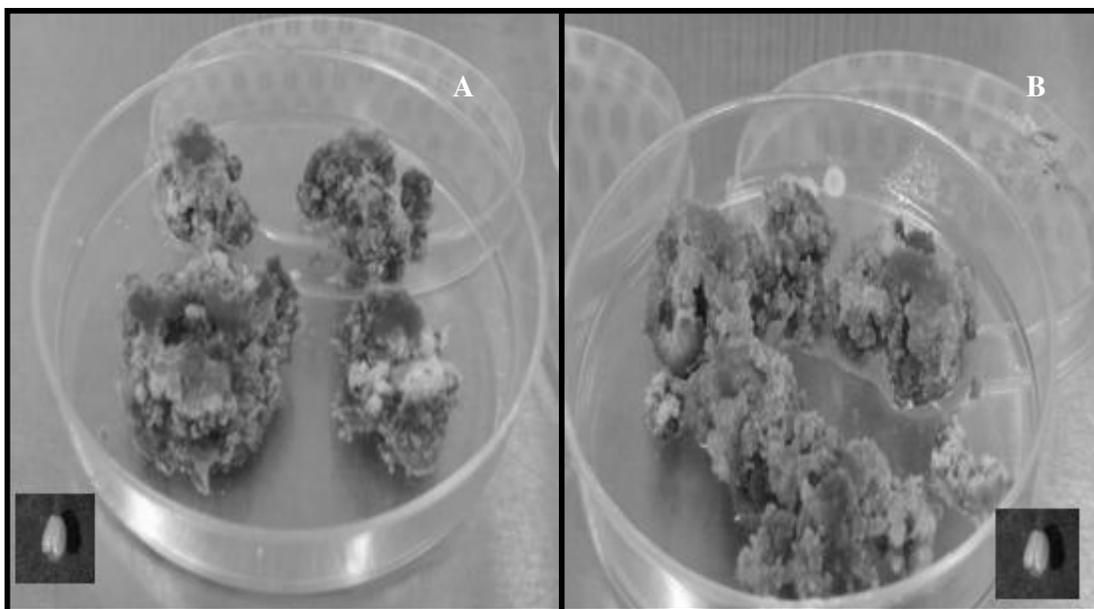


Figura 8. Calos obtidos a partir da inoculação de anteras de *Capsicum*: (A) acesso 43, *C. annuum*; (B) acesso 40 *C. chinense*, no detalhe uma antera em tamanho normal.

Tabela 9. Percentual de calogênese por tratamento em anteras de *Capsicum* spp em resposta às diferentes concentrações de 2,4-D em mg.L⁻¹.

Tratamentos	Genótipos	
	Acesso 43	Acesso 40
1(0.0)	0,0%	0,0%
2(0.5)	26,6%	13,2%
3(1.0)	20,0%	26,6%
4(1.5)	53,2%	66,6%
5(2.0)	80,0%	46,6%

A relação entre genótipo e a capacidade de gerar calos seguidos de posterior organogênese também é discutida por outros autores. Em milho, foi observada diferentes frequências entre genótipos estudados (PETOLINO; JONES; THOMPSON, 1988).

Powell (1988) afirma que, em cevada, os genótipos utilizados na cultura de anteras diferem significativamente, quanto à formação de calos. Em alguns genótipos, segundo esse autor, é possível produzir um número relativamente alto de plantas originadas de calos a partir da antera. Resultados que devem ser levados em consideração em programas de melhoramento.

Segundo Palú, Silva e Pasqual (2004), para a obtenção de calos a partir de anteras de cafeeiro, é necessário à combinação de uma auxina e uma citocinina. Ao inocular anteras em meio IC com diferentes concentrações de 2,4-D, AIB e cinetina, esse autor verificou que o melhor resultado na produção de calos ocorreu com as concentrações de 2 mg.L⁻¹ e 1,9 mg.L⁻¹ de cinetina. Diferentemente dos resultados obtidos pelos autores acima citados, em *Caisicum* spp. obteve-se calogênese utilizando-se apenas um tipo de regulador de crescimento, 2,4-D, com o qual foi possível, isoladamente, a obtenção de calos a partir de anteras de pimentas.

4.4 Análise da diversidade genética entre 29 acessos de pimenta por meio de marcador RAPD

Foi extraído DNA total de 46 acessos de *Capsicum* spp. Listados na tabela 3, após a extração, foi realizado a padronização dos mesmos para uma concentração de 10 ng.µL⁻¹ de DNA, o qual foi submetido à reação de RAPD. Apenas 29 foram amplificados (tabela 10).

Tabela 10. Acessos de *Capsicum* do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima que foram amplificados pelos 08 primers utilizados.

Acessos (nº)	Espécie	Local de Coleta	Ano de Coleta
03	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
05	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2001
06	<i>C. baccatum</i>	Iracema	2002
08	<i>C. chinense</i>	Iracema	2002
20	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
22	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2001
24	<i>C. frutescens</i>	Iracema	2002
25	<i>C. chinense</i>	Baixo Rio Branco	2002
32	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2001
37	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
40	<i>C. chinense</i>	Iracema	2002
43	<i>C. annuum</i>	Boa Vista	2002
44	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
45	<i>C. annuum</i>	Viçosa	2001
49	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
55	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
56	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
58	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
59	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
61	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
67	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
69	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
70	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
71	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
72	<i>C. frutescens</i>	Tepequém	2002
73	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002
74	<i>C. baccatum</i>	Viçosa	2001
75	<i>C. frutescens</i>	Boa Vista	2002
76	<i>C. chinense</i>	Boa Vista	2002

Dos 10 *primers* utilizados neste trabalho para amplificação dos 46 acessos de pimenta, oito, UBC -135, UBC-146, UBC-155, UBC-168, UBC-228, UBC-247, UBC-253, UBC-296, produziram bandas polimórficas. Um exemplo do padrão de amplificação obtido com o *primer* UBC 228 é mostrado na figura 9. Foi obtido um total de 122 produtos de amplificação, perfazendo uma média de 15,2 bandas por *primer*, essa elevada taxa de bandas produzidas se deve ao fato dos *primers* utilizados nesse estudo, já terem sido utilizados em outros estudos de diversidade genética de pimentas. O *primer* UBC-247 amplificou apenas uma banda em um indivíduo. A presença e ausência de produtos de amplificação foi usada para calcular a distância genética entre os 29 acessos de pimenta (Tabela 11). O menor e o maior valores obtidos entre pares de indivíduos foram, respectivamente, 0,05 e 1,00. A matriz gerada foi utilizada para gerar o dendrograma pelo método UPGMA (figura 10).

Quanto a não amplificação do DNA de 17 acessos de *Capsicum* ocorrido neste trabalho, Williams et al. (1990), comentam que a mudança única em um nucleotídeo pode impedir toda a amplificação. Dados semelhantes foram encontrados por Silva (1999) trabalhando com acessos de arroz.

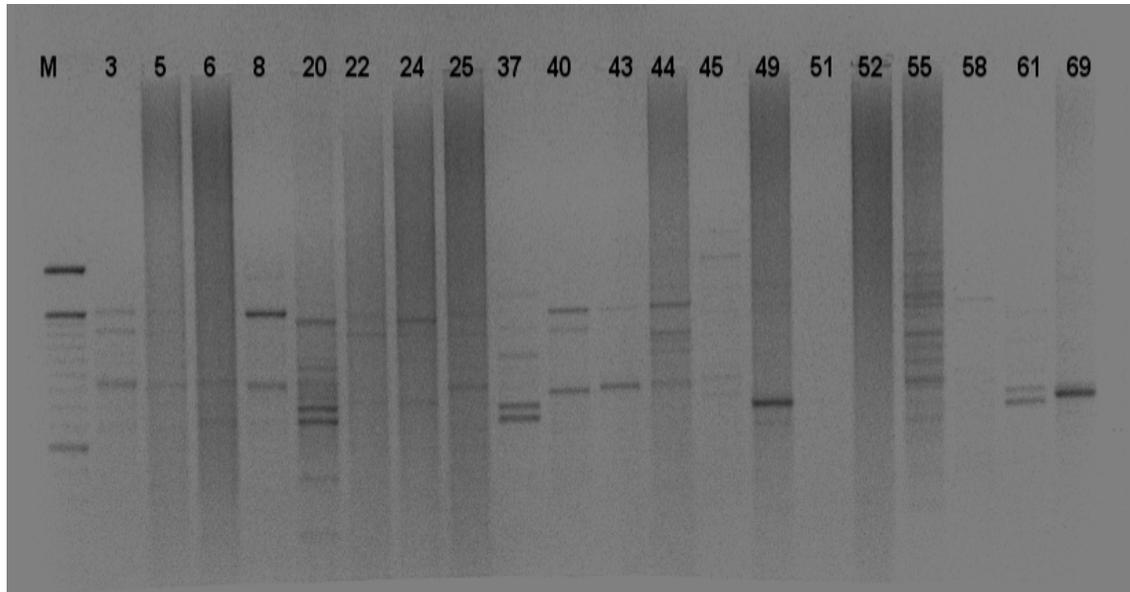


Figura 9. Gel de agarose a 1,2% mostrando o produto de amplificação de 20 acessos de *Capsicum* spp obtido com o *primer* UBC 228.

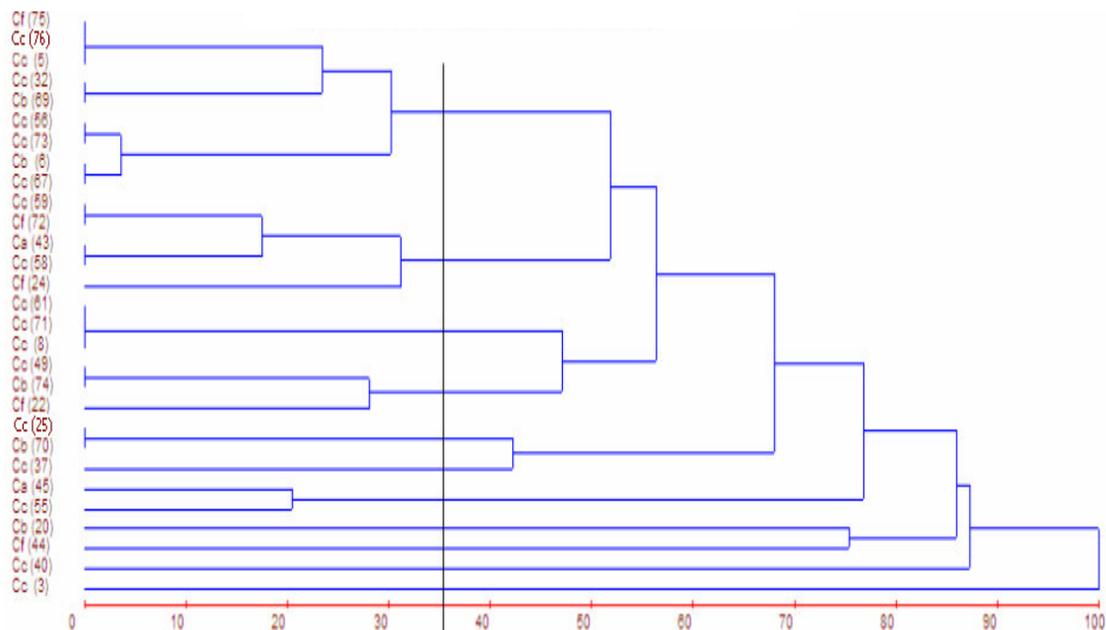


Figura 10. Dendrograma dos 29 acessos de *Capsicum* spp. obtido pelo método de UPGMA. Ca, *Capsicum annuum*; Cb, *Capsicum baccatum*; Cc, *Capsicum chinense*; e Cf, *Capsicum frutescens*.

Os marcadores RAPD, não foram eficientes em agrupar os diferentes acessos de cada espécie de *Capsicum* em grupos separados. Este fato já foi reportado por vários autores trabalhando com diferentes marcadores moleculares no gênero. Contudo, efetuando-se um corte a aproximadamente 35% na escala de substituição alélica, observa-se que os 29 acessos são agrupados em 11 grupos, sendo, que no grupo 1, apresenta-se dois subgrupos (75, 76, 5, 32, 69) e (56, 73, 6 e 67). Dentro de cada subgrupo, a diversidade genética entre os indivíduos é muito baixa, indicando que há semelhanças entre os componentes, embora pertençam a espécies diferentes.

O grupo 2 é formado pelos acessos 59, 72, 43, 58 e 24; e no grupo 3 encontram-se os acessos 61, 71 e 8; já o grupo 4 é constituído pelos acessos 49, 74 e 22. Nos grupos 5 e 6 foram agrupados dois genótipos em cada, 25 e 70 e, 45 e 55, respectivamente. Os grupos de sete a dez foram constituídos de um único acesso cada, sendo eles: 20, 44, 40 e 3, respectivamente. Os demais foram constituídos por mais de uma espécie, evidenciando a variabilidade genética entre os acessos estudados. Resultados semelhantes foram obtidos por

Costa et al. (2006), que ao estudar a diversidade genética em acessos de pimenta, pode verificar a presença de diferentes espécies em um mesmo grupo.

O único grupo constituído por acessos pertencentes a uma única espécie, *Capsicum chinense*, foi o grupo 3. A espécie *C. chinense* é considerada dentre as pimentas, a espécie com maior diversidade da região Amazônica (IBPGR, 1983). Tal fato possivelmente está relacionado à sua presença em praticamente todos os grupos formados pelo dendrograma. Segundo Casali e Couto, (1984) *C. frutescens* é a espécie com menor variabilidade entre espécies de pimentas. Neste estudo houve os cinco acessos desta espécie foram alocados em quatro grupos distintos, mostrando grande variabilidade dentro espécie.

Hernández-Verdugo; Lunareyes; Oyama, (2001), trabalhando com *Capsicum annum* no México, demonstraram que a diversidade genética dentro é maior que entre populações. Entretanto, a diferenciação genética é maior entre as pimenteiras cultivadas do que as populações selvagens.

O agrupamento com base nos dados de DNA, que abrangia todo o genoma dos acessos, mostrou que a distribuição geográfica não foi bom parâmetro pré-estabelecido de agrupamento, pois determinados acessos de um mesmo grupo eram de diferentes regiões geográficas, enquanto aqueles de um mesmo local foram alocados em grupos diferentes, resultados são corroborados pelo trabalho de Lannes (2005) que ao trabalhar com a espécie *C. chinense*, observou que os grupos formados eram independentes do local de origem.

A informação obtida neste estudo deve ser de uso prático para mapeamento do genoma de pimenta, bem como para os programas de melhoramento. Na escolha dos pais para mapeamento de populações necessita de avaliação do nível de polimorfismo entre os potenciais parentais. Da perspectiva do melhoramento, a distancia genética é importante parâmetro na escolha dos pais para cruzamento (PARAN; AFTERGOOT; SHIFRISS, 1998). Para a obtenção de uma população segregante os melhores cruzamento seriam entre os indivíduos 03 e 76, e entre o 3 e 5, pois foram os indivíduos mais divergentes, de acordo com os *primers* utilizados, e pertencem a mesma espécie (*Capsicum chinense*), diminuindo o risco de cruzamento incompatíveis.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem tirar as seguintes conclusões:

- ✓ O desenvolvimento do micrósporo em anteras não se apresenta sincrônico, uma vez que foi possível observar a presença de vários estádios de desenvolvimento em anteras do mesmo tamanho, e ainda na mesma antera;
- ✓ Há possibilidade de encontrar micrósporos uninucleados quando se utiliza indiretamente o comprimento da antera;
- ✓ O fitoregulador 2,4-D é essencial na regeneração de calos a partir de anteras de pimenta, proporcionando altas taxas de produção de calos nos acessos trabalhados;
- ✓ Em pimenta, o genótipo é um fator que influencia na calogênese, uma vez que, pode-se observar que os dois genótipos estudados responderam de forma diferente à concentrações diferentes de 2,4-D;
- ✓ Os marcadores RAPD não agruparam as diferentes espécies de *Capsicum*.
- ✓ Os marcadores baseados em RAPD mostraram-se eficientes para evidenciar a diversidade genética entre os 29 acessos de pimentas estudados, uma vez que foi observada a formação de grupos pelo método de UPGMA com espécies diferentes;

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. F. C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio.** Piracicaba, 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- ANDRADE, L. M. C. O.; DAVIDE, L. C.; PASQUAL, M. Relação entre a microsporogênese e o tamanho do botão floral e de anteras em café (*Coffea arabica* L.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 42. 1996, Caxambu. **Programa e Resumos...** Caxambu: SBG, 1996. p. 138.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S.S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular.** Brasília: UNB. 2003. 212p.
- BAOXI, Z.; SANWEN, H.; GUIMEI, Y.; JIAZHEN, G. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper. **Euphytica**, v. 113, p. 155–161, 2000.
- BÁRÁNY, I. GONZÁLEZ-MELENDI, P.; FADÓN, B.; MITYKÓ, J.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. . Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. **Biol. Cell**, v. 97, p. 709–722, 2005.
- BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F.; NASCIMENTO –FILHO, H. R.; MADURO, C. B. Pimentas do gênero capsicum cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. espécies domesticadas. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 2, p. 177-192, 2002.
- BARROSO, G. M. **Sistemática das angiospermas do Brasil.** Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 1991. v. 3, p. 62-73.
- BOSLAND, P.W. Breeding for quality in Capsicum. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, v. 12, p. 25-31, 1993.
- BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and capsicums.** Las Cruces: CABI publish, 2000.
- CASALI, V.W.; COUTO, F.A.A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe agropecuário**, n. 113, p. 8-10, 1984.

CASALI, V.W.D. Melhoramento de pimentão e pimenta para fins industriais. **Informe Agropecuário**, n. 113, p. 19-22, 1984.

CIAMPOLINI, F.; NEPI, M.; PACINI, E. Tapetum development in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). **Plant System Evol**, v. 7, p. 13-22, 1993.

ÇINER, D. Ö, TIPIRDAMAZ R. The effects of cold treatment and charcoal on the *in vitro* androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Turk J Bot**, v. 26, p. 131–139, 2002.

COSTA, F.R.; PEREIRA, T.N.S.; VITÓRIA, A.P.; CAMPOS, K.P.; RODRIGUES, R.; SILVA, D.H. PEREIRA, M.G. Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.6, p. 18-23, 2006.

CRUZ, C.D. **Programa GENES (versão windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV, 2003. v. 2, 585 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 1996. p. 38-53.

FOISSET, N.; DELOURME, R.; LUCAS, M.O.; RENARD, M. In vitro androgenesis and segregation distortion in *Brassica napus* L.: spontaneous versus colchicine-doubled lines. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 7 p. 464-468, 1997.

FRANKEL, R. Characterization of male sterility. In: SEMINAR OF AGRICULTURAL GENETICS FOR LATIN AMERICA, MARACAY, 1969. New York: John Wiley & Sons, 1973. p. 71- 83.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis in monocotyledons. **Annals of Botany**, v. 84, p. 475-499, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. England: Hardcover, 1993. 574p.

GRANDO, M. F.; MORAES-FERNANDES, M. I. B. Two point deterministic model of *in vitro* pollen grain androgenética capacity based on wheat studies. **Revista Brasileira Genética** , v.20, n .3, p. 467-476, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1995. p. 289-362.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 589p.

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

HÖFER, M. In vitro androgenesis in apple – improved of induction phase. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 365-370, 2004.

HOLME, I.B.; OLESEN, A.; HANSEN, N.J.P.; ANDERSEN, S.B. Anther and isolated microspore culture response of wheat lines from northwestern and eastern Europe. **Plant Breeding**, v. 118, p. 111-117, 1999.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Genetic resources of *Capsicum*, a global plan and action**. IBPGR: Rome, 1983. 49p.

INOUE, A. K.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Caracterização da coleção de germoplasma de *Capsicum* do CNPH. **Horticultura Brasileira** v. 7, n. 1, p. 10-18, 1989.

JOLY, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 8. ed. São Paulo: Nacional, 1987. p. 586-590.

KALTCHUK-SANTOS, E.; BONDANESE-ZANETTINI, M. H. Androgênese: uma rota alternativa no desenvolvimento do pólen. **Ciência Rural** v. 32, n. 1, p. 165-173, 2002.

KIM, M.; KIM, J.; YOON, M.; CHOI, D.; LEE KM. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). **Plant Cell, Tissue Organ Cult**, v. 77, p. 63–72, 2004.

KIMBER, G.; RILEY, R. Haploid angiosperms. **The Botanical Review**, v. 29, n. 4, p. 480-531, 1963.

LANNES, S. D. **Diversidade em *Capsicum chinense*: análise química, morfológica e molecular**. Viçosa, 2005. 81 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.

LANTERI, S.; ACQUADRO, A.; QUAGLIOTTI, L.; PORTIS, E. RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-West Italy. **Genetic Resources and Crop Evolution**. n. 50, p. 723–735, 2003.

LAUXEN, M. S.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Relação entre tamanho de botão floral e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen em soja (*Glycine max* (L.) Merr.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41, 1995, Caxambu. **Programa e Resumos...** Caxambu: SBG, 1995. p. 419.

LAUXEN, M.S.; KALTCHUK-SANTOS, E.; HU, C., CALLEGARI-JACQUES, S. M.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Association between Floral Bud Size and Developmental Stage in Soybean Microspores. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n. 4, p. 515-520, 2003.

LINDHOUT, P.; HEUSDEN, S. V.; PET, G.; OOIJEN, J.W.V.; SANDBRINK, H.; VERKERK, R.; VRIELINK, R.; ZABEL, P. Perspectives of molecular marker assistant breeding for earliness in tomato. **Euphytica**, v. 79, n. 3, p. 279-286, 1994.

LINS, T. C. L.; LOURENÇO, R. T.; TAVARES, H. M. F.; REIFSCHNEIDER, F. B.; FERREIRA, M.; BUSO, G. S. C. Caracterização molecular e análise da diversidade genética de acessos de *Capsicum* utilizando marcadores moleculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBMP, 2001. p. 1-3.

LUZ, J. M. Q.; PINTO, J. E. B. P.; PEREIRA, I. A. M. Caracterização histológica da indução embriogênica em anteras de pimentão. **Ciência Agrotecnica**, v. 24, n. 1, p.17-21, 2000.

MATOS, I. W. F.; RÊGO, E. R.; PORTELA A. L.; RÊGO, M. M.; SOUZA F. A.; POSSAMAI, E. V. Diversidade genética e importância de caracteres de pimenta (*Capsicum spp.*) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003. CD-ROM.

MATOS, I. W. F. **Parâmetros genéticos e caracterização de frutos de pimenteiras (*Capsicum*)**. Boa Vista, 2004. 35 f. Monografia (Especialização em Recursos Naturais.) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima.

MCCORMICK, S. Male gametophyte development. **Plant Cell**, v.5, p. 1265- 1275, 1993.

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; STIVAL, A.L.; BRAMMER, S.P., GRANDO, M.F. Haplodiploidização: Genética e melhoramento. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v.2, p. 613-650.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p.476-497, 1962.

NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C; MELO, I. S; VALADARES-INGLIS, M. C (org.) **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1181 pp.

NURHIDAYAH, T.; HORN, R.; RÖCHER, T.; FRIEDT, W. High regeneration rates in anther culture of interspecific sunflower hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 16 .p. 167-173, 1996.

ODEIGAH, P.G.C; OBOH, B.; AGHALOKOPE, I.O. The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. **Genetics Resources and Crop Evolution**, n. 46, p. 127-131,1999.

OYAMA, K.; HERNANDEZ-VERDUGO, S.; GONZÁLEZ-RODRIGUES, A.; SANCHES-PEÑA, P.; GARZÓN-TIZNADO, A.; CASAS, A. Genetic structure of wild and domenicat populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. **Genetics Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 553-562, 2006.

PALMER, R.G., ALBERTSEN, M.C., HORNER, H.T.; SKORUPSKA, H. Male sterility in soybean and maize: developmental comparisons. **Nucleus**, n. 35, p. 1-18, 1992.

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

PARAN, I.; AFTERGOOT, E.; SHIFRISS, C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, n.99, p. 167–173, 1998.

PETOLINO J.F.; JONES, A.M.; THOMPSON, S.A. Selection for increased anther culture response in maize. **Theoretical Applied Genetics**. v. 76, p. 157–159. 1988.

PETERS, J. A.; BOBROWKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplo haplóides. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. v. 2 p.569-512.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, p. 129-133, 1997.

PORTELA, A.; RÊGO, E.R.; MATOS, I.W.F.; POSSAMAI, E.V.; SOUSA, F.A. Parâmetros genéticos em pimenteira (*Capsicum* spp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003. CD-ROM.

POWELL, W. Diallel analysis of barley anther culture response. **Genome**, v. 30, p. 152-157. 1988.

RAINA, S.K.; IRFAN, S.T. High-frequency embryogenesis and planted regeneration from isolated microspore of indica rice. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 957-962, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 900p.

REED, S. M. Haploid cultures. In: ROBERT, N. T.; GRAY, D. J. (ed.) **Plant Tissue-culture concepts and exercises**. 2. ed. New York: CRC Press LLC, 2000. p.285-290. a.

_____. Producion of haploid tobacco using anther culture. In: ROBERT, N. T.; GRAY, D. J. (ed.) **Plant Tissue-culture concepts and exercises**. 2. ed. New York: CRC Press LLC, 2000. p.291-296. b.

RÊGO, E.R. **Diversidade, herança e capacidade de análise combinatória em pimenta (*Capsicum baccatum*)**. Viçosa, 2001. 118 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.

RÊGO, E.R.; RÊGO M.M.; CRUZ, C.D.; FINGER, F.L. Correlações entre caracteres morfoagronômicas e produção de *Capsicum baccatum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 1, 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBMP, 2001. CD-ROM.

RÊGO, E.R.; RÊGO M.M.; CRUZ, C.D. Herança de caracteres quantitativos em pimenta (*Capsicum baccatum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003. CD-ROM.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (org), ***Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil***. Brasília: EMBRAPA-Hortaliças, 2000. 113p.

REDHA, A.; ATTIA, T.; BÜTER, B.; SAISINGTONG, S.; STAMP, P.; SCHMID, J.E. Improved production of doubled haploid by colchicine application to wheat. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 974-979, 1998.

RIBEIRO, C.S.C.; SOUZA, O.B.; LOPES, D.; REIFSCHNEIDER, F.B. Programa de melhoramento genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças para processamento industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003. CD-ROM.

RIZZA, F.; MENNELLA, G.; COLLONNIER, C.; SIHACHAKR, D.; KASHYAP, V.; RAJAM, M. V.; PRESTERÀ, M.; ROTINO, G. L. Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group *gilo* as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1022-1032, 2002.

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

RYAN, A.B.; CASTILHO, A.M.; VALLÉS, M.P.; SANS, J.M. Desiccated doubled-haploid embryos obtained from microspore culture of barley cv. Igri. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 924-928, 1999.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SANTOS, E. G. **Avaliação da variabilidade genética de acessos de pimenteiras (*Capsicum spp.*) da coleção de germoplasma da UFRR utilizando marcador molecular do tipo RAPD**. Boa Vista, 2004. 17 f., Monografia (Especialização em Recursos Naturais.) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima.

SILVA, A. T. **Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD)**. Lavras, 1999. 185 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras.

SOUZA, M.M. PEREIRA, T.N.S. Development of pollen grain in yellow passion-fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 2, n. 23, p. 469-473, 2000.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C (org.) **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 939-965.

SOUZA, M. M. PEREIRA, T. N. S. MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência agrotecnica**, v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.

WELSH, J.; M. MCCLELLAND. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Resouces**, v. 24, n. 18, p, 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S,V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers re useful as genetic markers. **Nucleic Acids Resouces**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WITTERS, L. A.; WILLIANS,J.T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1999. v. 2, p. 297-330.

ZAGAROSKA, N. A.; SHTEREVA, A.; DIMITROV, B. D.; KRULEVA, M. M. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) I. Influence of genotype on androgenic ability. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 968-973, 1998.

ZHAO, J.;SIMMONDS, D.H.; NEWCOMB, W. High frequency production doubled haploid pants of *Brassica napus* Cv. Topas derived from colchicina-induced microspore embryogenesis without heat shock. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 668-671, 1996.

ZUCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. Piracicaba, 2002. 159 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.