AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *Capsicum pubescens* RUIZ & PAVON

MARIO HUMBERTO DEL SOCORRO SABORÍO MORA
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. CYRO PAULINO DA COSTA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1989

S117a

Saborio Mora, Mario Humberto del Socorro
Auto-incompatibilidade em Capsicum pubescens

Ruiz e Pavon. Piracicaba, 1989.

69p.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Pimenta - Autoincompatibilidade genética
2. Pimenta - Melhoramento I. Escola Superior de A
gricoltura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.84

AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavon

MARIO HUMBERTO DEL SOCORRO SABORIÓ MORA

Aprovada em: 01/03/1989

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa

ESALQ/USP

Prof. Dr. Norberto da Silva

UNESP

Prof. Dr. Tosiaki Kimoto

UNESP

Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa
Orientador

À minha esposa MARTA, o grande amor de minha vida,
À nossa geração F₁, PAMELA e LILIA, motivo de nossa existência
À minha mãe, BETTY, por ter me dado a vida, e muito mais

DEDICO

A meus avós, JOSÉ e ESPERANZA, agricultores
de vocação, que plantaram a semente de amor
e cuja colheita vai perdurar para sempre.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Cyro Paulino da Costa, pela orientação e ensinamentos recebidos;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Genética, ESALQ/USP, pelos ensinamentos e facilidades concedidas;
- Aos funcionários do Serviço de Comutação Bibliográfica, Biblioteca do Departamento de Genética e Biblioteca Central do Campus de Piracicaba, especialmente à Eliana Maria Garcia Sabino, pela sua valiosa ajuda e espírito de colaboração;
- Ao Dr. Wilson Maluf e à bióloga Masako T. Braghini da Bioplanta Tecnologia de Plantas por ter facilitado o uso do microscópio de fluorescência.
- Aos colegas do curso Selma T. Ohashi, José L. Susumu, Alfredo P. de Andrade, Hernando Rangel, Luis Miguel Raidan, Cristian Domansky e Hermez Aramendiz, pelas longas horas de estudo compartilhadas, e sobretudo, pela amizade;
- Ao Engº Agrº Alfredo Pereira de Andrade Neto, pelas sugestões e revisão do manuscrito;
- Ao Ministério de Agricultura da Costa Rica e ao Banco Interamericano de Desenvolvimento, pela concessão da bolsa de estudo;
- À Maria Helena M.O. Rodrigues pela eficiente datilografia.

S U M Á R I O

	Página
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. O gênero <i>Capsicum</i> e a espécie <i>C. pubescens</i> ...	3
2.2. Auto-incompatibilidade	5
2.2.1. Auto-incompatibilidade e evolução	7
2.2.2. Classificação dos sistemas de auto-in-	
compatibilidade	9
2.2.2.1. O tempo de ação gênica	10
2.2.2.2. A associação com polimorfismo	
floral	11
2.2.2.3. O sítio de expressão gênica ..	11
2.2.2.4. O envolvimento de séries polia	
lélicas e o número de loci ...	12
2.2.3. As bases genéticas da auto-incompatibi-	
lidade	13
2.2.4. Interações pólen-pistilo	16
2.2.5. Auto-incompatibilidade de <i>C. pubescens</i> ..	19
2.3. Superação da barreira de auto-incompatibilidade	20
2.3.1. Tratamento com altas temperaturas	20
2.3.2. Aplicação de hormônios e inibidores	21
2.3.3. Fatores relacionados com a idade	23

3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Local e período de experimentação	25
3.2. Material experimental	25
3.3. Semeadura, transplante e tratos culturais	28
3.4. Classificação dos genótipos segundo a reação de auto-incompatibilidade	28
3.4.1. Frutificação após autopolinização e in- tercruzamento varietal e estimação do índice de auto-incompatibilidade	29
3.4.2. Crescimento dos tubos polínicos no tec <u>i</u> do estilar	32
3.5. Técnicas de superação da barreira de auto - in- compatibilidade	34
3.5.1. Autopolinização na fase de botão floral.	34
3.5.2. Autopolinização na fase de botão floral com uso de substâncias coadjuvantes ...	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Índice de auto-incompatibilidade	37
4.2. Crescimento dos tubos polínicos no tecido esti <u>l</u> lar	46
4.3. Autopolinização na fase de botão floral	50
5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICE	66

AUTO-INCOMPATIBILIDADE EM *Capsicum pubescens* RUIZ & PAVON

Autor: MARIO SABORÍO MORA

Orientador: Prof. Dr. CYRO PAULINO DA COSTA

RESUMO

A auto-incompatibilidade é um caráter de ocorrência comum nas angiospermas. Na família Solanaceae o sistema gametofítico controlado por alelos múltiplos é encontrado em gêneros de importância econômica tais como *Nicotiana*, *Lycopersicon*, *Petunia*, *Solanum* e *Capsicum*. A obtenção de progênes autofecundadas em populações auto-incompatíveis pode ser dirigida à seleção de genes recessivos de interesse particular, produção de linhagens com alta capacidade de combinação e a manutenção de altos níveis de fertilização sob condições desfavoráveis à polinização cruzada.

O presente trabalho teve como objetivos: classificar os genótipos de *Capsicum pubescens* com relação à reação de auto-incompatibilidade e superar a auto-incompatibilidade por meio de autopolinização no botão floral. As variedades foram classificadas segundo o "índice de auto-incompatibilidade" (ZAPATA & ARROYO, 1978) e pelo crescimento dos tubos

polínicos no tecido estilar (MARTIN, 1959). A autopolinização no botão floral foi realizada um, dois e três dias pré-antese.

Segundo as observações e resultados, concluiu-se que:

- As variedades de *C. pubescens* mostraram variação com relação à reação de auto-incompatibilidade, sendo que houve variedades autocompatíveis, parcialmente auto-incompatíveis e auto-incompatíveis.

- Tanto nas variedades auto-compatíveis como nas variedades parcialmente auto-incompatíveis, existe uma frequência variável de indivíduos totalmente autocompatíveis, provavelmente como consequência de mutações no locus S.

- A inibição do crescimento dos tubos polínicos ocorreu a diferentes níveis do estilete e possivelmente também no tecido do ovário.

- A auto-incompatibilidade foi difícil de ser superada por polinização no botão floral, sendo portanto, uma prática não recomendável para se obter progênie autofecundadas em populações auto-incompatíveis.

SELF-INCOMPATIBILITY IN *Capsicum pubescens* RUIZ & PAVON

Author: MARIO SABORÍO MORA

Adviser: Prof. Dr. CYRO PAULINO DA COSTA

SUMMARY

The self-incompatibility is a common phenomenon in angiosperms. In Solanaceae the gametophic system controlled by multiple alleles is founded in economically important genus as *Nicotiana*, *Lycopersicon*, *Solanum*, *Petunia* and *Capsicum*. The induction of self-compatibility in self-incompatibility populations can be used for three different purposes: the production in homozigous condition of valuable combinations of recessive genes, the production of inbreed lines with superior combining ability and the maintenance of a high level of fertilization under unfavorable conditions to cross pollination.

The present study aimed to classify the genotypes of *Capsicum pubescens* with respect to the self-incompatibility reaction and to overcome this reaction by means of bud pollination. The classification of the varieties was released according to the "index of self-incompatibility" (ZAPATA & ARROYO, 1978) and the pollen tube growth in the style tissue (MARTIN, 1959). The bud pollinations were made at one, two and three days before anthesis.

According to the observations and experimental results, it was concluded that:

- The *C. pubescens* varieties showed variation with respect to the self-incompatibility reaction, thus there were self-compatibles, partially self-incompatibles and self-incompatibles varieties.

- In the self-incompatible and partially self-incompatible varieties there are a variable frequency of totally self-compatible individuals, probably as a consequence of mutations at locus **S**.

- The pollen tube growth inhibition was observed at different levels of the style and possibly it took place at the ovary tissue also.

- Self-incompatibility was difficult to overcome by bud pollination and this is not of practical use for obtaining selfed progenies in self-incompatible populations.

1. INTRODUÇÃO

Na família Solanaceae as pimentas e pimentões, gênero *Capsicum*, constituem um dos grupos de olerícolas de grande importância a nível mundial. Tal como as outras solanáceas de fruto, a sua contribuição à dieta humana relaciona-se principalmente ao suprimento de vitaminas.

No Brasil, a pimenta é o condimento que, depois da cebola e o alho, apresenta maior valor econômico (CAMARGO, 1984). O seu uso tem se incrementado nos últimos anos principalmente para fins de processamento, utilizando as espécies *Capsicum chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens* e *C. praetermissum*, incluindo variedades domesticadas e selvagens.

Capsicum pubescens é uma das cinco espécies domesticadas do gênero, porém é a única delas que não é cultivada no Brasil. Os pesquisadores têm dado pouca atenção a esta espécie, e na literatura científica mundial a maioria da informação existente se refere a aspectos de origem e taxonomia.

Sendo a pimenteira uma planta termófila, não existem cultivares locais desenvolvidos para o plantio duran

te as épocas em que predominam temperaturas baixas, sendo este um aspecto mais limitante nas condições da região Centro-Sul do país. Levando em conta que *C. pubescens* foi domesticada na Cordilheira dos Andes na Bolívia e sob regimes de temperatura amena, esta espécie poderia ser considerada como uma alternativa para o cultivo da pimenta nas condições climáticas de baixa temperatura. Além disso, as variedades desta espécie são cultivares primitivos com alto grau de variabilidade genética e assim com grande potencial para o seu melhoramento.

Num trabalho envolvendo três variedades de *C. pubescens*, YAQUB & SMITH (1971) informaram da existência de auto-incompatibilidade do tipo gametofítico, que é um fenômeno que tem importância para o estudo da evolução desta espécie, bem como para os futuros trabalhos de melhoramento.

No Banco de Germoplasma do Setor de Hortaliças do Departamento de Genética (ESALQ/USP) existe uma série de introduções de *C. pubescens* que ainda não foram avaliados em relação a sua biologia reprodutiva.

O presente trabalho teve como objetivos: classificar os genótipos de *C. pubescens* em relação a sua reação de auto-incompatibilidade e superar a auto-incompatibilidade por meio de autopolinização na fase de botão floral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Capsicum* e a espécie *C. pubescens*

O gênero *Capsicum* teve origem numa área nuclear na Bolívia Central a partir de *C. chacoense*, originando assim os grupos de flor púrpura e flor branca. O grupo de flor púrpura (representado por *C. eximium*) migrou até as terras altas dos Andes, onde a seleção direcional e a deriva genética produziram *C. cardenasii* e *C. pubescens*. O grupo de flor branca migrou da área nuclear e originou o grupo de *C. baccatum*, esta espécie continuou migrando na selva amazônica úmida desenvolvendo também o progenitor selvagem de *C. annum* (MC LEOD et alii, 1982). A hipótese anterior é reforçada pelo fato de não existirem palavras nas antigas línguas (latim, hebreu, sânscrito, chinês ou grego) para denominar os frutos de *Capsicum*, ao contrário do que aconteceu nas línguas americanas. Além disso, evidências arqueológicas encontradas no México e Peru, indicam o consumo de *Capsicum* pelas civilizações antigas desde 7000 anos A.C. (BIRD, 1948; MC NEISH, 1964; ANDREWS, 1984).

Os primeiros conquistadores europeus encontra-

ram as plantas de *Capsicum* distribuídas por toda América Tropical. No México, os astecas a chamavam "chilli", na América Central recebia o nome de "aji" e na América do Sul era chamada pelos incas de "uchu" ou "huayca". A sua dispersão teve início no final do século XV, quando Cristovão Colombo regressou da sua primeira viagem e levou os primeiros frutos. Após sua introdução na Europa o *Capsicum* dispersou-se mundialmente (ANDREWS, 1984).

A primeira descrição de *Capsicum* foi feita por Joseph Pitton de Tournefort no seu livro "Institutiones rei herbariae", publicado em 1719. No ano de 1753 Linneus publicou "Species plantarum" e manteve o nome genérico proposto por Tournefort (ANDREWS, 1984). Atualmente no gênero *Capsicum* são reconhecidas cinco espécies domesticadas: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens*, e aproximadamente trinta espécies selvagens (SMITH & HEISER, 1957a; HEISER, 1964; ESHBAUGH, 1970; PICKERSGILL, 1971; ESHBAUGH, 1980a,b). Entre as espécies domesticadas a *C. pubescens* é a única que não é cultivada no Brasil (CASALI & COUTO, 1984).

A espécie *C. pubescens* foi primeiramente descrita por Ruiz & Pavon¹, citados por HEISER & SMITH (1948). Na literatura contemporânea a descrição correspondeu a HEISER & SMITH (1948). Trata-se de uma espécie atualmente cultivada nas zonas altas da América do Sul, América Central e México

¹ RUIZ, H. & PAVON, J. Flora Peruviana et Chilensis, 2: 30 - 1, 1790.

(SMITH & HEISER, 1957b; IBPGR, 1983). Apresenta grande variabilidade no tamanho, forma e cor dos frutos, enquanto que outros caracteres morfológicos; caule, folhas, flores e sementes são uniformes. O caule e as folhas são pubescentes, sendo que as folhas tendem a apresentar rugosidade entre as veias. As flores surgem solitárias em cada nó, pedúnculo ereto na antese, corola púrpura, cálice de frutos maduros sem constrição anular na união com o pedúnculo e sementes rugosas com cor variável entre marron e preto. O florescimento ocorre sob fotoperíodo de 11 - 13 horas. As temperaturas altas podem diminuir o vigor nas plantas (HEISER & SMITH, 1948; HEISER & SMITH, 1953; RICK, 1950; ANDREWS, 1984).

2.2. Auto-incompatibilidade

Na literatura existem diversas definições da auto-incompatibilidade, LUNDQVIST (1964) definiu-a em plantas superiores como "a inabilidade de uma planta hermafrodita produzir zigotos depois da autopolinização".

Os sistemas de auto-incompatibilidade estão amplamente difundidos nas plantas. East², citado por NETTANCOURT (1977) estimou que nas plantas que produzem flores existem pelo menos 3000 espécies auto-incompatíveis.

² EAST, E.M. The distribution of self-sterility in flowering plants. Proc. Am. Phil. Soc., 82: 449-518, 1940.

Porém, Darlington & Mather³, citados por NETTANCOURT (1977), assim como BREWBAKER (1959) reportam que os sistemas de auto-incompatibilidade estão presentes em aproximadamente 40 - 50% das espécies analisadas, com base numa amostra representativa. A nível de família, Knox & Dumas⁴, citados por GAUDE & DUMAS (1987), estimam que a auto-incompatibilidade existe em aproximadamente 100 das 300 famílias de angiospermas.

Nas espécies cultivadas a auto-incompatibilidade parece ser menos freqüente que em seus parentes selvagens. Possivelmente, isto está relacionado com a presença do fenómeno de pseudocompatibilidade (tendência de um indivíduo auto-incompatível para formar semente depois de autofecundação) sendo postulado que esta variação foi selecionada no início do processo de domesticação como uma alternativa para se adaptar em condições anormais, isto é, ausência de insetos polinizadores, restrição no número de genótipos de incompatibilidade, ou em pressões de seleção específicas para obter um máximo rendimento de sementes (MATHER, 1953; ROWLANDS, 1964).

³ DARLINGTON, C.D. & MATHER, K. The elements of genetics. Allen and Unwin Ltd., 1949.

⁴ KNOX, R.B. & DUMAS, C. In: Recent topics in experimental and conceptual plant pathology. Singh, R.S. ed. London, Oxford University Press, 1986.

2.2.1. Auto-incompatibilidade e evolução

Os sistemas de auto-incompatibilidade, segundo CROWE (1964), além de serem comuns nas angiospermas, são de origem antiga, tanto quanto a origem das famílias nas quais ocorrem.

De um modo geral, as espécies auto-incompatíveis têm uma estrutura genética muito flexível e uma grande capacidade de adaptação, estes são aspectos que foram favoráveis no processo evolutivo (NETTANCOURT, 1977). Por sua vez, o surgimento de espécies alógamas deve ter sido acompanhado com a evolução de insetos polinizadores (GRANT, 1949). A hipótese de que os sistemas de auto-incompatibilidade surgiram cedo no caminho evolutivo é apoiada pelo fato de que sua ocorrência é maior nos centros de origem das espécies e que os sistemas de reprodução autoférteis são mais comuns em regiões periféricas aos centros de origem (STEBBINS, 1957). Levando-se em conta que os sistemas de polinização cruzada são responsáveis pelo sucesso das angiospermas, surge então, a questão da alta proporção de espécies autocompatíveis bem adaptadas. A explicação a isto, segundo STEBBINS (1957) deve basear-se em alguns fatos que apoiam a hipótese de que os sistemas autocompatíveis são uma "condição derivada" dos sistemas auto-incompatíveis. O mesmo autor enfatiza que algumas características morfológicas de muitas espécies autocompatíveis seriam mais especializadas em relação a seus parentes auto-incompatíveis, e podem ter evoluído recentemente. Como exemplo disto,

cita os mecanismos altamente especializados de dispersão de sementes em populações autocompatíveis de *Bromus*, *Hordeum*, *Medicago* e *Trifolium*. Ainda com respeito a caracteres morfológicos, o autor cita o caso de estruturas próprias de sistemas reprodutivos de cruzamento como as referentes à disseminação de pólen e adaptação a visita de insetos polinizadores, os quais, prevalecem em espécies autoférteis e devem ter sido selecionadas a partir de sistemas reprodutivos estritamente alógamos. Outro fato é que existe evidência de que um número de espécies autógamas podem ter se originado de espécies alógamas, como o caso de *Primula vulgaris* em que a homostilia substituiu a heterostilia sob condições desvantajosas ao heteromorfismo.

Depois de analisados os aspectos evolutivos anteriores fica mais fácil compreender porque os sistemas de autofertilidade têm sucesso, apesar da aparente vantagem dos sistemas de fertilização cruzada. Em primeiro lugar, LEWIS & CROWE (1958) consideraram a alogamia nas angiospermas como um sistema reprodutivo absolutamente necessário em certa etapa da seqüência evolucionária de uma espécie, contudo, e depois destas terem se adaptado ao ambiente, podem sobreviver sem os benefícios da alogamia tolerando a autogamia se ela surgisse. Outro argumento a favor foi dado por STEBBINS (1957) e está relacionado com a tendência à sobrevivência de uma espécie auto-incompatível em circunstâncias adversas para eficiente disseminação do pólen (pseudocompatibilidade).

Stebbins⁵, citado por NETTANCOURT (1977) sugeriu que o estabelecimento e expansão das espécies autoférteis está ligado à colonização de novos habitats, bem como relacionado com a possível superioridade daquelas quanto à propagação regular e uniforme, através das gerações, aspecto que caracteriza as espécies colonizadoras.

Para se entender a boa adaptação e o sucesso das espécies autógamas, é necessário lembrar que ao contrário do que comumente se acredita, as populações de plantas autógamas também demonstram altos níveis de diversidade genética (ALLARD, 1966; ALLARD et alii, 1968).

2.2.2. Classificação dos sistemas de auto-incompatibilidade

De acordo com NETTANCOURT (1977), os sistemas de autocompatibilidade podem ser classificados sob diferentes maneiras:

⁵ STEBBINS, G.L. Variation and evolution in plants. New York, Columbia University Press, 1950.

- o tempo de ação gênica
- a associação com polimorfismo floral
- o sítio de expressão gênica
- o envolvimento de séries polialélicas e o número de loci.

2.2.2.1. O tempo de ação gênica

No pistilo, o tempo de ação gênica, ou seja, o estado no qual a planta determina o seu fenotipo de incompatibilidade, coincide com a abertura da flor. Antes e depois deste estágio, o pistilo de plantas auto-incompatíveis poderiam aceitar o seu próprio pólen. Porém, a capacidade para aceitar o seu próprio pólen é extremamente variável e não pode ser usada para fazer distinção entre diferentes sistemas de incompatibilidade. Por outro lado, no estame, o momento de ação gênica é um dos fatores principais para classificação dos sistemas de auto-incompatibilidade, os sistemas podem dividir-se em dois grupos:

- **Incompatibilidade esporofítica:** Neste o fenótipo de incompatibilidade no pólen é determinado pelo genótipo da planta que produz o pólen, e o tempo de ação gênica parece ser pré-meiótico, ou em último caso, meiótico, isto é, antes da individualização das tétradas.

- Incompatibilidade gametofítica: Neste o genótipo da micrôspora individual determina o fenótipo do pólen, assim, a ação gênica ocorre depois da primeira metafase da meiose (NETTANCOURT, 1977).

2.2.2.2. A associação com polimorfismo floral

No sistema gametofítico sempre existe homomorfismo floral e é totalmente determinado pela capacidade do pólen de crescer através do estigma ou estilo para efetuar fertilização. No entanto, muitas espécies com incompatibilidade esporofítica combinam o mecanismo de rejeição do pólen com algumas diferenças associadas à morfologia floral e contribuem a evitar autopolinização. Estes sistemas são chamados heteromórficos (PANDEY, 1970).

2.2.2.3. O sítio de expressão gênica

A reação da auto-incompatibilidade pode ocorrer em três diferentes níveis estruturais da flor: o estigma, o estilete e o ovário. A inibição estigmática é característica de espécies com pólen trinucleado e, com algumas exceções, a incompatibilidade pólen-estigma é restrita a sistemas esporofíticos (HESLOP-HARRISON et alii, 1974). A inibição estilar, com poucas exceções, é própria de espécies com pólen bi-

nucleado e que apresentam o sistema gametífico de incompatibilidade (NETTANCOURT, 1977). A reação de inibição no ovário é considerada essencialmente um caso de antagonismo entre células haplóides e não entre o pólen (haplóide) e o tecido estilar ou estigmático (diplóide) como na maioria dos sistemas. Além disso, BREWBAKER (1957) informou que a inibição ao nível de ovário estava associada na maioria dos casos, com estiletes ocos o qual dispensava o contato íntimo entre pólen e estilete, não tendo assim a reação de incompatibilidade neste nível.

2.2.2.4. O envolvimento de séries polialélicas e o número de loci

Neste caso, os sistemas de incompatibilidade podem classificar-se em:

1) Sistemas com séries polialélicas em um, dois ou mais loci, em espécies gametofíticas e esporofíticas.

2) Com dois alelos por locus em um ou mais loci, típico de espécies esporofíticas (NETTANCOURT, 1977 e Hinata et alii⁶, citados por GAUDE & DUMAS, 1987).

⁶ HINATA, K.; OKAZAKI, K.; NISHIO, T. Proc. Int. Rapeseed Conf., 6th, Paris. 1: 354-9, 1983.

2.2.3. As bases genéticas da auto-incompatibilidade

O tipo mais comum e simples de controle genético da auto-incompatibilidade envolve o locus *S* com alelos múltiplos (NETTANCOURT, 1977). Assim, a rejeição do pólen pelo pistilo ocorre quando os produtos dos alelos *S* no estigma, estilete ou ovário são também expressas pelo grão de pólen ou pelo tubo polínico.

No sistema esporofítico existe dominância entre os alelos *S* e por este motivo podem existir homozigotos para o alelo *S* numa progênie de dois genótipos auto-incompatíveis, devido o que o controle genético permite que um grão de pólen carregando um alelo recessivo funcione num pistilo com o mesmo alelo (GAUDE & DUMAS, 1987).

No sistema gamtofítico o crescimento do tubo polínico é inibido dentro do estilete se o mesmo alelo *S* está presente. Não existe dominância dos alelos *S*, ou seja, as progênies são heterozigotas para esse locus (GAUDE & DUMAS, 1987). Segundo YAQUB (1967) o sistema de alelos múltiplos controlado gametofiticamente é o mais comum em termos do número de famílias e espécies nos quais está presente, sendo também conhecido como sistema *Nicotiana*. Este sistema tem sido identificado em muitas solanáceas de importância econômica tais como *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon*, *Petunia* e *Capsicum*.

A reação de incompatibilidade tem sido tradicionalmente explicada com base em dois modelos, segundo Lewis⁷, citado por GAUDE & DUMAS (1987): o modelo oposicional considera que o crescimento do tubo polínico incompatível é inibido ativamente por moléculas específicas do pistilo; o modelo complementar implica um sistema passivo onde os tubos polínicos incompatíveis não conseguem ativar os nutrientes necessários para o seu crescimento, os quais seriam sintetizados pelo pistilo.

No sistema gametofítico o modelo oposicional é amplamente aceito, porém MULCAHY & MULCAHY (1983) consideraram que este modelo não explica totalmente o fenômeno. Estes autores propuseram o modelo de heterose, que tenta fazer uma comparação da interação pólen-pistilo com as interações entre genomas que resultam na expressão de heterose. Ou seja, se o pólen e pistilo têm alelos diferentes ocorre um incremento na taxa de crescimento do tubo polínico. Em contraste, se a combinação de alelos for homozigota a taxa de crescimento do tubo polínico é reduzida. Considerando um locus com alelos múltiplos poder-se-ia pensar que a magnitude do crescimento do tubo polínico seria consequência da combinação alélica específica, isto é, do grau de heterose, por outro lado, a expressão genotípica seria de natureza quantitativa, desde a inibi-

⁷ LEWIS, D. Sexual incompatibility in plants. London, Arnold, 1979.

ção precoce do tubo logo após germinação do pólen até crescimento completo e fertilização do óvulo. No entanto MULCAHY & MULCAHY (1983), ao propor este modelo sugerem a possibilidade de controle genético por um sistema multigênico oligoalélico em que quanto maior o número de loci comuns entre o pólen e o estilete mais forte será a reação de incompatibilidade. Em outras palavras, a taxa de crescimento do tubo polínico seria em função da soma de todas as interações pólen-pistilo.

Recentemente os mesmos autores chegaram à conclusão de que o modelo heterótico não foi aplicado na família Solanaceae, em base nos testes do número de loci envolvidos na incompatibilidade de *Lycopersicon peruvianum*, cujos resultados apoiam de novo o modelo oposicional (MULCAHY & MULCAHY, 1988).

Analisando os três modelos propostos e de acordo com os dados disponíveis na literatura, pode-se observar que nenhum deles explica totalmente o fenômeno de auto-incompatibilidade. Deste modo não pode descartar-se a possibilidade da existência de diferentes tipos de controle genético nas diferentes espécies, confirmando assim a complexidade envolvida e a necessidade de estudos adicionais a diferentes níveis.

Outro ponto importante a considerar e que foi mencionado no início deste capítulo, é o referentes à pseudo-compatibilidade, como sendo um evento que tenta explicar a aparição de indivíduos autocompatíveis em populações auto-incompatíveis. Existem evidências que sugerem que o fenômeno é

causado por interações alélicas intralocus (entre alelos do gene S), ou por interações alélicas inter-loci. Neste segundo caso, é proposta a participação de genes diferentes do gene S (ROBACKER & ASCHER, 1982), isto é, a presença de um gene epistático que em condições homozigota recessiva não permite a expressão da reação de incompatibilidade no estilo levando à aceitação dos próprios tubos polínicos.

2.2.4. Interações pólen-pistilo

Desde o momento em que o pólen chega ao estigma até ocorrer a fertilização (nos casos em que ocorre), existem uma série de processos de natureza física e química que determinam a falha ou sucesso do acasalamento.

O grão de pólen é uma estrutura desidratada, com 6 a 60% de água e geralmente sem atividade metabólica. É formado por uma parede externa, a exina, esta tem superfície irregular favorecendo a adesão ao estigma, logo em seguida existe uma parede interna chamada de intina. Nestas paredes são encontradas diversas substâncias tais como enzimas, proteínas, lipídios e glicoconjugados (STANLEY & LINSKENS, 1974) as quais devem ter alguma função como substâncias de reconhecimento (GAUDE & DUMAS, 1987). Os grãos de pólen podem ser bi ou tricolares à maturidade, dependendo da espécie.

O pistilo está constituído das seguintes estru

turas: estigma, estilete e ovário. O estigma é constituído de um tecido glandular e suas células epidérmicas são comumente alongadas formando papilas (ESAU, 1976). Segundo HESLOP-HARRISON & SHIVANNA (1977), existem dois tipos de estigma: o estigma úmido que se caracteriza pela secreção de um exudado, e o estigma seco que é coberto por uma fina película protéica. De acordo com HESLOP-HARRISON (1975) os sistemas de incompatibilidade esporofíticos operam com estigma seco e os sistemas gametofíticos são correlacionados com superfícies estigmáticas úmidas.

Para compreender melhor a resposta de rejeição do pólen ou do tubo polínico no pistilo, é preciso antes analisar o que acontece num acasalamento compatível. Quando o pólen é depositado no estigma a primeira coisa que acontece é a adesão, processo que envolve componentes de ambas superfícies. Depois se segue a hidratação do pólen, onde o fluxo de água vai desde o estigma até o pólen. Uma vez completamente hidratado, o grão de pólen germina e emerge o tubo polínico que entra em contato com as células da epiderme estigmática onde penetra e cresce através dos espaços intercelulares do estilete, constituídos principalmente de um meio fluido que facilita a travessia do tubo polínico. À medida que o tubo cresce diminui a pressão de turgência no seu interior induzindo um estresse físico que resulta na formação de uma obstrução de calosa que sela a extremidade do tubo até que a turgência seja restaurada quando então o crescimento é reiniciado

(GAUDE & DUMAS, 1987). Finalmente o tubo polínico atinge a micrópila e ocorre a fertilização.

Num acasalamento incompatível, independentemente do sistema de incompatibilidade, a rejeição do grão ou do tubo polínico é geralmente caracterizada pela síntese de calosa que é facilmente identificada no microscópio de fluorescência quando os tecidos são tingidos com anilina azul (MARTIN, 1959). Nos sistemas esporofíticos a síntese de calosa é acionada nas próprias papilas estigmáticas quando os grãos de pólen entram em contato, além disso, o grão de pólen sintetiza calosa que acumula no tubo emergente. Foi estabelecido que a resposta da incompatibilidade pode afetar os primeiros passos da polinização que são: adesão, hidratação e germinação (GAUDE & DUMAS, 1987). Em relação aos sistemas gametofíticos a síntese de calosa é realizada somente no pólen e os tubos polínicos paralizam seu crescimento no estilete ou no ovário. Na espécie *Nicotiana glauca* o crescimento dos tubos polínicos paralizam seu crescimento no terço superior do estilete e a calosa sintetizada se deposita no extremo do tubo polínico que fica entupido e algumas vezes arrebenta (CLARKE et alii, 1985). Em outras espécies, tais como *Lycopersicon peruvianum*, *Capsicum cardenasii* e *C. pubescens*, também foi observada inibição dos tubos polínicos na parte superior do estilete (WEBB & WILLIAMS, 1988a; YAQUB, 1967).

Parece ser que no sistema gametofítico os processos de adesão, hidratação e germinação ocorrem normalmente

e que a reação de incompatibilidade está em função da taxa de crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar.

2.2.5. Auto-incompatibilidade em *C. pubescens*

Dentro do grupo de espécies de *Capsicum* de flor branca não existe informação da ocorrência de auto-incompatibilidade. Por outro lado, no grupo de espécies de flor púrpura *C. eximium* é autocompatível, enquanto *C. cardenasii* é auto-incompatível (ESHBAUGH, 1982). A espécie domesticada *C. pubescens* era considerada autocompatível até que YAQUB & SMITH (1971) encontraram uma raça auto-incompatível, num estudo que envolveu três raças desta espécie. Os autores demonstraram a existência de auto-incompatibilidade na raça SA-359 com base na ausência de frutificação após autopolinização como também pela observação de inibição do crescimento dos tubos polínicos no estilete após autopolinização. Além disso concluíram que o sistema operante é de natureza multialélica e controlado gametofiticamente, levando em conta a citologia do pólen (bicelular) e a presença de quatro grupos de indivíduos intra-estéreis e interférteis na progênie de duas raças auto-incompatíveis não aparentadas. Com respeito à herança do caráter, os autores observaram que no cruzamento entre uma raça autocompatível e uma auto-incompatível as plantas F_1 mostraram serem 100% autocompatíveis.

2. 3. Superação da barreira de auto-incompatibilidade

A obtenção de progênes autofecundadas em plantas auto-incompatíveis pode ser dirigida à seleção de genes recessivos de interesse particular, o estabelecimento de linhagens com alta capacidade combinatória para produção de semente híbrida e manutenção de altos níveis de fertilização sob condições desfavoráveis à polinização cruzada.

Os mecanismos pelos quais pode-se alterar o caráter de auto-incompatibilidade são de natureza genética tais como alteração no nível de ploidia ou mutação gênica, ou de natureza fisiológica como o uso de radiações, fertilização "in vitro", mutilação e injeção, enxertia, pólen pioneiro, tratamento com altas temperaturas, aplicação de hormônios e inibidores e, fatores relacionados com a idade (NETTANCOURT, 1977), sendo que os três últimos mencionados têm mostrado maior sucesso.

2. 3.1. Tratamento com altas temperaturas

O aumento da temperatura em condições de estufa tem sido o principal método utilizado. Os resultados obtidos em *Lycopersicon* (NETTANCOURT et alii, 1971; HOGENBOOM, 1972) e *Trifolium* (LEFFEL, 1963) indicam que o local da reação é o estilete e não o pólen e que o período sensível ao tratamento corresponde aos dois primeiros dias depois da polinização.

WILLIAM & KNOX (1982) observaram em *L. peruvianum* que temperaturas maiores a 35°C antes da polinização afetaram a resposta de auto-incompatibilidade. No gênero *Brassica* a eficiência do tratamento parece ser dependente do genótipo (VISSER, 1977; RICHARDS & THURLING, 1973; INSTITUTE FOR AGRICULTURAL PLANT BREEDING, 1977). Os tratamentos extremos têm mostrado alguns efeitos indesejáveis. Por exemplo, em *L. peruvianum* as baixas temperaturas (7 - 10°C) depois da polinização inibiu o crescimento de tubos polínicos compatíveis e incompatíveis, enquanto que tratamento a 30-35°C inibiram a germinação do pólen no estigma. Na faixa de 15-25°C a temperatura afetou a resposta da auto-incompatibilidade (WILLIAMS & KNOX, 1982). WEBB & WILLIAMS (1988a) informaram que em flores destacadas de *L. peruvianum* o aumento de 15°C até 25°C junto com um déficit de energia no meio de cultura provocaram um enfraquecimento na expressão do genótipo de auto-incompatibilidade, porém os mesmos autores não recomendam o uso desta técnica para a produção de semente autofecundada, devido à baixa intensidade da resposta.

De um modo geral, a ação das altas temperaturas, segundo PANDEY (1972, 1973) é o resultado da inativação e desnaturização de proteínas específicas envolvidas na expressão da reação.

2.3.2. Aplicação de hormônios e inibidores

A aplicação de inibidores da abscisão floral tais como o ácido naftalenacético ou o ácido indolacético tem como objetivo permitir aos tubos polínicos incompatíveis de lento crescimento atingir o ovário antes da queda da flor. Este método tem sido utilizado em *Nicotiana* (PANDEY, 1968) e *Lycopersicon* (NETTANCOURT et alii, 1971), entre outros. Outros autores têm explorado o uso de inibidores da síntese protéica. Em *L. peruvianum* SARFATTI et alii (1974) encontraram que no tratamento do pólen com actinomicina-S e posterior autopolinização os tubos polínicos tiveram um crescimento maior dentro do estilete com relação ao tratamento controle. Os autores postularam que a actinomicina poderia ter inibido a síntese de algumas proteínas no pólen responsáveis pela reação de incompatibilidade. Conclusões similares foram obtidas por ASCHER (1971) com *Lilium longiflorum* e por Hodgdon & Hecht⁸, citados por NETTANCOURT (1977) em *Oenothera organensis*.

Uma outra substância que tem sido efetiva para indução de autofertilidade é o dióxido de carbono (CO₂). Em sistemas de incompatibilidade esporofíticos (*Brassica*) o aumento do nível de CO₂ até 3-5% provocou um aumento no grau de penetração dos tubos polínicos no tecido estigmático incompatível (NAKANISHI et alii, 1969; NAKANISHI & HINATA, 1973; 1975;

⁸ HODGDON, A.L. & HECHT, A. The effect of p-chloromercuribenzoate on the incompatibility mechanism in exsist styles of *Oenothera organensis*. Incomp. Newsletter Assoc. EURATOM-ITAL, Wageningen, 5: 29-31, 1975.

TAYLOR, 1982). Existe, no entanto, diferença na resposta ao tratamento com CO₂ dependendo do genótipo usado (NATIONAL VEGETABLE RESEARCH STATION, 1979). Em *L. peruvianum* a aplicação de CO₂ a 5% durante oito horas após a polinização não mostrou efeito sobre a reação de auto-incompatibilidade (WEBB & WILLIAMS, 1988a).

2.3.3. Fatores relacionados com a idade

Levando em consideração que o genótipo da incompatibilidade no estilete geralmente coincide com a maturidade da flor, tem sido tentada a técnica da polinização na fase do botão floral, levando em conta a hipótese de que neste estágio o gene *S* ainda não ativou os mecanismos fisiológicos que determinam a reação de auto-incompatibilidade. Esta técnica foi usada com sucesso em *Brassica oleracea* var. *capitata* (ATTIA, 1950), *Oenothera organensis* (LEWIS, 1951) *Petunia axillaris* (SHIVANNA & RANGASWAMY, 1966), entre outros; e é hoje de uso comum para produção de linhagens necessárias na produção de semente híbrida em *Brassica* (NETTANCOURT, 1977). Segundo Linskens⁹, citado por NETTANCOURT (1977) o momento ótimo para a polinização no botão floral corresponde ao período entre dois e quatro dias antes da antese. Em *Capsicum pubes-*

⁹ LINSKENS, H.F. The influence of castration on pollen tube growth after self-pollination. In: . Pollen, physiology and fertilization. Amsterdam, North Holland, 1964. p.230-6.

cens e *C. cardenasii* (auto-incompatíveis) a autopolinização na fase de botão floral não produz frutificação porque os tubos polínicos não penetraram mais do que 20% do comprimento do estilete (YAQUB, 1967).

GRADZIEL & ROBINSON (1986) obtiveram sucesso na autopolinização sobre estigmas imaturos de espécies auto-incompatíveis de *Lycopersicon* e *Solanum*. Os autores aplicaram uma solução de ácido bórico e nitrato de cálcio mais uma camada de óleo mineral sobre a superfície estigmática polinizada, com o objetivo de fornecer um meio apropriado para a germinação do pólen além de proteção contra a dessecação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e período de experimentação

O trabalho foi conduzido nas condições de campo e laboratório do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, na latitude $22^{\circ}42'30''$ S a 580 m do nível do mar. O experimento foi realizado no período de janeiro a novembro de 1988. Nas Figuras 1 e 2 são apresentados os dados climáticos de temperatura e precipitação durante esse período.

3.2. Material experimental

Foram utilizadas 12 variedades e um híbrido de *Capsicum pubescens*. As variedades foram obtidas do Banco de Germoplasma de Hortaliças do Departamento de Genética - ESALQ/USP e do Programa de Recursos Fitogenéticos do Centro Agronômico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Costa Rica. O material híbrido F_1 , proveniente do cruzamento entre uma variedade autocompatível e outra auto-incompatível foi obtido

em testes preliminares realizados na ESALQ no ano de 1987. Na Tabela 1 é apresentada a identificação dos materiais avaliados.

Tabela 1. Número de introdução, denominação e procedências dos genótipos de *C. pubescens* avaliados. Piracicaba-SP, 1988.

Número de introdução ^{a/}	Denominação	Procedência
82Pl	-	-
351	Rocoto	Peru
393	Rocoto	-
496	#917 REG/FAO	Guatemala
501	#945 REG/FAO	Guatemala
513	# 127 AJI	Bolívia
1001	CATIE 7428	Costa Rica
1002	CATIE 9129	México
1003	CATIE 6140	Guatemala
876	Pimenta Peruana	Peru
791	Pimenta Cubana	México
557	#290 Locoto	Bolívia
-	Cruzamento 791 x 1003	ESALQ/USP

^{a/} Código de introdução do Banco de Germoplasma de *Capsicum* do Departamento de Genética - ESALQ/USP.

Figura 1. Dados de precipitação durante o período experimental, 1988.*

Figura 2. Dados de temperatura durante o período experimental, 1988.*

*Fonte: DEPARTAMENTO DE FÍSICA E METEOROLOGIA-ESALQ/USP.

3.3. Semeadura, transplante e tratos culturais

As sementes foram semeadas em bandejas de isopor, sendo usado como substrato um composto orgânico comercial. O transplante para o campo foi feito 60 dias após a semeadura e usou-se um espaçamento de 1,0 m x 1,5m entre plantas e entre fileiras respectivamente, com dez plantas por tratamento. Os tratos culturais relativos às irrigações, aplicações de defensivos e estaqueamento seguiram as recomendações do Departamento de Genética.

3.4. Classificação dos genótipos segundo a reação de auto-incompatibilidade

Os genótipos foram classificados quanto a auto-incompatibilidade com base em duas metodologias consideradas complementares, como sendo: a frutificação em flores autopolinizadas e o crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar.

3.4.1. Frutificação após autopolinização e intercruzamento intravarietal e estimação do índice de auto-incompatibilidade

Na autopolinização, para cada tratamento foram marcados pelo menos 30 botões florais localizados nos ramos primários e secundários, os quais, um dia antes da antese foram emasculados e cobertos individualmente com cones de papel, segundo a técnica descrita DEMPSEY (1961). Nas Figuras 3 e 4 se ilustram os procedimentos de emasculação e cobertura das flores respectivamente. No dia seguinte os estigmas foram polinizados com pólen de anteras maduras da mesma planta. A coleta de anteras foi realizada entre 08:00 e 11:00 horas que é o período em que normalmente ocorre a antese. Utilizou-se uma quantidade de pólen em excesso para garantir um número de grãos suficientes nos estigmas e assim evitar diferenças dependentes da densidade no padrão de crescimento dos tubos polínicos (CRUZAN, 1986). Depois da polinização os botões foram novamente cobertos por cones de papel para evitar a contaminação do pólen estranho. A contagem de frutificação foi realizada oito dias após a polinização.

Realizou-se também um intercruzamento entre as dez plantas de cada variedade para obter a estimativa do índice de frutificação, sob a hipótese de que elas foram autocompatíveis. Assim, estimou-se um número esperado de frutos após autopolinização e os desvios foram testados por χ^2 . No intercruzamento seguiu-se a mesma técnica de polinização con-

Figura 3. Emasculação do botão floral. Piracicaba-SP, 1988.

Figura 4. Cobertura do botão floral. Piracicaba, 1988.

trolada efetuada na autopolinização. Foi calculado o índice de autocompatibilidade (IAI) desenvolvido por ZAPATA & ARROYO (1978) e adaptado por KENRICK & KNOX (1985) e GAUDE & DUMAS (1987), da seguinte forma:

$$IAI = \frac{\frac{NFOAP}{NFAP}}{\frac{NFOIC}{NFIC}}$$

onde:

IAI = índice de auto-incompatibilidade

NFOAP = número de frutos obtidos na autopolinização

NFAP = número de flores autopolinizadas

NFOIC = número de frutos obtidos no intercruzamento

NFIC = número de flores intercruzadas

Assim, as variedades com $IAI \geq 1$ foram consideradas autocompatíveis, aquelas com $0,2 \leq IAI < 1$ foram classificadas como parcialmente auto-incompatíveis e as variedades com $IAI < 0,2$ consideraram-se auto-incompatíveis.

3.4.2. Crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar

O diagnóstico da reação de auto-incompatibilidade foi complementado pela observação do crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar, segundo a metodologia propos

ta por MARTIN (1959). Para isto foram autopolinizadas dez flores por genótipo seguindo o esquema descrito no item 3.4.1. Os estiletes destas flores foram colhidos 48 horas após a polinização e fixados numa solução FAA (formalina, álcool a 80% e ácido acético na proporção 1:8:1), durante um período de 24 horas. Depois, os estilos foram lavados com água destilada e tratados com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 8N por um período de dez horas. A função do hidróxido de sódio foi de amaciar os tecidos e permitir uma adequada penetração do corante. Em seguida os estilos foram transferidos para recipientes com água destilada, por oito horas, para remover o excesso de hidróxido de sódio. Como corante foi usada solução de anilina azul hidrossolúvel a 0,1% em fosfato de potássio (K_3PO_4) 0,1N por quatro horas. Para observação os estiletes foram colocados sobre lâminas em gotas da solução corante e em seguida cobertas com lamínula. As avaliações foram feitas com microscópio ótico dotado de uma fonte de luz ultravioleta. O objetivo desta técnica foi identificar o crescimento dos tubos polínicos com base na fluorescência específica dos componentes de calosa localizados nas suas paredes. Deste modo pode-se efetuar o diagnóstico da reação de auto-incompatibilidade pela inibição do crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar característica esta do sistema de auto-incompatibilidade gametofítico.

3.5. Técnicas de superação da barreira de auto-incompatibilidade

3.5.1. Autopolinização na fase de botão floral

Com a finalidade de discriminar diferenças na expressão do genótipo de auto-incompatibilidade quanto ao tempo de ação gênica do locus *S*, a fase de botão floral foi dividida em três subfases segundo o grau de desenvolvimento, em relação aos dias de pré-antese, ou seja, subfases 3, 2 e 1 que corresponderam a 3, 2 e 1 dias pré-antese, respectivamente. É preciso esclarecer que devido à variação existente entre os genótipos com respeito à taxa de desenvolvimento dos botões florais, a classificação apresentada anteriormente foi considerada como um padrão. Sendo assim, em cada genótipo a escolha do estado de maturidade do botão floral foi feita em relação a um critério mais fisiológico do que cronológico. Porém, sempre tentou-se uma aproximação à classificação padrão, a Figura 5 ilustra as diferentes subfases do desenvolvimento dos botões florais. Dentro de cada genótipo foram escolhidos 20 botões florais de cada subfase, os procedimentos de emasculação, polinização e proteção dos botões florais estão descritos no item 3.4.1, porém, nesta etapa do experimento a polinização foi feita no dia da emasculação. A contagem de frutificação foi realizada oito dias após a polinização.

Figura 5. Fases de desenvolvimento do botão floral. Piracicaba-SP, 1988.

3.5.2. Autopolinização na fase de botão floral com uso de substâncias coadjuvantes

A maioria dos genótipos apresentaram na fase de botão floral a superfície do estigma seca. Porém, na sua fase receptiva, isto é, na antese, as flores normalmente apresentaram o estigma coberto com uma secreção mucilagínosa. Este comportamento foi denominado por HESLOP-HARRISON (1981) como "estigma úmido". Além disso tem sido detectada a presença de boro e cálcio neste exudado em diversas espécies. O exudado tem como função primária estimular a germinação do pólen (KNOX et alii, 1976; STANLEY & LINSKENS, 1974). De fato, a maioria das soluções para testar germinação de pólen "in vitro" tem como componente essencial o boro.

Nesta etapa do experimento a autopolinização seguiu o procedimento do item 3.5.1. Contudo, depois de colocado o pólen sobre o estigma aplicou-se, com ajuda de um cotonete, uma camada de uma solução composta de ácido bórico (H_3BO_3) a 100 ppm e nitrato de cálcio ($Ca [NO_3]_2$) a 300 ppm, e sobre esta uma camada de óleo mineral, segundo a metodologia proposta por GRADZIEL & ROBINSON (1986).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Índice de auto-incompatibilidade

Na Tabela 2 se observam os dados de cruzamento e autopolinização nas variedades de *Capsicum pubescens*, assim como a estimação do índice de auto-incompatibilidade (IAI).

Nos dados de intercruzamento foram obtidos porcentagens de frutificação que variaram entre 8,88 e 50%. Nos trabalhos de melhoramento de *Capsicum* normalmente são reportados baixos índices de frutificação que tem sido atribuídos a diversas causas, tais como influência de fatores climáticos, desbalanços nutricionais e ausência de receptividade do estigma no momento da polinização (DEMPSEY, 1961; COCHRAN, 1966; KISS & PAAL, 1974; FREE, 1975). Nas variedades classificadas como auto-incompatíveis e parcialmente auto-incompatíveis é possível que os baixos índices de frutificação foram causados pelo efeito dos alelos de incompatibilidade, sem desestimar a influência de alguns dos fatores já mencionados. Esta justificação não seria válida para as variedades autocompatíveis, isto é, o híbrido F₁ e 351, nesta última pode ter existido o efeito de viabilidade gamética reduzida como causa de desba-

Tabela 2. Análise do sistema reprodutivo em *C. pubescens* e estimação do índice de auto-incompatibilidade (IAI), Piracicaba, SP, 1988.

Variedade	Intercruzamento			Autopolinização			Nº esperado de frutos	χ^2	IAI ⁵	Fenótipo ⁶
	Nº cruzamentos (NFC) ¹	Nº frutos (NFOIC) ²	Frutificação (%)	Nº autopol. (NFAP) ³	Nº frutos (NFOAP) ⁴	Frutificação (%)				
82Pl	45	4	8,88	73	1	1,37	6,48	4,63*	0,15	AI
35l	45	10	22,22	36	8	22,22	8,0	0,00ns	1,00	AC
393	45	6	13,33	43	0	0,0	5,73	5,73*	0,00	AI
496	45	6	13,33	39	4	10,25	5,2	0,28ns	0,77	PAI
50l	45	18	40,00	30	1	3,33	12,0	10,08**	0,08	AI
513	45	15	33,33	62	1	1,61	20,66	18,71**	0,05	AI
100l	45	7	15,55	32	2	6,25	4,98	1,78ns	0,40	PAI
1002	45	18	40,00	45	0	0,0	18,0	18,0**	0,00	AI
1003	45	14	31,11	43	1	2,32	13,37	11,44**	0,07	AI
876	45	11	24,44	44	0	0,0	10,75	10,75**	0,00	AI
79l	45	18	40,00	51	16	31,37	20,4	0,95ns	0,78	PAI
557	45	12	26,66	83	0	0,0	22,13	22,13**	0,00	AI
F ₁	10	5	50,00	30	16	53,33	15,0	0,06ns	1,07	AC

¹ número de flores intercruzadas

² número de frutos obtidos do intercruzamento

³ número de flores autopolinizadas

⁴ número de frutos obtidos da autopolinização

⁵ $IAI = \frac{NFOAP/NFAP}{NFOIC/NFIC}$

⁶ AI = auto-incompatível

AC = autocompatível

PAI = parcialmente auto-incompatível

lanço cromossômico que, segundo SHOPOVA (1966) pode existir em alguns genótipos de *Capsicum* como consequência da depressão endogâmica que esteve envolvida na origem das espécies domesticadas.

Nos dados de autopolinização observou-se que a porcentagem de frutificação variou entre 0 a 53,3%. O número diferente de flores que foram utilizadas em cada variedade é explicado pela disponibilidade das mesmas durante essa fase do ensaio, pois cada variedade mostrou um padrão diferencial de florescimento. As variedades 393, 1002, 557 e 876 apresentaram 0% de frutificação, enquanto que as variedades 82Pl, 501, 513 e 1003 mostraram, 1,37; 3,33; 1,61 e 2,32%, respectivamente. Segundo o teste χ^2 todas elas apresentaram desvios significativos do número de frutos esperados e assim foram consideradas auto-incompatíveis. Isto é confirmado com o IAI para essas variedades que esteve na faixa de 0 a 0,2. Sob o mesmo critério as variedades 791, 396 e 1001 não mostraram desvios significativos do número de frutos esperado e segundo o IAI elas foram classificadas como parcialmente auto-incompatíveis. As variedades 351 e F₁ apresentaram um IAI ≥ 1 e foram classificadas como autocompatíveis. O comportamento do híbrido F₁, isto é, a progênie de cruzamento entre uma variedade autocompatível e uma auto-incompatível, concorda com os resultados obtidos por YAQUB (1967), com *C. pubescens*, em que todas as plantas F₁ foram autocompatíveis. Porém, existiu outro as

pecto em que os nossos resultados diferiram daqueles do autor. YAQUB (1967) conseguiu identificar, nas três variedades de *C. pubescens*, um comportamento mais do tipo qualitativo com relação à reação de auto-incompatibilidade, isto é, aquela que foi auto-incompatível não produz fruto nenhum quando auto polinizada e as outras duas variedades autocompatíveis frutificaram 50 e 60%, respectivamente. Este comportamento estável dos genótipos avaliados por YAQUB (1967) pode ter sido causado pela uniformidade das condições ambientais em que ele trabalhou, isto é, temperatura de 21,1°C e luminosidade constante, que foram aspectos que podem ter influido na expressão do gen *S* que, segundo WEBB & WILLIAMS (1988b), pode variar com as mudanças de ambiente. Nesse aspecto, CROWE (1971) estimou que os critérios de frutificação e crescimento do tubo polínico para estimar compatibilidade são válidos quando as diferenças entre cruzamentos compatíveis e incompatíveis são grandes, porém, não funcionam ante pequenas diferenças como as detectadas no presente trabalho. Desse modo, considerou-se essencial a aplicação do IAI para tentar discriminar as variedades de forma mais precisa e numa base quantitativa.

Com relação às variedades que foram classificadas como parcialmente auto-incompatíveis, o seu comportamento pode explicar-se com base no seguinte: MATHER (1953) e ROWLANDS (1964) definiram o termo "pseudocompatibilidade" para diferenciar aqueles genótipos que são capazes de autofrutificar ante condições adversas, como ausência de insetos polinizados-

res. No período em que foram realizados os cruzamentos e autopolinizações foi observada uma presença mínima de abelhas ou outros polinizadores devido as condições de baixa temperatura da época (inverno), pois segundo FAEGRI & VAN DER PIJL (1930) as abelhas diminuem sua atividade e permanecem nas colméias em períodos de baixa temperatura. Assim, poderia estabelecer-se uma analogia entre as variedades parcialmente auto-incompatíveis e o termo pseudocompatibilidade, já que estas variedades no seu habitat natural, isto é, a Cordilheira dos Andes, devem contar com a presença de um polinizador natural adaptado a essas condições. Com a domesticação da espécie o homem deve ter levado algumas raças para outros ambientes em que não existia o polinizador natural e este fator seletivo favoreceu o aparecimento de mecanismos alternos à polinização cruzada. De fato, as variedades parcialmente auto-incompatíveis, 496, 1001 e 791 são provenientes da Guatemala, Costa Rica e México (Tabela 1) que são locais distantes do local de origem da espécie, isto é, a Bolívia Central, e efetivamente podem existir na Mesoamérica, condições um pouco diferentes às condições andinas da Bolívia com as conseqüentes mudanças no estado de incompatibilidade dessas populações de *Capsicum pubescens*.

O conceito de pseudocompatibilidade (chamado também de pseudo auto-incompatibilidade) tal como é mencionado na literatura sugere fundamentalmente dois enfoques: a) aparecimento de indivíduos autocompatíveis em populações auto-incompatíveis (GAUDE & DUMAS, 1987) e b) ação de fatores ambien

tais sobre genes modificadores que aumentaria a velocidade de crescimento de tubos polínicos incompatíveis permitindo assim a obtenção de semente autofecundada, tal como observado em *Petunia* (LINSKENS, 1975). Desse modo, a intensidade da variação ambiental determinaria diferentes graus de expressão do gene de incompatibilidade que resultaria numa taxa variável de crescimento dos tubos polínicos auto-incompatíveis e se produziria assim uma quantidade variável de sementes.

A Tabela 3 mostra os resultados do número de sementes por fruto produzido em condições de polinização aberta quando comparado com autopolinização manual. Os resultados indicam que não houve diferença significativa no número de sementes por fruto entre ambas condições. Em outras palavras, isso significa que quando houve quebra da reação de auto-incompatibilidade (nas variedades parcialmente auto-incompatíveis) a mesma quantidade de tubos polínicos atingiu os óvulos quando comparado com a polinização aberta. Isto parece indicar que a reação de pseudo auto-incompatibilidade não se deu por ação do ambiente sobre genes modificadores como o caso de *Petunia* (LINSKENS, 1975) e sim pela presença de indivíduos totalmente autocompatíveis na população auto-incompatível, segundo o conceito de GAUDE & DUMAS (1987) que por sua vez concordam com a hipótese de YAQUB (1967) quanto ao processo evolutivo da compatibilidade em *Capsicum*, onde é admitida o aparecimento de mutantes autocompatíveis como um passo intermediário até total autocompatibilidade. Estes mutantes

Tabela 3. Número de sementes por fruto em condições de polinização aberta e autopolinização nas variedades de *C. pubescens*. Piracicaba-SP, 1988.

Variedade	Número de sementes por fruto		χ^2
	Polinização aberta	Autopolinização	
82P1	25,0	23,0	0,16ns
351	40,0	37,4	0,17ns
393	11,6	-	-
496	28,8	34,0	0,94ns
501	23,3	20,0	0,47ns
513	15,0	18,0	0,60ns
1001	16,5	23,5	2,97ns
1002	15,7	-	-
1003	20,7	18,0	0,35ns
876	28,8	-	-
791	20,5	27,3	2,25ns
557	15,6	-	-

correspondem à população "SA-265" no experimento de YAQUB e corresponderam aos indivíduos autocompatíveis dentro das variedades parcialmente auto-incompatíveis os quais são precursores potenciais de uma população autocompatível, dependendo dos ambientes em que se desenvolvem e as pressões de seleção as quais são submetidas

Na mesma Tabela 3 se observa variação no número de sementes por fruto entre as variedades. Isto pode se considerar uma característica própria de cada genótipo e está relacionado com o peso do fruto (Apêndice 1). Foi encontrado uma correlação positiva entre número de sementes e peso do fruto ($r = 0,66$).

No caso das variedades classificadas como auto-incompatíveis, com baixa ou nenhuma capacidade para autofrutar, elas podem ter sido domesticadas em ambientes em que não houve circunstâncias adversas à polinização natural e assim não foram selecionados aqueles genes mutantes que determinam pseudo auto-incompatibilidade na população. Assim, nesse grupo estão aquelas populações mais primitivas quanto à evolução desde auto-incompatibilidade até autocompatibilidade. Contudo, algumas dessas variedades apresentaram frutificação desde 1,37 a 3,33% (var. 82P1, 501, 513 e 1003) e merecem ser consideradas. Nessas variedades pode ter acontecido dois eventos hipotéticos, o primeiro seria que eles realmente são parcialmente auto-incompatíveis e que por causa do tamanho da amostra (número de plantas por tratamento) ou por representa-

tividade da mesma o caráter não se manifestou. A segunda hipótese consiste em que, embora a ação do locus *S* tenha-se manifestado, pode ter existido alguma oportunidade para que o pólen fosse capaz de autofertilizar. Isto pode ter acontecido devido a maior viabilidade do pólen, além de um maior período de receptividade do estigma até um ponto em que o estilete permitiu o crescimento dos tubos polínicos incompatíveis em função de uma menor concentração dos produtos do gene *S* no tecido transmissor, pois teoricamente esta concentração é maior no dia da antese e menor antes e depois deste estágio (SASSEN, 1974). Este fenômeno pode ter sido favorecido pelas baixas temperaturas durante o período ($17,25^{\circ}\text{C}$) que resultaram num período receptivo do estigma mais prolongado, como foi observado.

COCHRAN (1966) observou que em *C. annuum* o período de receptividade do estigma foi de até 3 dias após a antese com temperatura de $16,6^{\circ}\text{C}$, sendo que com $22,8^{\circ}\text{C}$ o período foi menor. Desse modo, os tubos polínicos incompatíveis tiveram oportunidade de completar a fertilização antes de ocorrer abscisão floral, processo este que possivelmente também foi retardado com as baixas temperaturas.

Contrariando a nossa hipótese, WEBB & WILLIAMS

(1988a,b) encontraram em *L. peruvianum* uma quebra de auto-incompatibilidade causada pelo aumento da temperatura de 15 para 25°C, que resultou num crescimento mais rápido dos tubos polínicos incompatíveis. Porém, os autores não mencionaram o efeito das diferentes temperaturas sobre a receptividade do estigma ou outros fatores. Desse modo, em *C. pubescens* o efeito da baixa temperatura não foi direto sobre a velocidade de crescimento dos tubos polínicos e sim indireto sobre outros fatores, como período de receptividade estigmática, período de antese, viabilidade do pólen e abscisão floral.

4.2. Crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar

A observação do crescimento dos tubos polínicos no tecido estilar através do microscópio de fluorescência, permitiu discriminar as variedades da seguinte forma: num primeiro grupo destacaram-se as variedades 82P1, 1002 e 1003, em que a inibição do tubo polínico ocorreu no terço superior do estilete. Estas variedades foram também classificadas como auto-incompatíveis segundo o índice de auto-incompatibilidade, e o seu comportamento correspondeu à típica reação de auto-incompatibilidade encontrada em outros trabalhos com *C. pubescens* e *C. cardenasii* (YAQUB, 1967), *L. peruvianum* (WEBB & WILLIAMS, 1988a) e *N. alata* (CLARKE et alii, 1985; GAUDE & DUMAS, 1987), e teoricamente foi o resultado da ação dos produtos do gene S no estilete que causaram a inibição do crescimento dos tubos polínicos.

Um segundo grupo de variedades, 501, 513 e 1001, apresentaram uma inibição do crescimento dos tubos polínicos em diferentes níveis do estilete e possivelmente a nível do ovário, o que não foi comprovado devido a que as observações microscópicas não incluíram o ovário. Nos três casos, a quantidade de tubos polínicos que atingiram a base do estilete não foi maior que 10% do total. As variedades 501 e 513 foram auto-incompatíveis e a variedade 1001 foi parcialmente auto-incompatível, segundo o índice de auto-incompatibilidade. Na Tabela 3 se observa que, quando a variedade 1001 frutificou após autopolinização o número de sementes, isto é, o número de óvulos fertilizados, foi normal. Assim, pode-se concluir que os poucos tubos polínicos que atingiram a base do estilete foram inibidos no ovário, ou se chegaram a fertilizar não foi em número suficiente para estimular o desenvolvimento do fruto. A ausência da manifestação da parcial auto-incompatibilidade na variedade 1001 nesta fase do experimento, ou seja, estiletes com reação de autocompatibilidade, possivelmente foi devido a efeito de amostragem.

Um outro grupo de variedades, 393, 557 e 876, também consideradas auto-incompatíveis, mostraram um comportamento inverso ao grupo anterior, isto é, aproximadamente 10% dos tubos polínicos foram inibidos no seu percurso através do estilete e o resto dos tubos atingiu a base do estilete, o que sugere inibição a nível do ovário.

Os casos de expressão da reação de incompatibilidade no ovário não são muito freqüentes na literatura. STOUT & CHANDLER (1933) encontraram que em *Hemerocallis citrina* a inibição dos tubos polínicos ocorreu na entrada ou dentro do ovário. Em *Lilium pardalinum* o crescimento dos tubos polínicos foi normal até a base do estilete, porém não ocorreu fertilização (BROCK, 1954). Em *Theobroma cacao*, determinou-se que a reação de incompatibilidade ocorreu entre células gaméticas o que resultou na inibição da fusão a nível do saco embrionário (COPE, 1962).

De um modo geral, as famílias que apresentam sistemas de auto-incompatibilidade se caracterizam por ter fatores em comum, principalmente quanto a natureza da reação (gametofítica ou esporofítica) e o sítio de expressão gênica. Nas solanáceas o sistema gametofítico e a inibição a nível do estilete são fatores que identificam os sistemas de incompatibilidade, e não tem sido reportado antagonismo a nível de gametas como o caso de *T. cacao*. Por outro lado, as espécies de estigma úmido, apresentam uma substância mucilagínosa nos espaços intercelulares do estilete, de modo que os tubos polínicos crescem num meio fluido desde a germinação do pólen na superfície estigmática até o ponto de entrada nos óvulos (WEBB & WILLIAMS, 1988a). Este mucilago possivelmente é produto de secreção de células adjacentes especializadas com alta atividade metabólica, indicada pela sua alta concentração protéica (SASSEN, 1974). Esta constituição do tecido trans-

missor no estilete já foi reportada em *L. peruvianum* (WEBB & WILLIAMS, 1988b) e *N. alata* (CORNISH et alii, 1987). Em *C. annuum*, o tecido estilar consiste de células parenquimatosas com grandes espaços intercelulares cheios de uma substância através da qual os tubos polínicos crescem. Estas células, como em *L. peruvianum* e *N. alata*, são ricas em amiloplastídios e proteínas, indicando que são de valor nutritivo para o crescimento dos tubos polínicos (HU & XU, 1985).

Em *L. peruvianum* observou-se que quando os tubos polínicos incompatíveis passaram através da base do estilete, foram reprimidos na continuação do tecido transmissor na placenta (WEBB & WILLIAMS, 1988a). Tudo parece indicar que o produto do gene *S* está associado com o meio fluido no tecido transmissor, porém sua concentração pode ser maior ou menor nos diferentes níveis do estilete ou ovário. Além disso, o tubo polínico cresce no estilete a expensas das reservas contidas no grão de pólen, e quando elas se esgotam as células do estilete fornecem as substâncias necessárias para o contínuo crescimento (Mulcahy & Mulcahy¹⁰, citados por GAUDE & DUMAS, 1987). Sendo assim, os diferentes sítios de inibição dos tubos polínicos encontrados nas variedades de *C. pubescens*, incluindo a inibição além da base do estilete, fenômeno nunca antes reportado em *Capsicum*, pode ser explicado com base em

¹⁰ MULCAHY, G.B. & MULCAHY, D.L. In: *Pollen: biology and implications for plant breeding*. Mulcahy, D.L. & Otaviano, E., eds. New York, Elsevier, 1983. p.29-35.

diferenças no tamanho dos grãos de pólen, e assim, diferente capacidade para crescer a expensas de suas reservas até um ponto em que, na utilização de substâncias de origem estilar, aconteceu a reação de incompatibilidade pela ação dos produtos do gene S. A outra explicação possível é a concentração diferencial dos produtos do gene S a diferentes níveis do tecido transmissor, sendo que não pode descartar-se a combinação de ambos fenômenos na determinação da reação de incompatibilidade. Devido a que as observações microscópicas não incluíram o tecido ovárico, no presente trabalho não foi possível determinar o sítio exato da inibição dos tubos polínicos que passaram através da base do estilete, e a única evidência de que não ocorreu fertilização é a ausência de frutificação observada nessas variedades.

4.3. Autopolinização na fase de botão floral

Os resultados da autopolinização na fase de bo tão floral encontram-se na Tabela 4. Quando o pólen foi colo cado sobre o estigma sem coadjuvantes, somente as variedades 82Pl, 496, 876 e 557 frutificaram em 25, 5, 10 e 10%, respectivamente, na fase de botão 1 (um dia antes da antese). Na fase 2 (dois dias pré-antese), somente a variedade 557 deu 15% de frutificação, e na autopolinização três dias antes da ante se, nenhuma das variedades produziu frutos. De acordo com es ses resultados, a fase de botão floral não pode ser considera

Tabela 4. Porcentagem de pegamento da autopolinização na fase de botão floral, com e sem coadjuvantes, nas variedades de *C. pubescens*. Piracicaba, SP, 1988.

Variedade	Fase do botão floral ^{1/}					
	sem coadjuvantes			com coadjuvantes ^{2/}		
	1	2	3	1	2	3
82P1	25	0	0	15	0	0
351	0	0	0	0	0	0
393	0	0	0	15	0	0
496	5	0	0	0	0	0
501	0	0	0	0	0	0
513	0	0	0	0	0	0
1001	0	0	0	0	0	0
1002	0	0	0	0	0	0
1003	0	0	0	0	0	0
876	10	0	0	0	0	0
791	0	0	0	0	0	0
557	10	15	0	0	0	0

1/ 1: um dia pré-antese
 2: dois dias pré-antese
 3: três dias pré-antese

2/ H₃BO₃ a 100 ppm (Ca [NO₃]₂) a 300 ppm + óleo mineral, aplicado sobre o estigma.

da como um estado ideal para efetuar autopolinização e obter semente autofecundada nas variedades auto-incompatíveis de *C. pubescens*.

Observações dos estigmas em todas as variedades indicaram a presença do fluido estigmático na antese, sendo que na fase de botão floral todas as variedades tinham estigma seco, a exceção da variedade 557. Por outro lado, na etapa de intercruzamento, observou-se que as polinizações sobre estigmas secos não tiveram sucesso, possivelmente pela ausência de um meio adequado para hidratação e germinação do pólen, e o mesmo fenômeno deve ter acontecido ao polinizar nos botões florais com estigma seco. Isto é confirmado pelo relativo sucesso obtido com a variedade 557.

Quando foram usadas as substâncias coadjuvantes, com o objetivo de fornecer o meio adequado para o pólen germinar, os resultados não foram satisfatórios, e somente as variedades 82Pl e 393 frutificaram em 15%. Isto indica que, embora o pólen germinasse (tal como foi observado em testes "in vitro"), o tubo polínico não conseguiu crescer no estilete. O insucesso de ambas as técnicas ainda na variedade autocompatível sugere que os resultados obtidos foram independentes da interação pólen-pistilo quanto à reação de incompatibilidade, e sim dependentes da sua interação com relação à maturidade, ou seja, na fase de botão floral o estilete não forneceu um meio adequado para o crescimento do tubo polínico. Assim, novamente há evidências de que a maturidade no estilete está relacionada com a presença do fluido nos es

paços intercelulares tanto nas variedades autocompatíveis quanto nas auto-incompatíveis, porém nestas últimas, além do fluído também existem os produtos do gene **S**.

Embora o anterior, houve dois casos que devem ser comentados. A variedade 82Pl mostrou uma tendência a aceitar o seu próprio pólen um dia antes da antese, o que pode ser interpretado como uma tendência à maturidade precoce das células parenquimatosas do estilete, além de uma menor exigência do grão de pólen à umidade do estigma, visto que no botão floral não houve presença do fluido estigmático. A variedade 557 mostrou tendência a aceitar o seu próprio pólen nas fases de botão 1 e 2. Esta variedade caracterizou-se por apresentar mucilago estigmático ainda nessas fases do botão floral, e possivelmente este fluido também esteve presente no resto do tecido transmissor do estilete, porém sem a concentração necessária dos produtos do gene **S** para inibir o crescimento dos tubos polínicos. Este comportamento nesta variedade não se repetiu ao utilizar coadjuvantes e isto pode ter sido consequência da interação do fluido estigmático natural e as mesmas substâncias coadjuvantes adicionadas que exerceram um efeito conjunto tóxico para o pólen, em termos de concentração de cálcio e boro.

Os nossos resultados concordam com YAQUB(1967) quanto a ausência de resposta à autopolinização no botão floral em variedades auto-incompatíveis. Porém, este autor conseguiu de 50 a 60% de frutificação nas variedades autocompa-

tíveis quando polinizadas no botão floral. Assim mesmo, a técnica tem dado resultados em outras espécies como *Brassica* (NETTANCOURT, 1977), *Oenothera* (LEWIS, 1951), *Petunia* (SHIVANNA & RANGASWAMY, 1969; LINSKENS, 1975). Estas diferenças do presente trabalho com estes autores só pode ser atribuída a efeito do genótipo, sendo que entre diferentes espécies, e mesmo entre variedades da mesma espécie, a expressão da reação de auto-incompatibilidade apresenta variação, e não deve ser descartado o efeito do ambiente nessa variação.

5. CONCLUSÕES

Com base nas observações e resultados obtidos no presente trabalho estabeleceram-se as seguintes conclusões:

- As variedades de *C. pubescens* mostraram variação com relação à reação de auto-incompatibilidade, sendo que houve variedades autocompatíveis, parcialmente auto-incompatíveis e auto-incompatíveis.

- Tanto nas variedades auto-incompatíveis como nas variedades parcialmente auto-incompatíveis existe uma frequência variável de indivíduos totalmente autocompatíveis, provavelmente como consequência de mutações no locus *S*.

- A inibição do crescimento dos tubos polínicos ocorreu a diferentes níveis do estilete e possivelmente também no tecido do ovário.

- A auto-incompatibilidade foi difícil de ser superada por polinização no botão floral, sendo portanto, uma prática não recomendável para se obter progênie autofecundada em populações auto-incompatíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R.W. Population structure and performance in crop plants. Ciência e Cultura, São Paulo, 19: 145-60, 1966.
- ALLARD, R.W.; JAIN, S.K.; WORKMAN, P.L. The genetics of inbreeding populations. Advances in Genetics, San Diego, 14: 55-131, 1968.
- ANDREWS, J. Peppers; the domesticated *Capsicum* Austin, University of Texas Press, 1984. 170p.
- ASCHER, P.D. The influence of RNA synthesis inhibitors on "in vivo" pollen tube growth and the self-incompatibility reaction in *Lilium longiflorum* Thunb. Theoretical and Applied Genetics, New York, 41: 75-8, 1971.
- ATTIA, M.S. The nature of incompatibility in cabbage. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 56: 369-71, 1950.
- BIRD, J.B. America's oldest farmers. Natural History, New York, 57: 296-303, 1948.
- BREWBAKER, J.L. Pollen cytology and incompatibility systems in plants. Journal of Heredity, New York, 48: 217 - 77, 1957.

- BREWBAKER, J.L. Biology of the angiosperm pollen grain. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, New Delhi, 19: 121-33, 1959.
- BROCK, R.D. Fertility in *Lilium* hybrids. Heredity, Harlow, 8: 404-20, 1954.
- CAMARGO, L.S. As hortaliças e seu cultivo. 2.ed. Campinas, Fundação Cargill, 1984. 448p.
- CASALI, V.W.D. & COUTO, F.A. Origem e botânica de *Capsicum*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 10(113): 12-4, 1984.
- CLARKE, A.E.; ANDERSON, M.A.; BACIC, T.; HARRIS, P.J.; MAU, S.L. Cell-cell recognition in plants with special reference to the pollen-stigma interactions. Journal of Cell Science Supplement, Colchester, 2: 261-85, 1985.
- COCHRAN, H.L. Stigma structure and period of receptivity in pimientos (*Capsicum frutescens* L.). Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 88: 454-7, 1966.
- COPE, F.W. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. Heredity, Harlow, 17: 157-82, 1962.
- CORNISH, E.C.; PETTITT, J.M.; BONIG, I.; CLARKE, A.E. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. Nature, London, 326: 99-102, 1987.

- CROWE, L.K. The evolution of outbreeding in plants. I. The angiosperms. Heredity, Harlow, 19: 435-57, 1964.
- CROWE, L.K. The polygenic control of outbreeding in *Borago officinalis*. Heredity, Harlow, 27: 111-8, 1971.
- CRUZAN, M.B. Pollen tube distributions in *Nicotiana glauca*: evidence for density dependent growth. American Journal of Botany, Columbus, 73(6): 902-7, 1986.
- DEMPSEY, A.H. Improved technique for controlled pollinations of pepper. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 77: 449-51, 1961.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes. 6.ed. São Paulo, Edgard Blücher, 1976. 293p.
- ESHBAUGH, W.H. A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). Brittonia, Bronx, 22: 31-43, 1970.
- ESHBAUGH, W.H. Chili peppers in Bolivia. Plant Genetic Resources Newsletter, Rome, 43: 17-9, 1980a.
- ESHBAUGH, W.H. The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). Phytologia, Corvallis, 47(3): 153-66, 1980b.
- FAEGRI, K. & PIJL, L. van der. The principles of pollination ecology. 3.ed. Oxford, Pergamon, 1980. 244p.
- FREE, J.B. Pollination of *Capsicum frutescens* L., *Capsicum annum* L. and *Solanum melongena* L. (Solanaceae) in Jamaica. Tropical Agriculture, Trinidad, 52(4): 353-7, 1975.

- GAUDE, T. & DUMAS, C. Molecular and celular events of self-incompatibility. International Review of Cytology, San Diego, 107: 333-67, 1987.
- GRADZIEL, T. & ROBINSON, R.W. Overcoming pollination barriers in the Solanaceae. Horstscience, Alexandria, 21(3): 801, 1986.
- GRANT, V. Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. Evolution, Boulder, 3: 82-97, 1949.
- HEISER, C.B. & SMITH, P.G. Observations on another species of cultivated pepper, *Capsicum pubescens* R. & P. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 52: 331-5, 1948.
- HEISER, C.B. & SMITH, P.G. The cultivated *Capsicum* peppers. Economic Botany, Bronx, 7(3): 214-27, 1953.
- HESLOP-HARRISON, J. Incompatibility and the pollen stigma interaction. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 26: 403-25, 1975.
- HESLOP-HARRISON, J.; KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, Y. Pollen-wall proteins; exine-held fractions associated with the incompatibility response in Cruciferae. Theoretical and Applied Genetics, New York, 44: 133-7, 1974.
- HESLOP-HARRISON, Y. Stigma characteristics and angiosperm taxonomy. Nordic Journal of Botany, Copenhagen, 1(3): 401-20, 1981.
- HESLOP-HARRISON, Y. & SHIVANNA, A.R. The receptive surface of the angiosperm stigma. Annals of Botany, London, 41: 1233-58, 1977.

HOGENBOOM, N.G. Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 2. Breakdown of self-incompatibility in *L. peruvianum* (L.) Mill. Euphytica, Dordrecht, 21: 288-43, 1972.

HU, S.Y. & XU, L.Y. Trnasmitting tissue and pollen tube growth in sweet pepper. Acta Botanica Sinica, Beijing, 27 (5): 449-54, 1985. Apud. Horticultural Abstracts, Wallingford, 56(3): 182, 1986. (Resumo).

INSTITUTE OF HORTICULTURAL PLANT BREEDING. Annual Report, 1976. Wageningen, Netherlands, 1977. 54p. Apud. Plant Breeding Abstracts, Wallingford, 48(2): 152, 1978. (Resumo).

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

KENRICK, J. & KNOX, R.B. Self-incompatibility in the nitrogen-fixing tree, *Acacia retinoides*: quantitative cytology of pollen tube growth. Theoretical and Applied Genetics, New York, 69: 481-8, 1985.

KISS, A. & PAAL, H. In vivo investigations on pollen-tube growth with paprika (*Capsicum annuum*). Agrobotanika, Budapest. 16: 89-95, 1975.

KNOX, R.B.; CLARKE, A.E.; HARRISON, S.; SMITH, P.; MARCHALONIS, J.J. Cell recognition in plants: determinants of the stigma surface and their pollen interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, 73: 2788-92, 1976.

LEFFEL, R.C. Pseudo-self-compatibility and segregation of gametophytic self-incompatibility alleles in red clover, *Trifolium pratense* L.. Crop Science, Madison, 3: 377-80, 1963.

- LEWIS, D. Structure of the incompatibility gene. III. Types of spontaneous and induced mutation. *Heredity*, Harlow, 5: 399-414, 1951.
- LINSKENS, H.F. Incompatibility in *Petunia*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. London, 188: 299-311, 1975.
- LUNDQVIST, A. The nature of the two-loci incompatibility to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas*, Lund, 52: 221-34, 1964.
- MC LEOD, M.J.; GUTTMAN, S.I.; ESHBAUGH, W.H. Early evolution of chilli peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, Bronx 36 (4): 361-8, 1982.
- MC NEISH, R.S. Ancient Mesoamerican civilization. *Science*, Washington, 143(3026): 531-7, 1964.
- MARTIN, F.W. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, Geneva, 34: 125-8, 1959.
- MATHER, K. The genetical structure of populations. *Evolution*, Boulder, 7: 66-95, 1953.
- MULCAHY, D.L. & MULCAHY, G.B. Gametophytic self-incompatibility reexamined. *Science*, Washington, 220(4603): 1247-51, 1983.
- MULCAHY, D.L. & MULCAHY, G.B. Tests of the heterosis model. *Sexual Plant Reproduction*, 1(1): 32-5, 1988. Apud. *Plant Breeding Abstracts*, Wallingford, 58(9): 785, 1988. (Resumo).

NAKANISHI, T.; ESAHI, Y.; HINATA, K. Control of self-incompatibility by CO₂ gas in *Brassica*. Plant and Cell Physiology Kyoto, 10: 925-7, 1969.

NAKANISHI, T. & HINATA, K. An effective time for CO₂ gas treatment in overcoming self-incompatibility in *Brassica*. Plant and Cell Physiology, Kyoto, 14: 873-9, 1973.

NAKANISHI, T. & HINATA, K. Self seed production by CO₂ gas treatment in self-incompatible cabbage. Euphytica, Dordrecht, 24: 117-20, 1975.

NATIONAL VEGETABLE RESEARCH STATION. Annual Report, 1978. Wellesbourne, 1979. 164p. Apud. Horticultural Abstracts, 50(4): 214, 1980. (Resumo).

NETTANCOURT, D. de. Incompatibility in angiosperms. Berlin, Springer-Verlag, 1977. 230p.

NETTANCOURT, D. de; ECOCHARD, R.; PERQUIN, M.D.G.; DRIFT, T. van der; WESTERHOF, M. The generation of new S-alleles at the incompatibility locus of *L. peruvianum* Mill. Theoretical and Applied Genetics, New York, 41:120-9, 1971.

PANDEY, K.K. Colchicine-induced changes in the self-incompatibility behaviour of *Nicotiana*. Genetica, Dordrecht, 39: 257-71, 1968.

PANDEY, K.K. Time and site of the S-gene action, breeding systems and relationships in incompatibility. Euphytica, Dordrecht, 19: 364-72, 1970.

- PANDEY, K.K. Origin of genetic variation: regulation of genetic recombination in the higher organisms - a theory. Theoretical and Applied Genetics, New York, 42: 250 - 60, 1972.
- PANDEY, K.K. Theory and practice of induced androgenesis. New Physiologist, Cambridge, 72: 1129-40, 1973.
- PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). Evolution, Boulder, 25: 683-91, 1971.
- RICHARDS, R.A. & TURLING, N. The genetics of self-incompatibility in *Brassica campestris* L. ssp. *oleifera* metzg. Genotypic and environmental modification of S-locus control. Genetica, Dordrecht, 44: 439-53, 1973.
- RICK, C.M. *Capsicum pubescens*, a little known pungent pepper from Latin America. Missouri Botanical Garden Bulletin, St. Louis, 38: 36-42, 1950.
- ROBACKER, C.D. & ASCHER, P.D. Discriminating styles and pollen-mediated pseudo-self-compatibility in *Nemesia strumosa* Benth. Theoretical and Applied Genetics, New York, 61: 289 - 96, 1982.
- ROWLANDS, D.G. Self-incompatibility in sexual propagated cultivated plants. Euphytica, Dordrecht, 13: 157-62, 1964.
- SARFATTI, G.; CIAMPOLINI, F.; PACINI, E.; CRESTI, M. Effects of actinomycin of *Lycopersicon peruvianum* pollen tube growth and self-incompatibility reaction. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FERTILIZATION IN HIGHER PLANTS, Nijmegen, 1974. Fertilization in higher plants; proceedings, ed. H.F. Linskens. Amsterdam, North-Holland, 1974. p.293-300.

- SASSEN, M.M.A. The stylar transmitting tissue. Acta Botanica Neerlandica, Aarlanderven, 23(2): 99-108, 1974.
- SHIVANNA, K.R. & RANGASWAMY, N.S. Overcoming self-incompatibility in *Petunia axillaris*. I. Delayed pollination, pollination with stored pollen, and bud pollination. Phytomorphology, Delhi, 19: 372-80, 1969.
- SHOPOVA, M. Studies in the genus *Capsicum*. II. Irregularities in the pollen mother cells. Chromosoma, Berlin, 19: 349-56, 1966.
- SMITH, P.G. & HEISER, C.B. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 84: 413-20, 1957a.
- SMITH, P.G. & HEISER, C.B. Breeding behaviour of cultivated peppers. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, Geneva, 70: 286-90, 1957b.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. Pollen; biology, biochemistry, management. New York, Springer-Verlag, 1974. 307p.
- STEBBINS, G.L. Self-fertilization and population variability in the higher plants. American Naturalist, Chicago, 91: 337-54, 1957.
- STOUT, A.B. & CHANDLER, C. Pollen tube behaviour in *Hemerocallis* with special reference to incompatibilities. Bulletin of the Torrey Botanical Club, New York, 60: 397-416, 1933.
- TAYLOR, J.P. Carbon dioxide treatment as an effective aid to the production of self seed in kale and brussel sprouts. Euphytica, Dordrecht, 31: 957-64, 1982.

VISSER, D.L. The effect of alternating temperatures on the self-incompatibility of some clones of brussel sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). Euphytica, Dordrecht, 26(2): 273-7, 1977.

WEBB, M.C. & WILLIAMS, E.G. Effects of temperature, light, nutrients and carbon dioxide on the strength of the self-incompatibility response in detached flowers of *Lycopersicon peruvianum*. Annals of Botany, London, 61: 395-404, 1988a.

WEBB, M.C. & WILLIAMS, E.G. The pollen tube pathway in the pistil of *Lycopersicon peruvianum*. Annals of Botany, London, 61: 415-23, 1988b.

WILLIAMS, E.G. & KNOX, R.B. Quantitative analysis of pollen tube growth in *Lycopersicon peruvianum*. Journal of Palynology, New Delhi, 18: 65-74, 1982.

YAQUB, C.M. The genetic basis of self-incompatibility in *Capsicum pubescens* R. & P. and *C. cardenasii* Heiser & Smith. Davis, 1967. 85p. (Ph. D. - University of California).

YAQUB, C.M. & SMITH, P.G. Nature and inheritance of self-incompatibility in *Capsicum pubescens* and *C. cardenasii*. Hilgardia, Berkeley, 40(12): 459-70, 1971.

ZAPATA, T.R. & ARROYO, M.T.K. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. Biotropica, St. Louis, 10: 221-30, 1978.

A P Ê N D I C E

Apêndice 1. Caracterização dos genótipos, segundo descritores varietais para *Capsicum*
(IBPGR, 1983).

DESCRITORES									
Variedade	Hábito de crescimento	Pubescência do caule	Cor do caule	Pubescência da folha	Nº de pedicelos por axila	Posição do pedicelo na antese	Cor da corola	Formato da margem do cálice	
82Pl	5	7	1	6	1 - 2	7	5	7	
351	5	7	1	6	1 - 2	6	5	7	
393	3	7	1	6	1 - 2	4	5	7	
496	5	1	1	6	1 - 2	7	5	7	
501	5	7	1	6	1 - 2	7	5	7	
513	4	7	1	6	1 - 3	5	5	6	
1001	6	7	1	6	2 - 1	5	5	7	
1003	6	7	1	6	1 - 2	4	5	7	
1002	6	7	1	6	1 - 2	4	5	7	
557	3	7	1	6	1 - 3	6	5	7	
876	5	7	1	5	1 - 2	7	5	6	
791	5	7	1	6	1 - 2	7	5	7	

Continua ...

Apêndice 1. Continuação.

Variedade	DESCRITORES							
	Posição do fruto	Cor do fruto no estado imaturo	Cor do fruto no estado maduro	Comprimento do fruto	Formato do fruto	Forma do fruto na união com pedicelo	Pescoço na base do fruto	Formato do fruto no extremo pistilar
82P1	3	1	3 - 4	3	6	5	0	5
351	3	1	3 - 4	3	2	7	0	5
393	3	1	3	3	4	7	0	5
496	3	1	3	3	3	4	0	-
501	3	1	3	3	4	5	0	4
513	3	1	4	3	4	5	0 +	3
1001	3	1	4	3	4	5	0	5
1003	3	1	3 - 4	3	6	5	0	6
1002	3	1	4	3	-	5	0	-
557	3	1	3 - 4	3	5	5	+	6
876	3	1	3	3	4	5	0	5
791	3	1	3	3	2	5	0	5

Continua...

Apêndice 1. Continuação.

Variedade	DESCRITORES						Peso médio do fruto
	Corrugação do fruto no corte transversal	Persistência do fruto	Cor do nó	Nº de dias ao florescimento	Mancha na corola	Macho-esterilidade	
82P1	3	+	1	107	1	0	25
351	3	+	1	121	1	0	40
393	4	+	1	125	1	0	11,6
496	-	+	2	122	1	0	28,8
501	4	+	1	115	1	0	23,3
513	3	+	1	104	1	0	15
1001	1	+	1	104	1	0	16,5
1003	3	+	1	112	1	0	20,7
1002	3	+	1	105	1	0	15,7
557	4	+	1	108	1	0	15,6
876	3	+	1	111	1	0	28,8
791	3	+	1	115	1	0	20,5