

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM GERMOPLASMA DE *Piper* spp COM ÊNFASE PARA PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.): ESTUDO PRELIMINAR POR MARCADORES ISOENZIMÁTICOS¹

José Maria Demetrio GAIA²

Milton Guilherme da Costa MOTA³

Maria Rosa COSTA⁴

Carlos da Silva MARTINS⁵

Marli Costa POLTRONIERI⁴

RESUMO: Foi estudada a similaridade genética de setenta e oito clones de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), incluindo algumas espécies do gênero *Piper*, para estabelecer semelhanças e diferenças entre os clones. Foram utilizados oito sistemas enzimáticos para gerar dados a partir de variáveis de duplo estado (ausência ou presença de bandas enzimáticas) e os dados foram analisados através do programa de computador chamado Fitopac. A análise da similaridade pelo fenograma gerado mostrou que a maioria dos clones foi encontrada no intervalo de 90% a 100% de similaridade, sendo observado somente três clones no intervalo de 70% a 80% de similaridade. O estreito intervalo de variação observado dentro de grupos (72% a 100%) demonstra que os clones analisados de *P. nigrum* L. são bastante similares, confirmando o que já era esperado em função da reduzida base genética da espécie e da homogeneidade dos clones cultivados.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Pimenta (*Piper* spp), Clones, Similaridade Genética, Marcadores Moleculares, Melhoramento Genético.

ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY IN GERMPLASM OF *Piper* spp: A PRELIMINARY STUDY FOR ISOZYME MARKERS

ABSTRACT: Genetic diversity of seventy eight clones of black pepper (*Piper nigrum* L.), including some species of the genus *Piper*, was studied in order to get new knowledge for the genetic improvement of the crop. Eight isozymic systems were utilized to get variables of double state (absence or presence of isozymic bands). Analysis of the similarity through phenogram showed that most of the clones displayed a similarity range from 90 % to 100 %.. Only three clones had a

¹ Aprovado para publicação em 25.11.2003

² Engenheiro Agrônomo, aluno do curso de mestrado em Biologia Vegetal Tropical da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA. E-mail: josegaia@interconnect.com.br.

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Departamento de Biologia Vegetal e Fitossanidade da UFRA.

⁴ Engenheira Agrônoma, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental.

⁵ Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

similarity range from 70 % to 80 %. The narrow similarity range observed in the groups (72% to 100%) demonstrated that the clones of *P. nigrum* L. were quite similar, as a result of the reduced genetic base of the species and of the homogeneity of the cultivated clones.

INDEX TERMS: Pepper (*Piper* spp), Clones, Genetic Similarity, Molecular Marker, Genetic Improvement.

1 INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino é um arbusto trepador, perene, da família das Piperáceas, sendo uma das espécies cultivadas mais antigas do mundo (MARTIN; GREGORY, 1962; ZEVEN, 1974). Seu centro de origem é, presumivelmente, nas florestas localizadas no Sudoeste da Índia, Western Gaths, Malabar, de onde se espalhou, inicialmente, para o Sudeste da Ásia por meio de estacas, sendo muito posteriormente introduzida na África, ilhas do Pacífico e Américas do Sul e Central (GENTRY, 1955; ZEVEN, 1974).

A reduzida base genética, devido aos poucos clones cultivados e a susceptibilidade à fusariose (*Fusarium solani* forma *sp piperis*), tem causado graves prejuízos aos pipericultores no Brasil. Assim, falta de variabilidade genética e os limitados conhecimentos sobre a genética da espécie constituem-se os principais problemas para a obtenção de genótipos superiores (ZEVEN, 1974; PILLAY, 1995).

Métodos de melhoramento genético, tais como hibridação (WAARD; ZEVEN, 1969), polinização controlada e indução de mutantes por radiação gama (OBTENÇÃO..., 1978), plantio de sementes de polinização aberta seguida de seleção de

matrizes para obtenção de novos cultivares (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1983) e indução de variabilidade genética por cultura de tecidos (MOTA et al., 1991; LEMOS et al., 1996) têm sido utilizados para contornar o problema, porém com resultados pouco satisfatórios.

Martins et al. (1996) detectaram diferenças genéticas (polimorfismo) entre os clones de pimenta-do-reino do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental pela análise de isoenzimas, como, também, um grande número de clones em heterozigose.

As isoenzimas, como outros marcadores moleculares, podem ser utilizadas para a definição de grupos heteróticos e associações genômicas que afetam a heterose, assim como identificar genótipos, o que permite que seja realizada a seleção de indivíduos superiores e cruzamentos dos mesmos, em apenas uma geração (FERREIRA, 1993), originando variabilidade e economizando o tempo empregado no melhoramento, particularmente para espécies perenes.

Este trabalho objetivou o estudo analítico da similaridade genética de pimenta-do-reino, que proporcionará maior conhecimento sobre sua genética e permitirá

otimizar o uso dos genótipos disponíveis para a obtenção de híbridos inter e intra-específicos, no sentido de aumentar a variabilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Foi utilizada a coleção de germoplasma da EMBRAPA Amazônia Oriental (CPATU) existente no campo experimental de Belém, mantida sob cultivo com uso de tutores, sob condições de sombreamento, a partir do qual foram tomados 78 clones (Quadro 1), utilizando um indivíduo (ramete) por clone. Amostras unitárias foram adotadas levando em conta que as plantas cultivadas de pimenta-do-reino são: 1) autógamias (MARTIN; GREGORY, 1962; WAARD; ZEVEN, 1969); 2) os clones cultivados apresentarem homogeneidade genética, bem como a espécie apresentar uma reduzida base genética (ZEVEN, 1974; PILLAY, 1994) e; 3) serem propagadas vegetativamente por estacas. Muitos destes clones são procedentes da Estação Experimental Federal de Mayaguez, Porto Rico, e muito provavelmente provenientes da última introdução da espécie nas Américas, ocorrida na ilha de Guadalupe, em 1942 (RODRIGUES, 1967). De acordo com Albuquerque⁶, a grande maioria dos clones é originária da Índia ou derivada dos clones indianos, com somente alguns clones

originários de outros países do Oriente (comunicação pessoal).

2.2 MÉTODOS

A metodologia e os procedimentos utilizados para coleta de tecido vegetal, extração de proteínas, formulação dos tampões e do sistema de géis (separador e concentrador), eletroforese, tempo de corrida, condições de migração e revelação das enzimas foram baseados por Tsumura et al. (1990), com as seguintes adaptações para pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.): 1) utilizaram-se 50 mg de tecido foliar jovem por ocasião da maceração sob nitrogênio líquido e, simultaneamente, cerca de 75 mg de PVPP adicionado a 1 mL do tampão de extração; 2) a eletroforese foi realizada sob condições de 16 mA durante cerca de cinco horas; 3) as soluções corantes de fosfoglucoisomerase (PGI) e fosfatase ácida (ACP) foram modificadas para 50 mL de Tris-HCl, 50 mM, pH 8; 1 mL de D-frutose-6-fosfato (20 mg/mL); 1 mL de NADP (6,6 mg/mL); 2 mL de MTT (5mg/mL); 1 mL de PMS (5mg/mL), 1 mL de cloreto de magnésio (10,17 g/100 mL) e 10 unidades de G6PDH (PGI); 50 mL de "ACP buffer" (1,6 g de acetato de sódio tri-hidratado, 4,83 mL de ácido glacial acético e 500 mL de água destilada); 100 mg de a-naftil fosfato, sal dissódico e 12 mg de "Fast garnet GBC salt" (ACP).

⁶ ALBUQUERQUE, F.C. de. Engenheiro Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 1998.

QUADRO 1 – Relação dos acessos de pimenta-do-reino e outras espécies de do gênero Piper da coleção de germoplasma do CPATU analisados, com seus respectivos nomes e origens. Belém (PA), 1999.

Código ¹	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem
C01	0697	Mutante	C27	<i>Piper colubrinum</i> Link	Brasil	C53	X18	Cruzamento
C02	Cingapura	Malásia	C28	Kottanadan-2	Índia	C54	X32	Cruzamento
C03	Diemberg (Acesso 1)	Índia	C29	Karimunda-3	Índia	C55	45	Mutante
C04	Djambi (Acesso 1)	Indonésia	C30	<i>Piper attenuatum</i> -F	Índia	C56	132	Mutante
C05	Balankotta (Acesso 1)	Índia	C31	Diemberg (Ac. 3, ind-2)	Índia	C57	Cz-5X10	Derivado*
C06	Q.D.S. PL.-F ₆	Derivado*	C32	Iaçará-2	Índia	C58	P3	Derivado*
C07	Perunkoide-S	Índia	C33	Q.B. 5x10-S	Derivado*	C59	Mangueira	Derivado*
C08	Piper Attenuatum-M1	Índia	C34	Papari	Índia	C60	Kovt (kottavally)	Índia
C09	Piper Attenuatum-M2	Índia	C35	Diemberg (Acesso 2)	Índia	C61	239	Derivado*
C10	Piper Attenuatum-M3	Índia	C36	Cz-4X11 (Acesso 1)	Derivado*	C62	U.T. (Uthirankotta)	Índia
C11	Guajarina (karimunda)	Índia	C37	Chumala-S	Índia	C63	1558	Derivado*
C12	Karimunda	Índia	C38	Bragantina (Acesso 1)	Índia	C64	Trang	Tailândia
C13	Chumala	Índia	C39	Iaçará-1	Índia	C65	Diemberg (Acesso 3)	Índia
C14	Belantung	Indonésia	C40	Kuching	Malásia	C66	Uthirankotta (progénie)	Índia
C15	Djambi (Acesso 2)	Indonésia	C41	<i>Piper attenuatum</i> -X	Índia	C67	Uthirankotta (mãe)	Índia
C16	Balankotta (Acesso 2)	Índia	C42	Kudaravalli	Índia	C68	Guajarina (acesso 2)	Índia
C17	Espírito Santo	Índia	C43	Pimenta-da-terra	Índia	C69	Karimunda-S	Índia
C18	Bragantina 6.3.92	Índia	C44	Diemberg (Ac. 2, ind-2)	Índia	C70	Uthirankotta-S (Apra)	Índia
C19	Cingapura 6.3.92	Malásia	C45	F1-PL8	Derivado*	C71	Iaçará-S	Índia
C20	Iaçará-1 (ind-2)	Índia	C46	Bragantina (Acesso 2)	Índia	C72	S-2	Índia
C21	F6-PL1	Derivado*	C47	Cz-4x11 (Acesso 2)	Derivado*	C73	Balankotta Jones	Índia
C22	S-1	Índia	C48	Kaluvalli (Acesso 2)	Índia	C74	Guajarina-INATAM	Índia
C23	G-1	Índia	C49	X1	Cruzamento	C75	Pan-1-CEN (Pannyiur-1)	Índia
C24	<i>Piper betle</i>	Índia	C50	X26	Cruzamento	C76	BAG I6x13	Derivado*
C25	Karimunda-2	Índia	C51	X3	Cruzamento	C77	Kaluvalli (Ac 2, ind-2)	Índia
C26	Kottanadan-1	Índia	C52	B	Derivado*	C78	Kudaravalli (ind-2)	Índia

¹ Notação adotada para as análises nos programas de computador; *: Derivados de programas de melhoramento genético do CPATU.

Além de fosfoglucoisomerase (PGI, 5.3.1.9) e fosfatase ácida (ACP, 3.1.3.2), foram utilizados mais seis sistemas enzimáticos: aconitase (ACO, 4.2.1.3), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, 1.1.1.44), fumarase (FUM, 4.2.1.2), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, 1.1.1.49), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, 2.6.1.1) e xiquimato desidrogenase (SKDH, 1.1.1.25).

Os padrões de bandas revelados no géis (fenótipos) tiveram suas enzimas identificadas e desenhadas em papel milimetrado para preparar os zimogramas, conforme Cheliak e Pitel (1984), a partir dos quais foram obtidas planilhas para elaboração da matriz de entrada das variáveis de duplo estado (presença e ausência de bandas).

Para descrever os padrões de similaridade foi adotado o índice de concordância de Sokal e Michener (1958), conhecido como coeficiente de semelhança simples ou simplesmente “simple matching”, que é amplamente utilizado em estudos de

variabilidade. Este coeficiente atribui o mesmo peso para a ausência de uma banda e à presença da banda correspondente entre dois indivíduos, portanto, a ausência de uma banda possui o mesmo peso que sua presença (PERONI, 1998).

Foi utilizado o programa de computador Fitopac, de autoria de George Shepherd (UNICAMP), para o cálculo do coeficiente de semelhança simples (“simple matching”) e fenograma gerado pelo método hierárquico UPGMA, de agrupamento aos pares (média de grupo), o qual foi avaliado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), que considera os agrupamentos satisfatórios aqueles superiores a 0,8 (PERONI, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as bandas isoenzimáticas e o número de indivíduos em que foram observadas e, na Figura 1, encontra-se o fenograma de agrupamento dos 78 clones analisados. Segundo Curi (1983), não existe concordância absoluta sobre o que constitui

Tabela 1 – Número de bandas por sistema enzimático e número de vezes em que foram observadas nos 78 clones examinados. Belém (PA), 1999.

	Bandas																
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11	B-12	B-13	B-14	B-15	B-16	B-17
GOT	1	54	5	22	35	4	4	25	5	4	49	5	19	2	3	3	1
PGI	34	3	3	3	75	23	62	8	10	48	1	1	1				
ACP	7	21	17	59	20	24	7	7	2	7	5	7					
ACO	2	8	1	13	29	51	3	1	23	5	1	3					
PGD	8	7	71	5	21	64	21	7	19	1	67						
G6PDH	69	3	2	73	66	68											
SKDH	12	38	69	4													
FUM	65	6	5														

um agrupamento e que o importante é que os agrupamentos formados reflitam informações coerentes. Assim sendo, de modo semelhante à divisão de Faraldo (1994), o fenograma foi dividido em 12 grupos.

Nos quatro primeiros grupos à direita do fenograma, ilustrado na Figura 1, se encontram os grupos de clones mais divergentes (G1, G2, G3 e G4), e à esquerda se encontram os grupos de clones mais similares (G6 a G12). O quinto grupo, constituído por um só clone, pode ser tomado como divisor entre os menos e os mais similares.

Os valores de similaridade dentro de grupos variaram de 72% a 100 %, sendo que

a grande maioria dos clones apresentou valores de similaridade entre 90% e 100% e, dentre estes, 16 ficaram com similaridade muito próxima de 100% (aproximadamente 98%). Por outro lado, somente 17 clones apresentaram similaridade entre 70% e 90%, grande parte destes se encontra na faixa de 80% a 90%, e somente três se encontram na faixa de 70% a 80% de similaridade. Estes resultados estão em coerência com o que foi descrito para a espécie por Zeven (1974) e Pillay (1995), segundo os quais a pimenta-do-reino é uma espécie que possui uma base genética reduzida, e cujos clones cultivados são muito semelhantes entre si.

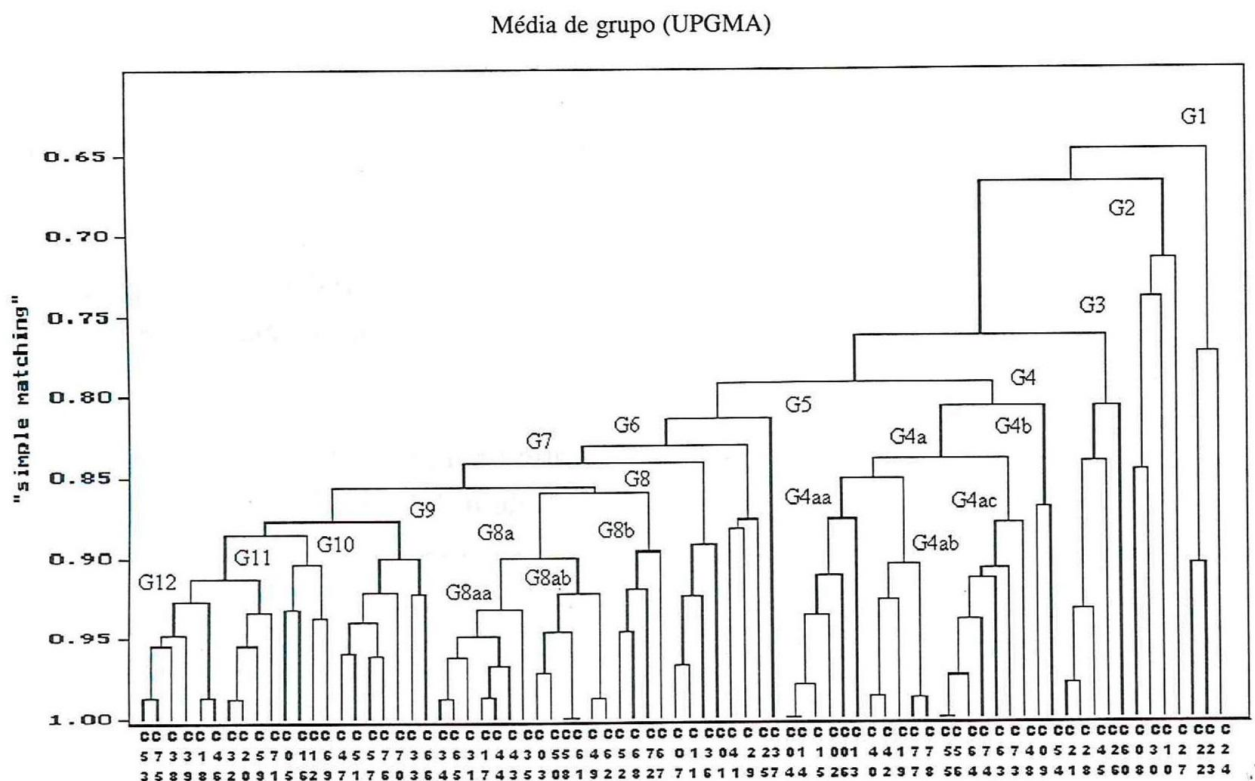


Figura 1 – Fenograma de agrupamento de 78 acessos de pimenta-do-reino da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, gerado pelo método UPGMA, com similaridades calculadas pelo coeficiente de semelhança simples ("simple matching"). O fenograma foi dividido em 12 grupos G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, e G12). Belém (PA), 1999.

Os clones mais divergentes dentro dos grupos em que figuram foram três de espécies selvagens, a saber, *P. colubrinum* Link. (C27), com 72% de similaridade, *P. attenuatum* (C10), com 74% de similaridade, ambos no grupo G2 e *P. betle* (C24), com 77% de similaridade, no grupo G1; e dois de pimenta-do-reino (*P. nigrum* L.), que foram os clones Kotavally (C60), no grupo G3, e Chumala-S (C37), no grupo G5, ambos com, aproximadamente, 80% de similaridade. Os mais dissimilares em relação ao conjunto foram S-1 (C22), G-1 (C23) e *P. betle* (C24) no grupo G1.

Alguns clones atingiram o nível 100% de similaridade, porém, isto não significa que estes clones sejam precisamente iguais, pois os marcadores isoenzimáticos cobrem uma pequena parte do genoma, quando comparados com marcadores de maior precisão, como os marcadores de DNA (DUDLEY, 1994). Estes clones foram 45 (C55) e 132 (C56), no subgrupo G4ac; Djambi (C04) e Belantung (C14), no subgrupo G4aa; P3 (C58) e 239 (C61), no grupo G5. Os clones 45 (C55) e 132 (C56) são clones do CPATU e são mutantes induzidos por irradiação gama. Os clones Djambi (C04) e Belantung (C14) são variedades de pimenta-do-reino originárias da Índia. Os clones P3 (C58) e 239 (C61) são clones atribuídos ao CPATU que são derivados dos clones indianos.

Os clones Cingapura (C02 e C19) e Kuching (C40) originários da Malásia; Djambi (C04 e C15) e Belantung (C14), originários da Indonésia e Trang (C64),

originário da Tailândia, figuraram no grupo G4, porém separados em subgrupos dissimilares, sendo que o nível de ligação entre subgrupos diminui gradativamente dos clones da Indonésia (C04, C14), no subgrupo G4aa, passando pelos clones da Malásia (C19, C40) no subgrupo G4ab e atingindo o menor valor no clone da Tailândia (C64), no subgrupo G4ac. Os subgrupos G4aa, G4ab e G4ac se ligam ao nível médio de 85% de similaridade. Dentro de grupos, os clones Djambi (C04) e Belantung (C14) tiveram 100% de similaridade, e os outros tiveram similaridade superior a 95% em seus respectivos subgrupos. A separação destes clones em subgrupos não foi rigorosa, uma vez que o clone Cingapura (Malásia) ocorreu no mesmo subgrupo (G4aa) dos clones da Indonésia (C04, C14 e C15), além disso, nestes três subgrupos também figuraram clones de origem indiana, tais como Chumala (C13), no subgrupo G4aa, Kudaravalli (C42), no subgrupo G4ab e Balankotta Jones (C73), no subgrupo G4ac.

Deste modo, apesar destes clones de *P. nigrum* L. apresentarem diversidade geográfica, nestas condições estão demonstrando a alta similaridade da espécie, o que pode ser reforçado pelo fato de alguns países em que se têm clones originários serem ilhas ou arquipélagos, como é o caso da Indonésia, fato que pode favorecer maior diferenciação e especiação devido ao isolamento geográfico próprio das ilhas, e isto pode estar acontecendo em pimenta-do-reino, pois estes dados são concordantes com os de

Inoue e Kawahara (1990), que estudaram a diferenciação e a estrutura genética em populações continentais e insulares, no Japão, de *Campanula punctata* e observaram que a diversidade genética total nas ilhas decresceu, enquanto que a similaridade aumentou com o aumento do distanciamento das terras continentais. Em clones de pimenta-do-reino atribuídos à Indonésia, isto pode ter sido causado pelo efeito do isolamento geográfico, porque algumas estacas de terras continentais (Índia e/ou Tailândia) poderiam ter sido levadas para a Indonésia mediante imigração humana.

A distribuição dos clones de origens geográficas diferentes da Índia em subgrupos distintos no grupo G4 do fenograma, também pode ser um indício da tendência de paralelismo entre diversidade genética e origem geográfica observada em muitas espécies autógamas como arroz e pimenta malagueta (PEREIRA, 1989; BARROS, 1991).

Segundo Barriga (1982), os clones S-1 (C22) e Cingapura (C02) não diferiram, citologicamente, pela análise de cariótipo. No entanto, estes clones se situaram em subgrupos dissimilares, à direita do fenograma (G1 e G4aa, respectivamente), estando ligados ao nível de 65% de similaridade. Dentro dos subgrupos em que figuram, estes clones apresentaram valores de similaridade de 90% para o clone S-1e 94% para Cingapura (C02).

Os clones pimenta-da-terra (C43), Espírito Santo (C17) e Diemberg (C44)

constituíram um só subgrupo (G8aa), todos com similaridade superior a 95%. Segundo Barriga, Albuquerque e Sumida (1975), os clones pimenta-da-terra (C43) e Balankotta (C05, C06) são similares. No entanto, se situaram em grupos dissimilares, à esquerda do fenograma (G8aa e G10, respectivamente), ligados ao nível de 85% de similaridade. Dentro de seus respectivos grupos, tais clones apresentaram valores de similaridade muito próximos com 94% para Balankotta e 96% para pimenta-da-terra.

Os padrões de migração das isoenzimas do clone pimenta-da-terra, também conhecido como pimenta caiena, foram os mesmos padrões de migração da grande maioria dos clones originários da Índia, assemelhando-se particularmente com os clones de mesma origem referidos acima, sendo, em razão disto, pimenta-do-reino verdadeira, tanto quanto a pimenta-do-reino que se estabeleceu em cultivo, procedente de Cingapura e introduzida no estado do Pará pela imigração nipônica, considerada por Homma (1969) como a pimenta-do-reino verdadeira.

Os cultivares Bragantina (C38), Guajarina (C11) e Cingapura (C02), apesar de se apresentarem em grupos dissimilares no fenograma (G12, G7 e G4aa, respectivamente) estando ligados os dois primeiros ao nível de 84% de similaridade, e, estes, ligados com G4aa ao nível de 78% de similaridade. A maior similaridade entre os clones Bragantina e Guajarina pode ser devido à mesma origem geográfica (Índia),

que difere da origem geográfica do clone Cingapura (Malásia). Quando comparados dentro dos grupos em que figuram, os valores de similaridade foram muito próximos (95%, 96% e 94%, respectivamente).

O valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) gerado para o fenograma foi de 0,8713, resultando, portanto, em agrupamento satisfatório.

4 CONCLUSÃO

a) A faixa de similaridade observada no fenograma variou de 65% a 100% e a faixa observada considerando os clones dentro dos grupos e subgrupos em que figuram variou de 72% a 100%;

b) a grande maioria dos clones apresentou similaridade variando de 90% a 100%;

c) os clones S-1 (C22), G-1 (C23) e *Piper betle* (C24) foram os clones mais divergentes da coleção, seguidos dos clones *P. colubrinum* Link (C27), *P. attenuatum* (masculino) (C08 e C10) e, *P. attenuatum* (feminino) (C30);

d) os clones de pimenta-do-reino (*P. nigrum* L.) mais divergentes dentro do grupo em que figuram foram Kotavally (C60) e Chumala-S (C37);

e) os clones de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) originários da Malásia, Indonésia e Tailândia formaram um só grupo, porém figurando em subgrupos gradativamente dissimilares entre si;

f) a alta similaridade observada nos clones originados da Indonésia pode ser conseqüência do isolamento geográfico resultante de condição insular aliado à reduzida base genética da espécie;

g) a identidade citogenética observada nos clones S-1 (C22) e Cingapura (C02) não correspondeu com o nível de similaridade genética observada em grupos relativamente distantes no fenograma.

h) O clone pimenta-da-terra (C43) também pode ser considerado pimenta-do-reino verdadeira em função da grande similaridade com os padrões de bandas dos clones de pimenta-do-reino originários da Índia;

i) os clones de pimenta-do-reino mais cultivados no estado do Pará: Bragantina (C38), Guajarina (C11) e Cingapura (C02) alcançaram valores de similaridade na faixa de 94% a 97% dentro dos grupos em que figuram;

j) dentre os clones mais cultivados no estado do Pará, o mais similar foi o clone Bragantina (C38) (Índia) e o menos similar foi o clone Cingapura (C02) (Malásia).

AGRADECIMENTOS

À JICA (Japan International Cooperation Association) pelos materiais, equipamentos e reagentes doados durante o convênio de cooperação científica e tecnológica com a EMBRAPA Amazônia Oriental e ao FUNTEC, que complementou este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.C. de.; DUARTE, M. de L.R. *Inoculação de mudas provenientes de sementes de cultivares de pimenta-do-reino com suspensão de esporos de Fusarium solani f. sp. Piperis*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1983. 2p. (Pesquisa em Andamento).
- BARRIGA, R.H.M.P. *Pimenta-do-reino: origem e distribuição geográfica, caracteres botânicos e melhoramento genético*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1982. 25p.
- ; ALBUQUERQUE, F.C. de; SUMIDA, T. *Estudos sobre a hibridação da pimenta-do-reino*. Belém: IPEAN, 1975. 12p. (Comunicado Técnico, 50).
- BARROS, L. de M. *Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (Anacardium occidentale L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas*. 1991. 256 p. Tese (Doutorado) - ESALQ, Piracicaba, 1991.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. S.l.: Petawawa National Forestry Institute: Canadian Forestry Service, 1984. 49p. (Information Report PI-X-42).
- CURI, P.R. *Ânálise de agrupamento, métodos, seqüenciais, aglomerativos e hierárquicos*. *Ciência e Cultura*, v.10, n.34, p.1416-1429, 1983.
- DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: SIMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR DATA, 1994, Cornwallis. *Proceedings...* Cornwallis: American Society for Horticultural Science: Crop Science Society of America, 1994. p.3-7.
- FARALDO, M.I.F. *Caracterização isoenzimática e diversidade de etnovarietades de mandioca (Manihot esculenta Crantz)*. 1994. 91p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 1994.
- FERREIRA, M.E. *O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas*. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1993. 42p.
- GENTRY, H.S. Introducing black pepper into América. *Economic Botany*, Lancaster, v.9, n.3, p.256-268, 1955.
- HOMMA, A K. Por que perder divisas com especiarias? *Correio Agropecuário*, São Paulo, v.9, n.158, p. 6, 1969.
- INOUE, K.; KAWAHARA, T. Allozyme differentiation and genetic structure in island and mainland japonese populations of *Campanula punctata* (Campanulaceae). *The American Journal of Botany*, v.77, n.11, p.1440-1448, 1990.
- LEMONS, O.F. de; LAMEIRA, O.A.; MENEZES, I.C.de; MOTA, M.G.C.; OKA, S.; SATO, M. *Melhoramento de plantas de interesse econômico para a região amazônica através de técnicas "in vitro"*. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA, 1996. 305p. p.195-233. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 85).
- MARTIN, F.W.; GREGORY, L.E. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *Piper nigrum* L. in Puerto Rico. *Crop Science*, Madison, v.2, n.4, p.295-299, 1962.
- MARTINS, C. da S.; POLTRONIERI, M. C.; KANASHIRO, M.; ALVES, R. M.; GAIA, J.M.; IKETANI, H.; KAJITA, T. Caracterização bioquímica de germoplasma de fruteiras. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. *Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido*. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA, 1996. 305p. p. 161-172. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 85).
- MOTA, M.G.C., LEMOS, O.F. de, POLTRONIERI, M.C., MENEZES, I.C. de. *Melhoramento de plantas de interesse econômico para a região amazônica através de técnicas "in vitro"*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1991. 4p. (EMBRAPA-CPATU. Pesquisa em Andamento, 152).

OBTENÇÃO de cultivares de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). *Relatório Técnico Anual do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido*, Belém, p.184-195, 1978.

PEREIRA, A.V. *Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (Manihot esculenta Crantz)*. 1989. 180 p. Tese (Doutorado)-ESALQ, Piracicaba, 1989.

PERONI, N. *Taxonomia Folk e diversidade intraespecífica de mandioca (Manihot esculenta Crantz) em roças de área de agricultura tradicional em áreas de Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo*. 1998. 168p. Dissertação (Mestrado) – ESALQ, Piracicaba, 1998.

PILLAY, V.S. *Project report on research and development of black pepper (Piper nigrum L.) in the humid tropics of Brazil*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1995. 27p.

RODRIGUES, J.L., *Pimenta-do-reino*. Manaus: Secretaria de Produção. Setor de Relações Públicas, 1967. 21p. (PRODAPAM. Série 5, n.2).

SOKAL, R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Science Bulletin*, n.38, p.1409-1438, 1958.

TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y.; NA'EIM, M.; OHBA, K. Laboratory manual of isozyme analysis. *Bull. Tsukuba Univ. Forest.*, Tsukuba, v. 6, p. 63-95, 1990.

WAARD, P.W.F. de; ZEVEN, A.C. Pepper: *Piper nigrum* L. In: FERRWERDA, F. P.; WIT, F. (Ed.). *Outlines of perennial crop breeding in the tropics*. Wageningen, 1969. p. 409-426 (Miscellaneous Paper, 4).

ZEVEN, A.C. Black pepper, *Piper nigrum* (Piperaceae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). *Evolution of crop plants*. New York: Logman, 1974. 339p. p.234-235.