



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ESTUDOS FILOGENÉTICOS E DE DIVERSIDADE EM *Capsicum*
E SUA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO E USO DE RECURSOS
GENÉTICOS DAS ESPÉCIES *C. frutescens* E *C. chinense*

SABRINA ISABEL COSTA DE CARVALHO

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/ 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ESTUDOS FILOGENÉTICOS E DE DIVERSIDADE EM *Capsicum*
E SUA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO E USO DE RECURSOS
GENÉTICOS DAS ESPÉCIES *C. frutescens* E *C. chinense*

SABRINA ISABEL COSTA DE CARVALHO

ORIENTADOR: FÁBIO GELAPE FALEIRO
CO-ORIENTADORA: GLÁUCIA SALLES CORTOPASSI BUSO

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 022D/2014

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**ESTUDOS FILOGENÉTICOS E DE DIVERSIDADE EM *Capsicum*
E SUA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO E USO DE RECURSOS
GENÉTICOS DAS ESPÉCIES *C. frutescens* E *C. chinense***

SABRINA ISABEL COSTA DE CARVALHO

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM AGRONOMIA DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
AGRONOMIA, LINHA DE PESQUISA EM RECURSOS GENÉTICOS E
MELHORAMENTO VEGETAL.**

APROVADA POR:

Fábio Gelape Faleiro, D.Sc. (Embrapa Cerrados)
Orientador, CPF: 739.634.706-82, e-mail: fabio.faleiro@embrapa.br

Ernandes Rodrigues de Alencar, D.Sc. (Universidade de Brasília)
Examinador interno, CPF: 900.558.021-68, e-mail: ernandesalencar@unb.br

Cláudia Silva da Costa Ribeiro, Ph.D. (Embrapa Hortaliças)
Examinadora externa, CPF: 074.021.458-67, e-mail: claudia.ribeiro@embrapa.br

Francisco José Becker Reifschneider, Ph.D. (Embrapa Sede)
Examinador externo, CPF: 119.670.211-04, e-mail: francisco.reifschneider@embrapa.br

Paulo Eduardo de Melo, Ph.D. (Embrapa Estudos e Capacitação)
Examinador externo, CPF: 301.171.781-87, e-mail: paulo.melo@embrapa.br

BRASÍLIA/DF, 26 de FEVEREIRO de 2014.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Sabrina Isabel Costa de

Estudos filogenéticos e de diversidade em *Capsicum* e sua aplicação na conservação e uso de recursos genéticos das espécies *C. frutescens* e *C. chinense*. / Sabrina Isabel Costa de Carvalho. – Brasília, 2014.

183 p. : il.

Orientação de Fábio Gelape Faleiro; co-orientação de Gláucia Salles Cortopassi Buso.

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Pimentas 2. Variabilidade genética 3. Caracterização
4. Morfologia 5. Marcadores SSR 6. Coleção nuclear I. Faleiro,
Fábio Gelape. II. Buso, Gláucia Salles Cortopassi. III. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CARVALHO, S. I. C. **Estudos filogenéticos e de diversidade em *Capsicum* e sua aplicação na conservação e uso de recursos genéticos das espécies *C. frutescens* e *C. chinense***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 183 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: SABRINA ISABEL COSTA DE CARVALHO

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: ESTUDOS FILOGENÉTICOS E DE DIVERSIDADE EM *Capsicum* E SUA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO E USO DE RECURSOS GENÉTICOS DAS ESPÉCIES *C. frutescens* E *C. chinense*.

GRAU: Doutor

ANO: 2014

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

SABRINA ISABEL COSTA DE CARVALHO

CPF: 555.996.480-87

SQS 102 Bloco D apt. 201, Asa Sul, Brasília/DF, CEP: 70.330-040

Tel: (61) 99811606, e-mail: sabrina.carvalho@embrapa.br

Ao meu marido João Carlos,
e a meus filhos, Davi e Júlia,
por tudo que representam na minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela concessão desse treinamento e aperfeiçoamento profissional.

À Universidade de Brasília (UnB) e Departamento de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado e a todos os professores, pelos ensinamentos e aprimoramento da minha formação acadêmica.

À Embrapa Hortaliças e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela infraestrutura de trabalho e pelo apoio recebido.

Ao programa de melhoramento *Capsicum* da Embrapa Hortaliças, pelo suporte financeiro, técnico e administrativo, por meio dos projetos financiados pelo CNPq, Macroprograma 2 da Embrapa e contrato de parceria entre a Embrapa e a Empresa Sakura-Nakaya Alimentos Ltda.

Ao Dr. Fábio Gelape Faleiro, pela excelente orientação, ensinamentos, sugestões e dedicação para a realização desse trabalho.

À Dra. Gláucia Salles Cortopassi Buso, pela co-orientação, sugestões e todo o apoio recebido durante a realização desse trabalho.

Ao Dr. Francisco José Becker Reifschneider, conselheiro acadêmico junto à Embrapa, exemplo de dedicação à pesquisa, pelo incentivo, sugestões e apoio para a realização desse trabalho.

À Dra. Cláudia Silva da Costa Ribeiro, Dr. Paulo Eduardo de Melo e Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar pela revisão e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos colegas da Embrapa Carlos Francisco Ragassi e Luciano de Bem Bianchetti, pela colaboração efetiva na idealização desse trabalho, pelas reuniões, discussões, sugestões, amizade e incentivo, meu sincero agradecimento.

Aos colegas e funcionários da Embrapa Hortaliça, em especial, Athayde Garcia, Deusimar Lima, Jacinto Pereira e José Getúlio da Silva Filho, pelo auxílio na condução dos trabalhos de cruzamentos, de campo e de laboratório.

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Dr. Márcio Elias, Marco Antônio, Zilneide, Lorena, Peter, Ivone, Anadria, Ediene, Rodrigo, Liamar, Justino, Natascha, Natália, Marília, Mariana, Daniela, Dione, pela agradável convivência e auxílio.

A minha família, pelo apoio incondicional, compreensão, paciência e carinho.

A todos que contribuíram de alguma forma para o êxito desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS GERAIS.....	9
2.1 Objetivos específicos.....	9
2.2 Fluxograma.....	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Gênero <i>Capsicum</i>	12
3.2 Importância econômica.....	13
3.3 Pesquisa de <i>Capsicum</i> com enfoque no melhoramento genético.....	15
3.4 Recursos genéticos - Variabilidade genética de <i>Capsicum</i>	16
3.5 Banco de germoplasma.....	18
3.5.1 BAG <i>Capsicum</i> mantido na Embrapa Hortaliças.....	20
3.6 Caracterização de recursos genéticos.....	21
3.6.1 Caracterização morfológica.....	21
3.6.2 Caracterização molecular.....	22
3.6.3 Caracterização e identificação de espécies de <i>Capsicum</i>	24
3.6.4 Relação entre as espécies do gênero <i>Capsicum</i>	26
3.7 Coleção nuclear.....	28
3.8 População base.....	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 1. RELAÇÕES GENÉTICAS E MORFOLÓGICAS ENTRE FORMAS SILVESTRES E DOMESTICADAS DE PIMENTAS (<i>Capsicum frutescens</i> E <i>C. chinense</i>).....	44
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
1.1 INTRODUÇÃO.....	47
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
1.2.1 Material Genético.....	50
1.2.2 Caracterização morfológica.....	50
1.2.3 Caracterização molecular.....	51
1.3 RESULTADOS.....	52
1.3.1 Caracterização morfológica.....	52
1.3.2 Caracterização molecular.....	57
1.4 DISCUSSÃO.....	61
1.5 CONCLUSÃO.....	67
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CAPÍTULO 2. TRANSFERIBILIDADE DE <i>PRIMERS</i> MICROSSATÉLITES DE <i>Capsicum annuum</i> PARA <i>C. frutescens</i> E <i>C. chinense</i>	72
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74

2.1 INTRODUÇÃO.....	75
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
2.4 CONCLUSÃO.....	83
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E DO	
TEOR DE CAPSAICINÓIDES EM ACESSOS E POSSÍVEIS HÍBRIDOS	
NATURAIS DE <i>Capsicum frutescens</i> E <i>C. chinense</i>	
RESUMO.....	86
ABSTRACT.....	87
3.1 INTRODUÇÃO.....	88
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
3.2.1 Material Genético.....	91
3.2.2 Caracterização morfológica.....	91
3.2.3 Caracterização molecular.....	92
3.2.4 Determinação do teor de capsaicinóides.....	93
3.2.5 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética.....	94
3.3 RESULTADOS	95
3.3.1 Caracterização morfológica.....	95
3.3.2 Caracterização molecular.....	97
3.3.3 Determinação do teor de capsaicinóides.....	101
3.3.4 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética.....	102
3.4 DISCUSSÃO.....	104
3.4.1 Caracterização morfológica.....	104
3.4.2 Caracterização molecular.....	104
3.4.3 Determinação do teor de capsaicinóides.....	106
3.4.4 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética.....	106
3.5 CONCLUSÃO.....	108
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
CAPÍTULO 4. VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Capsicum frutescens</i> COM	
BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES.....	
RESUMO.....	112
ABSTRACT.....	113
4.1 INTRODUÇÃO.....	114
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	115
4.2.1 Material Genético.....	117
4.2.2 Caracterização morfológica	120
4.2.3 Caracterização molecular.....	121
4.3 RESULTADOS.....	124
4.3.1 Caracterização morfológica.....	124
4.3.2. Caracterização molecular.....	128
4.4 DISCUSSÃO.....	129
4.5 CONCLUSÃO	133
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141

CAPÍTULO 5. COLEÇÃO NUCLEAR DE <i>Capsicum frutescens</i> COM BASE EM DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES	144
RESUMO.....	145
ABSTRACT.....	146
5.1 INTRODUÇÃO.....	147
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	149
5.2.1 Material Genético.....	149
5.2.2 Caracterização morfológica e molecular.....	149
5.2.3 Composição da coleção nuclear.....	153
5.3 RESULTADOS.....	153
5.4 DISCUSSÃO.....	161
5.5 CONCLUSÃO.....	164
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
CAPÍTULO 6. VARIABILIDADE GENÉTICA DA COLEÇÃO NUCLEAR E DA POPULAÇÃO BASE DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>Capsicum frutescens</i> , UTILIZANDO DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES.....	167
RESUMO.....	168
ABSTRACT.....	169
6.1 INTRODUÇÃO.....	170
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	171
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	173
6.4 CONCLUSÃO.....	180
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	180
CONSIDERAÇÕES FINAIS	182

RESUMO

As pimentas são parte da riqueza cultural e do valioso patrimônio genético da biodiversidade brasileira. O desenvolvimento de novas cultivares de pimentas e híbridos com características agronômicas e industriais de interesse depende da variabilidade disponível dos seus recursos genéticos. O objetivo geral desse trabalho foi realizar estudos filogenéticos e de diversidade genética em *Capsicum* utilizando marcadores moleculares e características morfológicas visando subsidiar ações de conservação e uso de recursos genéticos de *C. frutescens* e *C. chinense* em programas de melhoramento para o desenvolvimento de tipos varietais brasileiros como a pimenta malagueta. Os objetivos específicos foram: estudar a filogenia e a diversidade genética de *Capsicum* spp. com base em marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e características morfológicas relacionadas ao grau de domesticação; analisar a transferibilidade de *primers* microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) de *C. annuum* para *C. frutescens* e *C. chinense*; confirmar a existência de híbridos naturais; caracterizar a coleção ativa de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças; estabelecer uma coleção nuclear de *C. frutescens* e comparar a coleção nuclear à população base do melhoramento. As ações de pesquisa foram realizadas na Embrapa Hortaliças, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Cerrados, localizadas em Brasília, DF. Quatro acessos silvestres coletados na região Amazônica (CNPH 4315, CNPH 4325B, CNPH 4337 e CNPH 4372), popularmente conhecidos como olho-de-peixe ou olho-de periquito, foram caracterizados utilizando marcadores ISSR como *C. chinense* e apresentaram frutos com características típicas de espécie silvestre. O acesso silvestre CNPH 4353, conhecido como malagueta, foi morfológicamente e molecularmente classificado como *C. frutescens*. É possível, ainda, que esses materiais coletados na Bacia Amazônica, considerada a maior área de diversidade de *C. chinense*, compartilhem das mesmas características morfológicas dos ancestrais silvestres dessa espécie. A transferibilidade de um conjunto de *primers* SSR de *C. annuum* foi testada para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense*. Dos 185 *primers* SSR de *C. annuum* (CA) analisados, 116 (62,7%) apresentaram transferibilidade para as duas espécies. Destes, 19 (16,37%) apresentaram-se polimórficos com uma média de 2,89 alelos por *loco* para *C. frutescens* e 35 (30,17%) mostraram polimorfismo com uma média de 3,3 alelos por *loco* para *C. chinense*. Com base no estudo da transferibilidade, 17 *primers* CA podem ser utilizados para se analisar amostras constituídas por *C. chinense* e *C. frutescens*. Essas

duas espécies são muito próximas geneticamente, sendo difícil a distinção dos acessos, principalmente considerando-se a possibilidade de ocorrência de híbridos naturais. Para confirmar a ocorrência de híbridos interespecíficos naturais, foram realizados testes de viabilidade polínica e compatibilidade genética, caracterização morfológica, caracterização molecular e teor de capsaicinóides. Os resultados mostraram que, embora as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* apresentem similaridades e características compartilhadas com sobreposição de caracteres morfológicos, são de fato distintas pelas análises com marcadores SSR. Testes de viabilidade polínica e de compatibilidade genética mostraram CNPH 4325A e CNPH 4361 como resultados de hibridização natural, em especial o acesso CNPH 4361, que apresentou características morfológicas de ambas as espécies, posição intermediária tanto no dendrograma como no gráfico de dispersão na análise molecular, ocorrência de alelos em heterozigose em seis *loci* e conteúdo intermediário de capsaicina, de 154 mil SHU. A avaliação da variabilidade genética dos 115 acessos que compõem a coleção ativa de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças foi realizada com base em 57 características morfológicas e 239 alelos de 24 *loci* de marcadores SSR. Este estudo permitiu a formação de seis grupos de similaridade em cada uma das análises e mostrou que os acessos são divergentes, havendo variabilidade genética para desenvolvimento de cultivares de *C. frutescens* para diversos nichos como: comercialização *in natura* e produção de conservas e molhos. Os marcadores SSR demonstraram maior capacidade de discriminação em relação aos descritores morfológicos. A altura e a largura das plantas foram as variáveis que apresentaram maior contribuição no índice de diversidade genética. Foi possível o estabelecimento da coleção nuclear com 13 acessos de *C. frutescens* representando 77% da variabilidade genética da coleção ativa, utilizando-se 239 alelos de 24 *loci* de marcadores moleculares SSR, 57 características morfológicas e diferentes estratégias de seleção. A melhor estratégia para formação da coleção nuclear foi evidenciada pela seleção dos acessos nos diferentes grupos de similaridade estabelecidos por marcadores moleculares SSR e incidência de viroses. Características morfológicas e moleculares foram utilizadas para avaliar e comparar a variabilidade genética dessa coleção nuclear (13 acessos), de uma população base de melhoramento genético (6 acessos) e de uma coleção ativa (104 acessos) de *C. frutescens*. Verificou-se maior variabilidade genética entre os acessos da coleção nuclear em relação à população base, tanto na caracterização morfológica quanto na molecular. Os resultados demonstram que os acessos da coleção

nuclear podem aumentar a base genética dos programas de melhoramento genético de *C. frutescens*, maximizando as possibilidades de combinações gênicas desejáveis.

Palavras-chave: pimentas, variabilidade genética, caracterização, morfologia, marcadores SSR, coleção nuclear.

ABSTRACT

Peppers are part of the cultural wealth and of the valuable genetic patrimony of the Brazilian biodiversity. The development of new pepper cultivars and hybrids with agronomic and industrial traits of interest relies on the variability of the genetic resources available. The overall objective of this work was to study phylogenetics and genetic diversity in *Capsicum* using molecular markers as well as morphologic characteristics to subsidize conservation and use of genetic resources of *C. frutescens* and *C. chinense* in breeding programs for the development of Brazilian varietal types such as the malagueta pepper. The specific objectives were: to study phylogenetics and genetic diversity of *Capsicum* spp. based on ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers and morphological characteristics related to the degree of domestication; to analyze the transferability of microsatellite primers (SSR - Simple Sequence Repeats) from *C. annuum* to *C. frutescens* and *C. chinense*; to confirm the existence of natural hybrids; to characterize the *C. frutescens* active germplasm collection of Embrapa Vegetables; to establish a core collection of *C. frutescens* and to compare the core collection to the base population of a breeding program. The research activities were carried out at Embrapa Vegetables, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology and Embrapa Cerrados, in Brasilia, Federal District. Four wild accessions collected in the Amazon region (CNPH 4315, CNPH 4325B, CNPH 4337 and CNPH 4372) popularly known as olho-de-peixe or olho-de-periquito, were characterized using ISSR as *C. chinense* and presented fruits with traits typical of wild species. The wild accession CNPH 4353 known as malagueta was morphologically and molecularly classified as *C. frutescens*. Probably, these accessions collected in the Amazon Basin, the area with the largest diversity of *C. chinense*, share morphological characteristics with wild ancestors of this species. Transferability of a set of microsatellite primers of *C. annuum* was tested for the species *C. frutescens* and *C. chinense*. From the 185 *C. annuum* SSR primers (CA) analyzed, 116 (62.7%) showed transferability for both species. Of them, 19 (16.37%) were polymorphic with an average of 2.89 alleles per *locus* for *C. frutescens* and 35 (30.17%) showed polymorphism with an average of 3.3 alleles per *locus* for *C. chinense*. Based on the study of transferability, 17 CA primers can be used to analyze samples of *C. chinense* and *C. frutescens*. These two species are genetically very similar, making it difficult to distinguish the accessions, especially considering the possible occurrence of natural hybrids. To confirm the occurrence of natural interspecific hybrids,

pollen viability and genetic compatibility tests were carried out, as well as morphological and molecular characterization with the analysis of capsaicinoids content. Although the species *C. chinense* and *C. frutescens* share similarities with overlapping morphological characteristics, they are actually different by analysis with SSR primers. Pollen viability and genetic compatibility tests pointed CNPH 4325A and CNPH 4361 as a result of natural hybridization, especially CNPH 4361, which showed morphological characteristics typical of both species, intermediate position in the dendrogram and in the scatter plot of the molecular analysis, occurrence of heterozygous alleles at six *loci* and intermediate content of capsaicin, of 154,000 SHU. The genetic variability of 115 accessions that compose the *C. frutescens* active germplasm collection of Embrapa Vegetables was based on 57 morphological characteristics and 239 alleles from 24 SSR *loci*. This study allowed the formation of six similarity groups in each analysis and showed that the accessions are diverse, presenting genetic variability for the development of cultivars of *C. frutescens* for a number of markets, such as the fresh-fruit and the processed-fruit (canning and sauces) markets. The SSR markers showed greater capacity for discrimination of morphological descriptors. Height and width of plants were the variables that showed the highest contribution to the coefficient of genetic diversity. A core collection was settled with 13 accessions of *C. frutescens* representing 77 % of the genetic variability of the active collection, gathering 239 alleles of 24 SSR *loci*, 57 morphological and agronomic characteristics and different selection strategies. The best strategy for settling the core collection was evidenced by the selection of accessions from different groups of similarity of the SSR analysis associated to the evaluation of incidence of viruses. Morphologic, agronomic and molecular characteristics were used to evaluate and compare the genetic variability of this core collection (13 accessions), a base population of the breeding program (6 accessions) an active collection (104 accessions) of *C. frutescens*. A higher genetic variability among accessions of the core collection was verified in comparison to the base population, both in the morphological and molecular characterization. The results show that accessions of the core collection can improve the genetic base of breeding programs of *C. frutescens*, maximizing the chances of desirable gene combinations.

Key words: peppers, genetic variability, characterization, morphology, SSR markers, core collection.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As pimentas do gênero *Capsicum* spp. originárias das Américas foram rapidamente disseminadas para outras partes do mundo em virtude de sua versatilidade culinária, industrial, ornamental e também por suas propriedades medicinais. Os diferentes tipos de *Capsicum* passaram a ser consumidos por povos de todas as origens em quantidades crescentes, especialmente em países como Índia, China, Tailândia, Indonésia, Turquia, Coréia do Sul e México, conhecidos por suas receitas picantes. Hoje, China e Índia cultivam, anualmente, cerca de 1,5 milhão de hectares de *Capsicum* (FAOSTAT, 2014a). Os tailandeses e os sul coreanos, considerados como os maiores consumidores de pimenta do mundo, comem 5 e 8 g.dia.pessoa⁻¹, respectivamente (REIFSCHNEIDER, 2000).

A maioria dos frutos das pimentas possui sabor pungente característico devido à presença predominante do alcalóide denominado capsaicina, exclusivo do gênero *Capsicum*, encontrado preferencialmente na placenta e, em menor quantidade, na semente e pericarpo do fruto. A pungência é uma das características utilizadas para determinar a qualidade comercial dos frutos de pimenta, sendo a capsaicina empregada na indústria farmacêutica. Os frutos também apresentam alto valor nutricional e são fontes importantes de antioxidantes naturais, de vitamina E, vitaminas do complexo B e vitamina A (REIFSCHNEIDER, 2000; DJIAN-CAPORALINO et al., 2007).

As pimentas são parte da riqueza cultural e do valioso patrimônio genético da biodiversidade brasileira. São cultivadas em todo o território nacional desde o Rio Grande do Sul até Roraima, em uma imensa variedade de tipos, nomes, tamanhos, cores, sabores e pungência. O cultivo realizado por pequenos, médios e grandes produtores se ajusta perfeitamente aos modelos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústrias, sendo uma alternativa de renda. A área anual cultivada é cerca de cinco mil hectares, com produção aproximada de setenta e cinco mil toneladas. A produtividade média depende do tipo de pimenta, variando de 10 a 30 t.ha⁻¹ (RIBEIRO et al., 2008a).

O agronegócio *Capsicum* é muito mais relevante do que se imagina, pois envolve diferentes segmentos, desde pequenas plantações e fábricas artesanais caseiras, até a exportação de páprica por empresas multinacionais que competem no mercado internacional de especiarias e temperos. Parte da produção brasileira é exportada em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais. Em 2005, o volume das exportações brasileiras de pimentas e pimentões atingiu mais de 9.200

toneladas, com valor aproximado de US\$ 23.500.000, posicionando-se como a segunda principal hortaliça exportada, atrás apenas do melão. Considerando o mercado nacional, as pimentas e os pimentões incluem o grupo das dez hortaliças mais importantes no país (RIBEIRO et al., 2008b).

A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento de área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias em diferentes regiões brasileiras. O consumo recente de produtos frescos ou processados de pimenta cumari (*C. baccatum* L. var. *praetermissum* (Heiser & Smith) Hunziker) variedade botânica exclusiva do Brasil, é um bom exemplo de muitos nichos sendo constantemente desenvolvidos no mercado de pimenta (REISFCHNEIDER et al., 2009).

O Brasil é um importante centro de diversidade do gênero *Capsicum*, pois em seu território encontram-se espécies em todos os níveis de domesticação (domesticadas, semidomesticadas e silvestres). As espécies domesticadas de *Capsicum* são: *C. annuum* L. var. *annuum*; *C. baccatum* L. var. *pendulum* (Willd.) Eshbaugh; *C. chinense* Jacq.; *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pavon. Apenas *C. pubescens* não se encontra representada no Brasil (RIBEIRO et al., 2008a) e o seu centro primário de diversidade é a Bolívia (ESHBAUGH, 1979).

A espécie *C. chinense* tem sua área de maior diversidade na Bacia Amazônica, de onde se pode concluir ter sido domesticada pelos indígenas e, portanto, considerada como a mais brasileira entre as espécies domesticadas (REIFSCHNEIDER, 2000). No Estado de Roraima, extremo Norte da Amazônia brasileira, a espécie *C. frutescens* (pimenta malagueta) seguida da espécie *C. chinense* (tipo pimenta murupi e pimenta olho-de-peixe) são os morfotipos tradicionalmente mais consumidos e que circulam em maior intensidade e volume entre as comunidades indígenas locais devido o alto grau de pungência (BARBOSA et al., 2002).

A principal área de diversidade da espécie *C. frutescens* ainda não é bem definida. Alguns autores apontam a América Central, particularmente a Costa Rica, por apresentar uma diversidade maior do que a América do Sul (PICKERSGILL, 1979, 1984). Outros relatam que no México é possível encontrar populações silvestres de *C. frutescens* com grande variabilidade morfológica e genética (JARRET et al., 2007; CASTAÑÓN-NÁJERA, 2008).

Os tipos mais comuns de *C. frutescens* são as malaguetas, assim chamadas no Brasil, e os tabascos, como são conhecidos nos Estados Unidos. A pimenta malagueta brasileira é uma das mais conhecidas, consumidas e cultivadas em todo o país, principalmente nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás e Sergipe. A pimenta malagueta tem se constituído em uma fonte de rendimentos financeiros na pequena propriedade familiar brasileira, como, por exemplo, nos cultivos da Zona da Mata Mineira, em Lagarto (SE) e em assentamentos rurais no Estado de Goiás (DUARTE, 2011; PINTO e MARTINS, 2011; SILVA et al., 2010).

As pimentas malaguetas e os tabascos possuem frutos pequenos, de formato alongado, coloração vermelha quando maduros e elevado teor de capsaicina e são destinados tanto para o mercado *in natura*, como para o processamento na forma de molhos líquidos, conservas, geléias e pastas (CARVALHO et al., 2006). No estado do Ceará, a pimenta tabasco é cultivada tanto para exportação na forma de pasta, quanto para consumo na forma de molho para o mercado local (CRISÓSTOMO, 2006).

Atualmente existe uma demanda crescente por parte de produtores por novas cultivares, principalmente por pimentas do tipo malagueta (RIBEIRO et al., 2008b). As cultivares de pimenta malagueta encontradas no mercado brasileiro não são homogêneas e apresentam grandes variações na morfologia e na produtividade. Grande parte dos agricultores produz suas próprias sementes e normalmente estas sementes são de qualidade inferior, apresentam baixa germinação, podem carrear patógenos e resultar em menor uniformidade de emergência das plântulas e produtividade.

O desenvolvimento de novas cultivares de pimenta malagueta e híbridos com características agronômicas e industriais de interesse, visando aumentar a produtividade, qualidade e conseqüentemente a competitividade do agronegócio de *Capsicum* no Brasil, depende da variabilidade disponível dos seus recursos genéticos.

O banco ativo de germoplasma (BAG) de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças é uma coleção que apresenta grande número de acessos e considerável variabilidade genética nas espécies domesticadas e, provavelmente, a única no Brasil que possui espécies silvestres. A ampla variabilidade é verificada quanto à coloração, forma, aroma, e pungência de frutos, resistência múltipla a doenças e arquitetura de planta. Dentre todos os acessos conservados, o BAG possui cerca de 115 acessos identificados como *C. frutescens*. Vários acessos foram

coletados na região Norte do Brasil, em áreas de ocorrências de formas espontâneas e podem ter implicações filogenéticas significativas.

A caracterização da diversidade genética, o estabelecimento de uma coleção nuclear e a criação de uma população base ampliam as possibilidades de uso do germoplasma. Essas estratégias permitem a seleção de genótipos superiores com potencial para diversos nichos de mercado, beneficiando tanto as agroindústrias como a agricultura familiar.

2. OBJETIVOS GERAIS

Ampliar o conhecimento científico em recursos genéticos utilizando marcadores moleculares e características morfológicas no estudo da filogenia, diversidade genética, população base e estabelecimento de coleção nuclear de acessos de *C. frutescens* com o intuito de orientar e aumentar a eficiência do programa de melhoramento e contribuir para o desenvolvimento de tipos varietais brasileiros como a pimenta malagueta.

2.1 Objetivos Específicos

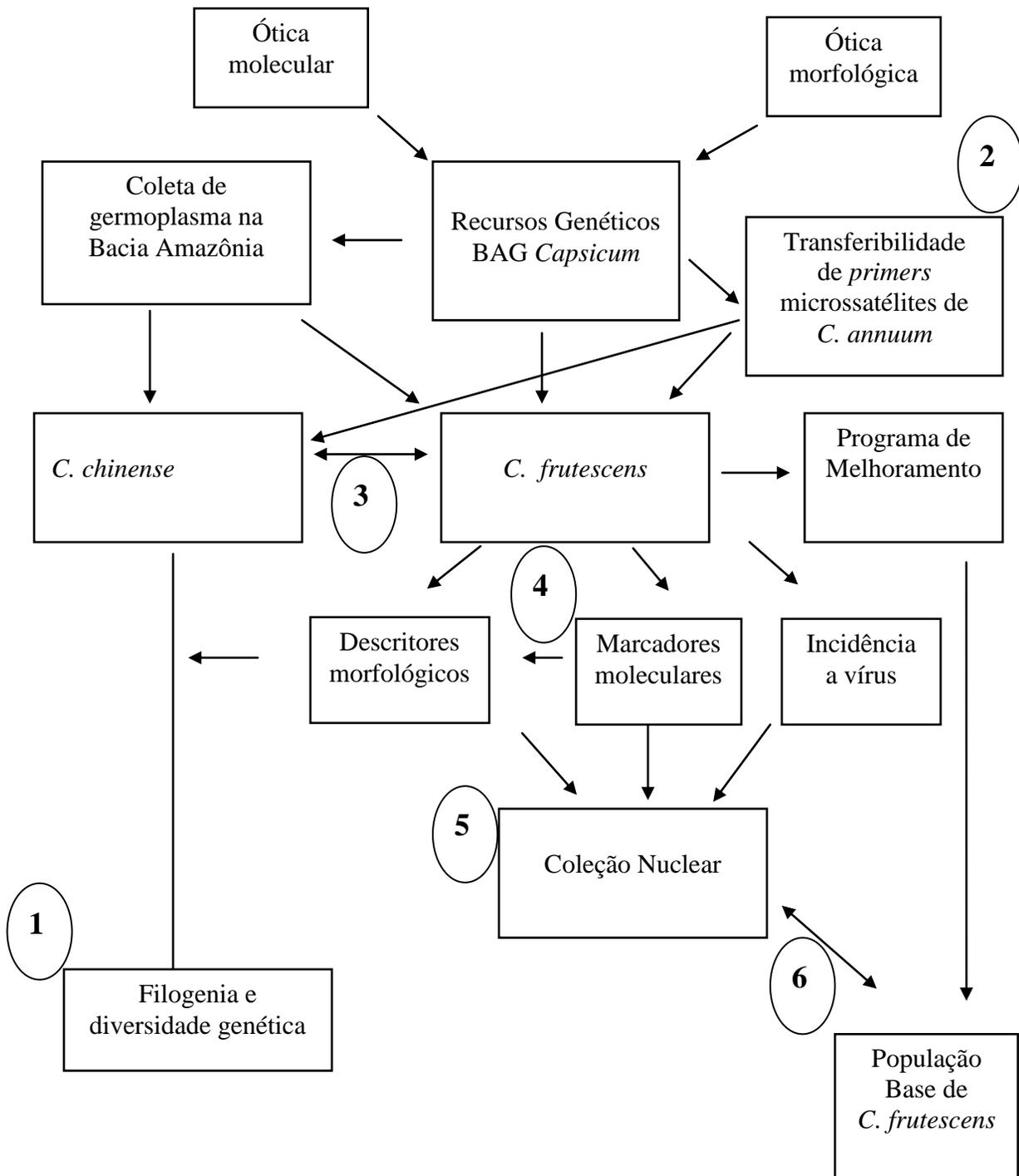
1. Estudar a filogenia e diversidade genética de *Capsicum* spp. com base em marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e características morfológicas relacionadas ao grau de domesticação;
2. Analisar a transferibilidade de *primers* microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) de *C. annuum* para *C. frutescens* e *C. chinense*;
3. Utilizar marcadores microssatélites e características morfológicas para estudar a variabilidade genética, auxiliar na classificação taxonômica de acessos de *C. frutescens* e *C. chinense* e confirmar a existência de híbridos naturais entre as duas espécies;
4. Caracterizar a variabilidade genética dos 115 acessos que compõem a coleção ativa de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças, com base em características morfológicas e marcadores moleculares microssatélites;
5. Estabelecer uma coleção nuclear de *C. frutescens* a partir da análise da variabilidade genética com base em descritores morfológicos e moleculares;

6. Avaliar a variabilidade genética da coleção nuclear e população base do melhoramento genético de *C. frutescens*, utilizando descritores morfológicos e moleculares.

Os referidos objetivos foram estruturados em seis capítulos conforme o fluxograma (item 2.2).

2.2 FLUXOGRAMA DO PROJETO

O fluxograma apresentado a seguir mostra uma visão do projeto:



3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Capsicum*

Os mais antigos registros arqueológicos de pimentas datam em torno de 7.000 a 9.000 anos e refletem a utilização de espécies de *Capsicum* spp. não somente como condimentos ocasionais, mas como componentes de uma sofisticada e complexa dieta. Diante de tais evidências, pesquisadores como PICKERSGILL (1969a, 1969b) e PERRY et al. (2007) foram levados a afirmar que as pimentas dividem com o feijão e algumas curcubitáceas a distinção de terem sido as primeiras plantas cultivadas no Novo mundo.

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae, uma família grande e economicamente importante, que inclui berinjela, batata e tomate. Esse gênero não possui nenhum parentesco com a pimenta do reino, *Piper nigrum*, e nem está relacionado com a pimenta da Guiné ou grãos do paraíso, *Aframomum melegueta*. Todas as espécies do gênero *Capsicum* são originárias no hemisfério ocidental e são nativas das regiões tropicais das Américas (DeWITT e BOSLAND, 2009). O nome do gênero *Capsicum* deriva do grego: Kapsó (picar) e a palavra pimenta aparece no século XIII, derivada do latim *pimenta*, plural de *pimentum*, corante (NUEZ et al., 1996).

Capsicum é considerado um gênero pequeno com cerca de 35 táxons (espécies e variedades), classificados em categorias de acordo com o nível de domesticação, sendo cinco táxons domesticados e trinta silvestres (semidomesticados e silvestres) (REIFSCHNEIDER, 2000; DeWITT e BOSLAND, 2009).

As plantas domesticadas são aquelas que o homem selecionou determinadas alterações genéticas, de tal modo que não são capazes de sobreviver em condições naturais e são absolutamente dependentes do homem para a sobrevivência. As semidomesticadas são também cultivadas, mas o grau de dependência em relação ao homem é pequena. As plantas silvestres são aquelas que podem ser exploradas pelo homem no seu ambiente natural, isto é, não são cultivadas e nem existe nenhuma relação de dependência com o homem (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

Acredita-se que as espécies do gênero *Capsicum* tenham sido domesticadas independentemente, em pelo menos três regiões: *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens* na Mesoamérica (região compreendida entre o centro do México e o noroeste da Costa Rica), *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. pubescens* na região Andina, e *C. chinense* na região da Planície Tropical da América do Sul (PICKERSGILL, 2007).

3.2 Importância econômica

Embora as espécies de *Capsicum* não estejam incluídas no grupo dos vegetais importantes para a alimentação humana, sem dúvida despontam como uma das culturas mais importantes no mundo como condimento (DeWITT e BOSLAND, 2009). As pimentas *Capsicum* são consumidas frescas ou processadas nas formas de flocos desidratados (pimenta calabresa), pó (páprica), molhos e conservas. Além das qualidades gustativas, estas plantas são extremamente valorizadas pelos atributos farmacológicos relacionados aos componentes que causam a pungência (alcalóide capsaicina) e são utilizadas como plantas ornamentais (RIBEIRO et al., 2008a; DJIAN-CAPORALINO et al., 2007).

A produção mundial média anual em 2011 de *Capsicum* foi de aproximadamente 29,6 milhões de toneladas de produtos frescos e 3,4 milhões de toneladas de produtos secos cultivados em cerca de 3,8 milhões de hectares por ano. A produção total de *Capsicum* (produtos frescos e secos) aumentou aproximadamente 28% desde 2000. China, México e Turquia são os principais países produtores de produtos frescos e Índia e China de produtos secos (FAOSTAT, 2014a). Os valores do comércio mundial entre 2000 a 2011 apresentaram um rápido crescimento, de US\$ 1,6 bilhões para US\$ 4,3 bilhões referentes à produtos frescos e de US\$ 302 milhões para US\$ 1,3 bilhões de produtos secos (FAOSTAT, 2014b).

O Brasil produz pimentas em todas as regiões. Os principais estados brasileiros produtores são: Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará e Rio Grande do Sul. As pimentas malagueta (*C. frutescens*); a pimenta-de-cheiro, pimenta-de-bode, cumari-do-pará, murupi, biquinho (*C. chinense*); a dedo-de-moça e cambuci (*C. baccatum*) são alguns dos tipos cultivados no país (RIBEIRO et al., 2008a).

O mercado brasileiro de pimentas é muito segmentado e diverso, em razão da grande variedade de produtos e subprodutos, usos e formas de consumo. O mercado para as pimentas pode ser dividido de acordo com o objetivo da produção (consumo interno ou exportação) e forma de apresentação do produto (*in natura* ou processado). Praticamente toda a produção destinada à exportação é na forma processada, enquanto para o mercado interno tanto as formas processadas como *in natura* (pimentas sem processamento) são importantes. A comercialização de pimentas *in natura*, no atacado e varejo, ocorre em todas as regiões brasileiras. Entretanto, há dificuldade de estimativa do tamanho real e relevância

desse mercado, pela falta de estatísticas e informações sistematizadas (RIBEIRO et al., 2008a)

O agronegócio *Capsicum* brasileiro é promissor com a abertura de novos nichos de mercado, principalmente para produtos de alto valor agregado, como é o caso de pimentas processadas e convertidas ou usadas em molhos, conservas ornamentais, geléias, embutidos (salames, salsichas, linguças), massas, ketchups e maioneses. Também são boas as perspectivas para molhos com diferentes graus de picância ou ardume (teor de capsaicina) e com sabores similares ao da pimenta tabasco, e para novos tipos varietais direcionados para a indústria de processamento, visando à produção de flocos desidratados, conservas e geléias (CARVALHO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008a).

As malaguetas são consumidas e cultivadas em todos os estados do Brasil, principalmente em pequena propriedade familiar e assentamentos rurais (DUARTE, 2011; RIBEIRO et al., 2008a; SILVA et al., 2010), com destaque para o Estado de Minas Gerais, principalmente, a Zona da Mata. Estima-se que cada hectare cultivado de pimenta malagueta gere de quatro a cinco postos de trabalho apenas durante o processo produtivo, aumentando essa quantidade de mão-de-obra durante a colheita, fase da cultura que absorve maior quantidade de serviços temporários. Em 2011, nos principais municípios mineiros produtores foram cultivados cerca de 1140 hectares com vários tipos de pimenta atingindo uma produção de aproximadamente 1.982 toneladas, destinadas tanto para o consumo *in natura* quanto para a fabricação de molhos e conservas (PINTO e MARTINS, 2011).

Na Central de Abastecimento de Minas Gerais S/A, unidade de Uberlândia, o preço médio mensal da pimenta malagueta no mercado atacadista durante o ano de 2013 foi de R\$ 12,5 kg⁻¹. Os preços médios variaram para outros tipos de pimenta: cumari (R\$ 12,7 kg⁻¹), bode (R\$ 7,6 kg⁻¹) biquinho (R\$ 6,6 kg⁻¹); dedo-de-moça (R\$ 4,2 kg⁻¹) e Cambuci (R\$ 3,1 kg⁻¹).

Vale ressaltar, que na Central de Abastecimento de Goiás S/A, unidade de Goiânia, o preço médio mensal da pimenta malagueta no mercado atacadista durante o ano de 2012 foi de R\$ 8,0 lt⁻¹. Os preços médios variaram para os diferentes tipos de pimenta: cumari (R\$ 5,6 lt⁻¹), bode (R\$ 3,0 lt⁻¹), biquinho (R\$ 6,6 kg⁻¹), dedo-de-moça (R\$ 4,2 lt⁻¹); godê ou cambuci (R\$ 9,7 por caixa) e De cheiro (R\$ 5,1 kg⁻¹) (CEASA-GO, 2012).

3.3 Pesquisa de *Capsicum* com enfoque no melhoramento genético

O melhoramento genético de pimentas teve início com os primeiros agricultores que, ao selecionarem e preservarem tipos de pimentas que se mostravam mais atrativas e interessantes estavam involuntariamente praticando o melhoramento por seleção em massa, conhecido como seleção massal (REIFSCHNEIDER, 2000).

Programas de melhoramento de *Capsicum* são conduzidos tanto por empresas públicas como privadas e por universidades. Entre as mais recentes pesquisas de importância para o gênero *Capsicum* destaca-se o programa de melhoramento de *Capsicum* (programa iniciado em 1980), realizado por pesquisadores da Embrapa Hortaliças e parceiros, direcionado para o desenvolvimento de linhagens, cultivares e híbridos com alta produtividade, resistência múltipla a doenças e melhor qualidade de fruto.

Nos últimos vinte anos, um número significativo de cultivares de polinização aberta (OP) e híbridos de *Capsicum* foi lançado pela Embrapa Hortaliças oriundas de processos de seleção e recombinação de acessos do BAG: um pimentão com resistência a *Cercospora* (cultivar Tico), três cultivares OP de pimentas tipicamente brasileiras (BRS Seriema, BRS Mari e BRS Moema), um híbrido de pimentão para páprica (BRS Brasilândia) e três cultivares de pimentas do tipo Jalapeño desenvolvidas em parceria com empresas de processamento (BRS Ema, BRS Garça, BRS Sarakura) (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2012; RIBEIRO et al., 2013). Em 2010, as pimentas tipo Jalapeño BRS Sarakura e BRS Garça para processamento industrial foram as primeiras cultivares de hortaliças a serem protegidas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A cultivar BRS Sarakura é atualmente responsável por 50% de todo o molho de pimenta produzido no Brasil (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2012; NASS et al., 2012). Além disso, várias linhagens resistentes a diferentes patógenos foram disponibilizadas para instituições de pesquisa nacionais e internacionais. Exemplos incluem: CNPH 148 (resistente à podridão de raiz causada por *Phytophthora capsici*), CNPH 703 (resistente a várias espécies de *Xanthomonas* spp.) e CNPH 679 (resistente a tospovírus), que têm sido utilizados por programas de melhoramento públicos e privados no Brasil e no exterior (REIFSCHNEIDER et al., 2013).

3.4 Recursos genéticos - Variabilidade genética de *Capsicum*

As características selecionadas sob cultivo ou em processo de domesticação estão de acordo com as preferências e conveniências dos diferentes agrupamentos humanos, de tal maneira que, nesse processo, foram selecionadas muitas variantes morfológicas que, em sua maioria, não teriam chance de sobrevivência em condições naturais. Como resultado, uma grande diversidade de tipos foi perpetuada dentro de uma mesma espécie. Muitas das características morfológicas utilizadas ainda hoje (direcionadas especialmente para a forma, cor, posição e pungência dos frutos) elencadas para subsidiar os programas de melhoramento ou para discriminar uma espécie de outra, são as mesmas que foram selecionadas e manipuladas desde o tempo em que essas plantas foram inicialmente cultivadas (WALSH e HOOT, 2001).

Algumas espécies do gênero *Capsicum* foram primeiramente selecionadas e domesticadas nas áreas originais do continente americano (centro primário de diversidade). Depois da chegada dos europeus as Américas, as pimentas foram introduzidas em diferentes áreas e os processos de seleção continuaram gerando novos tipos morfológicos, e por esse motivo, as novas áreas que apresentaram diversidade intra e interespecífica, dentro de uma cultura, são considerados centro secundários de diversidade (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005).

Nos centros de diversidades secundários, milhares de variedades foram selecionadas pelos produtores por vários séculos para atender as condições ambientais, hábitos de consumo locais e comércio, resultando na diversidade fenotípica encontrada em *Capsicum* (NUEZ et al., 1996; DJIAN-CAPORALINO et al., 2007).

As limitadas descrições quando da descoberta do Brasil, não permitem identificar as pimentas utilizadas pelos nativos e colonizadores. Segundo as crônicas da época, fica evidenciada a presença de pimentas de diversas formas e cores, as quais não eram encontradas nas populações silvestres. Desse modo, podemos concluir que se tratava de pimentas já domesticadas. Contudo, mesmo que aquelas pimentas tivessem sido introduzidas de outras áreas, o processo de seleção nas tribos indígenas brasileiras continuou e foram criados novos tipos morfológicos diferentes daqueles encontrados nas áreas originais. Por esse motivo, o Brasil é um importante centro secundário de espécies domesticadas do gênero *Capsicum* (REIFSCHNEIDER, 2000).

Dos quatro centros de diversidade reconhecidos por Hunziker (citado por BARBOZA e BIANCHETTI, 2005) para o gênero *Capsicum*, dois estão no Brasil: um no nordeste e, o outro, na costa leste. BIANCHETTI (1996) concluiu que o centro de diversidade no Rio de Janeiro é composto pelo maior número de espécies silvestres do gênero *Capsicum*. Três novas espécies silvestres de *Capsicum* oriundas da Mata Atlântica foram descritas por BARBOZA e BIANCHETTI (2005): *C. pereirae*, *C. friburgense* e *C. hunzikerianum*.

A pimenta tipo malagueta (*C. frutescens*) também conhecida como malagueta e malagueta destaca-se por ser muito popular e consumida no Brasil. Seu nome provavelmente foi designado do termo português usado para os frutos picantes dos grãos-do-paráiso, também chamados de malagueta, pertencentes à espécie *Aframomum melegueta* (REIFSCHNEIDER et al., 2009). A variabilidade morfológica de formas, tamanhos e cores de frutos de *C. frutescens* é inferior à verificada em outras espécies domesticadas do gênero. O exemplo mais difundido, e por muito tempo considerado a única forma domesticada, é aquela popularmente conhecida como pimenta tabasco (PICKERSGILL, 1971), cultivada nos Estados Unidos. BARAL e BOSLAND (2004) relatam a existência de acessos de *C. frutescens* apresentando frutos grandes, pendentes e persistentes sugerindo a existência de outras formas domesticadas, além do tabasco cultivado.

O centro de domesticação para *C. frutescens* ainda não está bem definido. Entretanto, partindo-se do pressuposto que as áreas de maior diversidade genética coincidem com as áreas de provável domesticação da espécie, alguns autores apontam que as coletas realizadas na América Central, particularmente na Costa Rica, mostram uma diversidade maior que aquelas da América do Sul e, por esse motivo, acreditam que *C. frutescens* tenha sido domesticado nas terras baixas da América Central (PICKERSGILL, 1979, 1984). Outros autores apontam que no México é possível encontrar populações silvestres de *C. frutescens* com grande variabilidade morfológica e genética (JARRET et al., 2007; CASTAÑÓN-NÁJERA, 2008) e, por esse motivo, atribuem ao México o título de centro de domesticação da espécie. A Mesoamérica (região compreendida entre o centro do México e o noroeste da Costa Rica) também foi citada por PICKERSGILL (2007) como provável área de domesticação das espécies *C. annuum* var. *annuum* e *C. frutescens*.

A distribuição geográfica da espécie *C. frutescens* ocorre desde as terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas (Índias Ocidentais), no Caribe. Além

das Américas é cultivada na África, Índia, China, Japão e Tailândia (MOSCONE et al., 2007; MONGKOLPORN e TAYLOR, 2011). Na Ásia, cerca de 400 anos se passaram desde sua introdução e os povos indígenas de Taiwan e ilhas Batanes incorporaram essa espécie na sua cultura utilizando seus frutos de várias maneiras como: condimentos na dieta diária, medicamentos, ornamental, usos rituais, e uso de folhas no preparo de sopas (YAMAMOTO e NAWATA, 2009). As raças locais de *C. frutescens* são cultivadas em várias regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. A existência de populações locais é mencionada em alguns países das Américas como: no Peru, o tipo picante é denominado de pimenta Pipi de Mono (ORTIZ et al., 2010); em Tabasco, no México, o morfotipo semidomesticado chamado de Picopaloma (CASTAÑÓN-NÁJERA et al., 2008) e no Brasil, população selvagens de *C. frutescens* vegetam na Bacia Amazônica (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005).

3.5 Banco de germoplasma

No melhoramento de plantas, a diversidade genética é fonte essencial do progresso genético, motivando a coleta, manutenção e a caracterização de recursos genéticos da maioria de espécies de plantas cultivadas desde o início do século 20 (NICOLAI et al., 2013).

Até a década de 1940, os centros de origem de espécies domesticadas foram considerados fontes ilimitadas de variabilidade genética. A expansão da fronteira agrícola e o uso indiscriminado da terra, sem a preocupação de preservação do meio ambiente e dos recursos genéticos para as gerações futuras, pode levar à extinção de parentes selvagem de muitas espécies cultivadas, incluindo o gênero *Capsicum*. A possibilidade de uma diminuição da diversidade genética dentro de uma espécie e espécies selvagens relacionadas levou a comunidade científica a defender a manutenção de recursos genéticos de diferentes espécies vegetais (REIFSCHNEIDER, 2000).

Os recursos genéticos constituem-se na parte essencial da biodiversidade, que é usada pelo homem para a promoção do desenvolvimento sustentável da agricultura e produção de alimento (GOEDERT, 2007). Para VALOIS (1999) é a variabilidade de espécies de plantas, animais e microrganismos integrantes da biodiversidade, de interesse sócio-econômico atual e potencial para utilização em programas de melhoramento genético, biotecnologia e outras ciências afins. Entende-se por germoplasma a base física do cabedal

genético que reúne o conjunto de materiais hereditários de uma espécie (VALOIS et al., 2010).

A conservação do germoplasma das espécies cultivadas é realizada principalmente sob a forma *ex situ*, na qual a conservação de componentes da diversidade biológica é realizada fora de seu habitat natural. Amostras ou acessos são armazenados na forma de sementes, plantas, estacas, pólen, embriões, tecidos, células, DNA ou seus fragmentos representantes da variação genética da população original. As unidades organizacionais que tem como objetivo a conservação, o manejo e a utilização da variabilidade genética são denominadas de Bancos de Germoplasma (ENGLES, 2002).

Atualmente, a maioria das instituições de pesquisa nacionais e internacionais, públicas e privadas mantem um banco ou coleção de germoplasma vegetal, que incluem espécies selvagens, cultivares e tipos especiais, populações, linhagens ou variedades OP, variedades obsoletas e híbridos (NASS et al., 2012). Melhoristas de plantas normalmente apelam para o BAG para gerar novas cultivares mais produtivas, resistentes às doenças com qualidade nutricional superior ou outras características de interesse (RIBEIRO et al., 2008a).

As principais atividades realizadas no BAG são: o enriquecimento da coleção por meio de intercâmbio e coleta, a correta identificação taxonômica, a multiplicação, a caracterização morfológica e molecular, a avaliação agrônômica preliminar, o monitoramento e regeneração periódica dos acessos armazenados e a disponibilização do germoplasma e de todas as informações sobre os acessos. Essas atividades são dinâmicas, de alto custo, envolvem muitas áreas de conhecimento e recursos humanos e só se justificam se os recursos genéticos forem utilizados ou se ainda houver expectativa de uso futuro (NASS, 2001).

Os BAGs de *Capsicum* são mantidos por várias instituições internacionais e nacionais. As principais coleções estão mantidas nos Estados Unidos, América do Sul, Europa e Ásia. A lista das coleções de germoplasma de *Capsicum* foi fornecida recentemente por DJIAN - CAPORALINO et al. (2007). Duas principais bases de dados internacionais: GRIN (operado pelo departamento de agricultura dos Estados Unidos) e o AVGRIS (operado pelo Centro Vegetal do Mundo em Taiwan – AVRDC) fornecem informações acessíveis de acessos de *Capsicum* referentes a dados de passaporte, caracterização, avaliação, estoque e distribuição de sementes.

Existem algumas coleções de *Capsicum* no Brasil que conservam em forma de sementes a variabilidade das espécies em bancos de germoplasma. Na Embrapa Hortaliças, no Distrito Federal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Minas Gerais e no Instituto Agrônomo de Campinas, em São Paulo são encontradas as maiores coleções brasileiras de germoplasma de *Capsicum*.

3.5.1. BAG *Capsicum* mantido na Embrapa Hortaliças

O BAG *Capsicum* mantido na Embrapa Hortaliças foi iniciado há 33 anos, consolidando ações de conservação *ex situ* de espécies do gênero *Capsicum* e de sua variabilidade genética, com ênfase nas espécies ameaçadas e nas espécies com potencial de uso econômico. Atualmente, conta com mais de quatro mil entradas, entre cultivares de polinização aberta, híbridos, populações e linhagens representados principalmente pelas cinco espécies domesticadas, dezenas de espécies semi-domesticadas e silvestres, provenientes de vários países e regiões brasileiras. Esta coleção tem servido como base genética para um amplo programa de melhoramento da Embrapa e seus parceiros, no Brasil e no exterior, que conta com mais de 30.000 linhagens e populações de espécies domesticadas e semidomesticadas e tem desenvolvido várias cultivares de diversos tipos de pimentas picantes e de baixa pungência para diferentes segmentos do mercado (CARVALHO et al., 2006; CARVALHO e BIANCHETTI, 2008; REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2012).

Nos últimos anos, a estratégia do BAG *Capsicum* tem concentrado esforços em: 1) atividades relacionadas aos recursos genéticos de *Capsicum*: enriquecimento, caracterização, conservação e organização de um banco de dados; 2) fornecimento de germoplasma com ampla variabilidade, adaptabilidade, produção, resistência a doenças e características demandadas pelo programa de melhoramento genético; 3) disponibilização da documentação de dados de caracterização e de fotos dos acessos na internet; 4) capacitação de vários estudantes de graduação e pós-graduação de universidades públicas e privadas, tais como: UnB, UENF, UFRJ, USP/ESALQ, UFG, UCB envolvidos em atividades práticas do BAG; 5) análises nutricionais (capsaicina, carotenoides, vitamina C) e de voláteis (aroma) do germoplasma; 6) automação via utilização de sistema de código de barras desenvolvido para documentação, codificação e controle de estoques de sementes do germoplasma; 7) participação de uma extensa rede de pesquisadores brasileiros envolvendo

várias instituições e que trabalham em diferentes aspectos do germoplasma *Capsicum*, desde expedições na Amazônia para determinar voláteis aromáticos em genótipos de *Capsicum* brasileiros até o desenvolvimento de novas cultivares e híbridos com características agrônomicas e industriais de interesse que depende da variabilidade disponível dos seus recursos genéticos (CARVALHO et al., 2013).

As expedições de coleta de populações domesticadas, semidomesticadas e silvestres de pimentas foram realizadas em áreas ameaçadas na Amazônia (Norte do Brasil) e Mata Atlântica (Sudeste do Brasil). Mais de 150 acessos de espécies domesticadas e semidomesticadas foram coletados na região Amazônica, e de 50 acessos de espécies silvestres foram coletadas na Mata Atlântica. Acessos de *C. chinense* coletadas na região Amazônica mostraram enorme diversidade de formato do fruto, cor, tamanho e grau de pungência. Muitos materiais apresentaram características de interesse e, portanto, têm alto potencial para uso imediato no programa de melhoramento.

3.6 Caracterização de recursos genéticos

A caracterização é a descrição e registro de características morfológicas, agrônomicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares do indivíduo. Além de proporcionar melhor conhecimento do germoplasma disponível, essencial para seu uso intenso em etapas subseqüentes, permite a identificação dos acessos duplicados, o estabelecimento de coleções nucleares e a identificação dos modos de reprodução predominantes nos acessos, bem como da ocorrência ou não de variabilidade intrínseca em acessos individuais (VALLS, 2007). O referido autor enfatiza que a caracterização e a avaliação só tem sentido quando se busca diferenças por meio de caracteres descritivos que conduzam a discriminação de diferentes acessos pertencentes à mesma espécie. Os resultados desses estudos poderão ser utilizados para verificar a necessidade ou não de introduzir novos materiais na coleção e selecionar os de interesse para o melhoramento genético (ENGLES e VISSER, 2003).

3.6.1 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica consiste nas anotações de caracteres botânicos de alta herdabilidade, facilmente visíveis ou mensuráveis, e que se expressem consistentemente em

todos os ambiente observados nos acessos, por meio de listas de descritores. Na página eletrônica da Bioversity International antigo IPGRI – International Plant Genetic Resources, vinculado ao CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) há listas completas de descritores para diversas espécies, inclusive disponibiliza a lista de descritores para *Capsicum* (http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/345_Descriptors_for_capsicum__Capsicum_spp._.pdf).

A caracterização morfológica e agronômica é normalmente a forma mais acessível e econômica para conhecer e quantificar a diversidade genética e tem sido bastante utilizada e priorizada nas coleções de germoplasma de *Capsicum* mantidas pelo setor público brasileiro: Embrapa Hortaliças (CARVALHO et al., 2003, 2013), Embrapa Clima Temperado (BUTTOW et al., 2010), Embrapa Roraima (LUZ, 2007), Instituto Agronômico de Campinas (DOMENICO, 2011), Universidade Estadual Norte Fluminense (SUDRÉ et al., 2010), Universidade Federal do Piauí (MONTEIRO et al., 2010), Universidade Federal do Amazonas (FONSECA et al., 2008), Universidade Federal da Paraíba (SAPUCAY et al., 2009), Universidade Federal de Viçosa (FINGER et al., 2010) e Universidade Federal de Roraima (RÊGO et al., 2011).

3.6.2 Caracterização molecular

Nas últimas décadas, diversas técnicas da genética molecular têm sido utilizadas em estudos de evolução, de diversidade genética inter e intra-específica, origem genética e identificação de novas variantes em diversas culturas, gerando informações importantes para apoiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta até o uso dos recursos genéticos em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007).

A caracterização molecular é uma ferramenta útil para a avaliação da diversidade genética, pois os marcadores moleculares permitem a detecção de polimorfismo de sequência de DNA entre acessos de uma coleção de germoplasma. O sítio do genoma estudado pode ser também útil em diferentes estudos genéticos como o mapeamento e isolamento de genes (FERREIRA et al., 2007).

Marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular derivado de um polimorfismo de sequência de DNA, referente a um sítio conhecido ou anônimo do genoma (FERREIRA e GRATAPALIA, 1998). Entre as vantagens dos

marcadores moleculares estão a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, ausência de influência do ambiente, possibilidade de detecção do polimorfismo em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de célula ou tecidos. Além dessas vantagens, contribuem na tomada de decisão nos processos de coleta, manejo e intercâmbio de acessos em BAG, bem como auxiliam na escolha de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (FALEIRO, 2007; FERREIRA et al., 2007).

Os métodos mais efetivos para a análise da diversidade genética de plantas são realizados por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A PCR, ou reação em cadeia através da polimerase, baseia-se na capacidade da enzima polimerase replicar sequências de DNA, a partir de um par de pequenos fragmentos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar. A enzima DNA polimerase de DNA resistente ao calor é chamada Taq polimerase (SEMAGN et al., 2006; FERREIRA et al., 2007).

Entre os marcadores que utilizam a PCR, os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) apresentarem vários aspectos positivos: herança co-dominante, detecta alto nível de polimorfismo, alta reprodutibilidade das marcas, multialélicos e aparentemente são distribuídos em todo o genoma. A análise de polimorfismos de SSR poder ser automatizada e permitir uso de técnicas de fluorescência e *multiplex* (SEMAGN et al., 2006; FERREIRA et al., 2007, FALEIRO, 2007; KALIA et al., 2011).

SSR são sequências muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em *tandem*, ou seja, uma após a outra. A amplificação de SSR via PCR é realizada através de *primers* específicos que flanqueiam os microssatélites, sendo necessário primeiramente desenvolver tais *primers* para a espécie a ser estudada (FALEIRO, 2007). A técnica de microssatélites revela polimorfismo em determinado loco devido a diferenças no número de vezes em que, por exemplo, um dinucleotídeo (AG)_n se repete naquele loco. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA et al., 2007).

De acordo com KALIA et al. (2011), o desenvolvimento de SSR é tradicionalmente feito por isolamento de bibliotecas genômicas da espécie de interesse. Contudo, mais recentemente algumas estratégias alternativas foram desenvolvidas para diminuir o tempo e aumentar a capacidade de desenvolvimento de SSR, como identificação de sequências SSR em RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), *screening* de sequências EST

(*Expressed Sequence Tags*) disponíveis em bases de dados e pela transferibilidade de marcadores de espécies relacionadas. Esta é uma vantagem adicional, porque em geral ocorre alta taxa de transferibilidade entre espécies aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família, o que reduz consideravelmente os custos e o tempo necessário para a pesquisa.

Pesquisadores do Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia durante o período de 1998 a 2001, desenvolveram 200 pares de *primers* microsatélites para *C. annuum* (BUSO et al., 2000) e a transferibilidade para espécies *C. chinense* e *C. frutescens* foi analisada durante o presente estudo.

3.6.3 Caracterização e identificação de espécies de *Capsicum*

A identificação de espécies, em alguns grupos, pode ser problemática. Entretanto, a exatidão no quesito identificação de espécies é condição primordial para qualquer trabalho científico. No caso de germoplasma mal identificado o problema agrava-se, pois gasta-se tempo e dinheiro promovendo-se a conservação de um material hipotético com reflexos negativos ou comprometedores para a pesquisa e, conseqüentemente, para o uso daquele material.

Diversos taxonomistas identificaram erroneamente espécies de *Capsicum*, notadamente aqueles que utilizaram apenas, ou principalmente, a morfologia como ferramenta. Até o final do século XIX mais de 90 nomes específicos foram associados às espécies de *Capsicum* (PICKERSGILL et al., 1979; ESHBAUGH, 1980), pois diante de tal diversidade morfológica dos frutos e do pouco conhecimento evolutivo das espécies, os taxonomistas realizaram diferentes iniciativas na tentativa de registrar todas as formas ou variações observadas.

Desde o trabalho de SMITH e HEISER JUNIOR (1957), até os dias atuais, existe consenso quanto à existência de apenas cinco espécies cultivadas (ou domesticadas) no gênero, porém não na totalidade da comunidade científica. ESHBAUGH (1993), por exemplo, não reconhece *C. frutescens*. A partir de uma rápida retrospectiva envolvendo espécies de *Capsicum*, tomamos como referência as obras fundamentais de Carolus Linnaeus (1753), onde foram originalmente descritas duas espécies, *C. annuum* L. e *C. frutescens* L.; e Carolus Linnaeus (1767) onde foram descritas outras duas, *C. baccatum* L. e *C. grossum* L. Depara-se com mais uma evidência dos problemas anteriormente

comentados, pois segundo BARAL e BOSLAND (2002), *C. grossum* é sinônimo de *C. annuum* L. var. *annuum*, ou seja, Linnaeus discriminou como espécies distintas, estados morfológicos diferentes.

Ainda em relação aos nomes, desde os trabalhos de Linnaeus (1753, 1767) até o trabalho de Ruiz e Pavon (1799), todas as espécies domesticadas haviam sido apontadas e nomeadas (*C. annuum* L., *C. pendulum* Willd ou *C. baccatum* L., *C. frutescens* L. e *C. pubescens* Ruiz & Pav.), exceto *C. chinense*. Considerando a ampla distribuição geográfica (sobrepondo-se à distribuição de *C. annuum* e *C. frutescens*) do que hoje consideramos como *C. chinense* Jacq. e a popularidade da espécie na região da América Central, mesmo antes do descobrimento (IBPGR, 1983; PICKERSGILL, 1984), é muito provável afirmar que exemplares de *C. chinense* foram, inadvertidamente, incluídos dentro dos parâmetros estabelecidos nas descrições das espécies realizadas por Linnaeus e seus antecessores. Segundo SMITH e HEISER JUNIOR (1957), materiais de *C. chinense* foram introduzidos na Europa, logo após o descobrimento das Américas. Entretanto, naquela época, devido as raras descrições, era impossível a distinção entre essa espécie e *C. annuum* e, por esse motivo, muitos materiais de *C. chinense* permaneceram sob a identificação de outras espécies (SMITH e HEISER JUNIOR, 1957; BARAL e BOSLAND, 2004), especialmente de *C. annuum* e *C. frutescens*. Uma evidência desse fato é que, em 1776, Jacquin descreveu *C. sinense* Jacquin, originalmente para nomear e discriminar o que hoje conhecemos como *C. chinense* Jacq., mas esse nome não foi considerado na época e foi somente reconhecido no trabalho de SMITH e HEISER JUNIOR (1957).

Nesse contexto, PICKERSGILL (1988) e WALSH e HOOT (2001) apontam que, como muitas espécies domesticadas possuem expressão diversificada de alguns caracteres e que, muitas vezes, existe uma sobreposição de caracteres morfológicos, torna-se muito difícil a correta identificação utilizando-se somente a caracterização com base na morfologia e, que essa tarefa exige a aplicação conjunta de outros métodos. Esse tipo de erro é comum para todas as espécies do gênero, mas especialmente freqüente para aquelas do complexo *annuum/chinense/frutescens*, com ênfase para *C. chinense* e *C. frutescens*. Diversos exemplos tiveram a identificação revista depois de passarem pela caracterização molecular (BARAL e BOSLAND, 2004; JARRET, 2008; ALBRECHT et al., 2012).

A identificação botânica correta da espécie é o primeiro passo no processo de caracterização e avaliação de qualquer acesso, dentre as etapas subsequentes e correlatas.

As dificuldades inerentes a complexa taxonomia das plantas cultivadas exigem alta especialização por parte de pelo menos um membro da equipe, principalmente quando o germoplasma de um produto envolve espécies silvestres (VALLS, 2007). A identificação de acessos ao nível taxonômico também tem sido realizada com base em marcadores moleculares RAPD e ISSR (THUL et al., 2012) e para estabelecer relações genéticas dentro e entre espécies de *Capsicum* (INCE et al., 2009, 2010).

3.6.4 Relação entre as espécies do gênero *Capsicum*

A partir da década de 1950, agora com o reconhecimento das espécies domesticadas e de alguns ancestrais silvestres, foram intensificados os estudos morfológicos, de cruzamentos e de caracterização química e de proteínas com o intuito de esclarecer afinidades e discrepâncias entre as espécies.

Uma das primeiras tentativas foi a realização de estudos com flavonóides (BALLARD et al., 1970, McLEOD et al. 1979a, 1979b, 1982, 1983), originando agrupamentos que possuíam marcadores químicos correlacionados aos morfológicos (coloração das flores brancas x púrpuras). Diante da ampliação do conhecimento de cada espécie bem como das relações entre espécies, os agrupamentos baseados na coloração das flores passaram a mostrar certa imprecisão, como por exemplo: *C. annuum*, pertencente ao agrupamento de flores brancas, apresenta algumas variedades com corolas púrpuras (WALSH e HOOT, 2001; DeWITT e BOSLAND, 2009); *C. praetermissum* Heiser & Smith, pertencente ao agrupamento de flores brancas, possui corola violeta ou púrpura (HEISER JUNIOR e SMITH, 1958); *C. eximium* Hunz., pertencente ao agrupamento de flores púrpuras, possui flores com coloração que varia de púrpura a completamente branca (ESHBAUGH, 1979, 1982). A utilização do marcador morfológico coloração das flores, na tentativa de separar grupos de espécies, passou a receber menos atenção, pois não se aplicava para a totalidade das espécies pertencentes àqueles agrupamentos.

Resultados apresentados por PICKERSGILL et al. (1979), trouxeram novos esclarecimentos aos estudos evolutivos do gênero utilizando taxonomia numérica, ao invés de destacar a coloração das flores, priorizaram outras afinidades morfológicas, sem deixar de incluir as genéticas e reprodutivas. As espécies do gênero poderiam ser arranjadas em três agrupamentos diferentes, cada qual incluindo pelo menos uma espécie domesticada somada às espécies afins. Esses agrupamentos foram denominados de complexo *annuum*,

complexo *pubescens* e grupo *baccatum*. Esses conjuntos refletiam afinidades entre espécies pertencentes ao mesmo agrupamento e as barreiras genéticas entre espécies pertencentes a agrupamentos diferentes, ou seja, linhas evolutivas distintas. Embora as barreiras reprodutivas entre os diferentes complexos e grupos possam ser quebradas, esse fato raramente ocorre em condições naturais (ESHBAUGH, 1993).

A partir do trabalho de PICKERSGILL et al. (1979), todos os trabalhos posteriores, acrescidos de estudos cromossômicos, de hibridizações e moleculares, seguiram o mesmo modelo de três linhas evolutivas independentes entre diferentes complexos de espécies relacionadas: complexo *C. annuum* (composto pela espécie *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. galapagoense*); complexo *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. tovarii*) e complexo *C. pubescens* (*C. pubescens*, *C. eximium* e *C. cardenasii*) (INCE et al, 2010; ALBRECHT et al, 2012).

A terminologia complexo traduz a reunião de espécies com extremas proximidades morfológicas e reprodutivas e a dificuldade em discriminá-las como espécies distintas. Nesse complexo (*C. annuum*/*C. chinense*/*C. frutescens*) são incluídas as espécies domesticadas, além dos prováveis ancestrais silvestres. Embora PICKERSGILL et al. (1979) consigam diferenciar, morfológicamente, as espécies domesticadas, não conseguem realizar a mesma tarefa em relação às espécies silvestres, tal a proximidade e sobreposição de caracteres entre elas. Desse modo, PICKERSGILL et al. (1979) levantam a hipótese que as três espécies (*C. annuum*/*C. chinense*/*C. frutescens*) foram domesticadas a partir de uma única espécie ancestral, que se mostrava muito variável e apresentava grande distribuição geográfica, desde o México até as terras baixas da América do Sul. Essa espécie ancestral ocorreria em pequenas populações, separadas por distâncias grandes o suficiente para impedir a troca de genes entre elas. Esse fato favoreceria a diferenciação morfológica entre as populações silvestres, de tal maneira que, alguma população silvestre localizada na MesoAmérica (México) teria dado origem ao *C. annuum* domesticado; que alguma população silvestre localizadas na Amazônia teria dado origem ao *C. chinense* domesticado; e que alguma população localizada na Amazônia e Índias Ocidentais teria dado origem ao *C. frutescens* domesticado; ou seja, uma domesticação politópica (ou alopátrica) a partir de um mesmo ancestral, resultando em três espécies domesticadas morfológica e geneticamente muito próximas. A hipótese evolutiva de PICKERSGILL et

al. (1979) foi compartilhada por alguns (McLEOD et al., 1983; AGUILAR-MELÉNDEZ et al., 2009) e refutada por outros (parcialmente por LOAIZA-FIGUEROA et al., 1989).

A própria PICKERSGILL (1971), utilizando estudos de cariótipos, já havia demonstrado o estreito relacionamento entre a espécie silvestre (*C. annuum* var. *minimum* (Miller) Heiser ou *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill) e domesticada de *C. annuum* (*C. annuum* L. var. *annuum*), sugerindo a relação de ancestralidade entre elas. Entretanto, a discriminação entre espécies, bem como o estabelecimento de relações de ancestralidade tanto para *C. chinense* e *C. frutescens* domesticados quanto para os silvestres não eram nem um pouco claros. O fato de apresentarem similaridade morfológica e genética, somado à falta de dados conclusivos capazes de discriminá-las, favoreceram a confusão taxonômica e registros freqüentes dos erros de identificação.

3.7 Coleção nuclear

Durante a década de 1970/1980, houve um grande esforço para coletar e conservar germoplasma das principais espécies cultivadas, resultando no estabelecimento de grandes coleções de germoplasma. O tamanho das coleções e a limitação de recursos financeiros contribuíram para estabelecer a defasagem entre o crescimento e o uso das coleções. De modo a contornar esse problema, a formação de coleções nucleares para as grandes coleções de germoplasma surge como uma estratégia de se concentrar recursos, esforços, se aprofundar conhecimentos e cruzar informações para promover o uso eficiente da coleção de germoplasma (CORDEIRO e ABADIE, 2007).

O plano global de ação para a conservação e utilização sustentável dos recursos fitogenéticos para agricultura e alimentação recomenda o desenvolvimento de coleção nuclear como uma das atividades necessárias para melhorar o uso dos recursos genéticos vegetais (VAN HINTUM et al, 2000).

O estabelecimento de coleção nuclear sugerido por FRANKEL (1984) e FRANKEL e BROWN (1984) consiste na organização de coleções de germoplasma com um número limitado de acessos de forma a representar a variabilidade genética da coleção base ou ativa, mantendo o máximo da divergência genética com o mínimo de repetitividade e redundância. Portanto, uma coleção nuclear pode ser uma fonte primária de distribuição de germoplasma para os melhoristas de plantas e outros programas nacionais, bem como para

avaliação em vários ambientes (FRANKEL, 1984), com o intuito de auxiliar no conhecimento sobre a diversidade e o uso potencial do germoplasma. Além disso, ao estabelecer a coleção nuclear é possível reduzir o custo dos experimentos de avaliação, principalmente aqueles de caracterização agrônômica que demandam grande área de avaliação com repetições e em diferentes locais para os estudos de interação genótipo x ambiente.

A coleção nuclear não tem como objetivo a substituição de uma coleção base ou coleção ativa, nem mesmo de uma coleção de trabalho muito especializada (FALEIRO, 2007). A coleção nuclear é uma estratégia que possibilita priorizar e concentrar as atividades de caracterização e avaliação dessa coleção, de modo a formar uma base de informação mais completa sobre esse conjunto de acessos e assim permitir o uso do germoplasma (CORDEIRO e ABADIE, 2007). Os resultados desses estudos poderão ser utilizados para verificar a necessidade ou não de introduzir mais materiais na coleção e selecionar os de interesse para o melhoramento genético (ENGLES e VISSER, 2003).

De acordo com BROWN e SPILLANE (1999) o conceito de uma coleção nuclear deve compreender os quatro elementos básicos: a coleção de germoplasma é uma grande coleção (do ponto de vista de manejo e uso) com integridade taxonômica; a coleção nuclear dessa grande coleção tem um tamanho restrito; a coleção nuclear é uma amostra representativa dessa coleção; e a coleção nuclear é diversa.

O desenvolvimento de uma coleção nuclear não é um processo simples e rápido, por levar em consideração uma série de informações referentes ao germoplasma armazenado. Existe muita discussão sobre quais são os descritores adequados para serem usados no desenvolvimento de uma coleção nuclear: morfológicos, genéticos, moleculares e ecogeográficos.

Segundo FERREIRA et al. (2007), as coleções de germoplasma atuais deveriam ser caracterizadas molecularmente em um primeiro momento, utilizando os procedimentos de análise automatizada em escala e oferecidos por marcadores moleculares, como a genotipagem de locos microssatélites em sequenciador automáticos de DNA. Com base na análise de dados, coleções nucleares poderiam ser estabelecidas e avaliadas com outros descritores agrônômicos e morfológicos, incluindo bioensaios bioquímicos e fisiológicos.

Existem muitas abordagens para estabelecer uma coleção nuclear. Em geral, estas abordagens têm três etapas. O primeiro passo é descrever a diversidade genética de toda a

coleção. Vários descritores podem ser utilizado eventualmente em combinação (por exemplo, dados do passaporte, origem geográfica, características morfológicas e fenotípicas e bioquímicas e marcadores moleculares). O segundo passo consiste em analisar a estrutura da diversidade genética expressa pelos descritores diferentes e calcular a distância genética entre os acessos utilizando métodos de agrupamento. Desse modo, a coleção inicial é estratificada em grupo geneticamente homogêneos. E o último passo, as amostras de acessos individuais são selecionado a partir de toda a coleção de modo a formar a coleção núcleo (BALFOURIER et al., 2007).

Na composição da coleção nuclear, cada acesso vai representar a variabilidade genética de outros acessos que ficaram no mesmo grupo de similaridade. Feita a caracterização detalhada da coleção nuclear, caso seja verificado o potencial de determinado acesso, esse potencial pode ser extraoplado para todos os acessos do mesmo grupo de similaridade, o que pode ser confirmado por meio de caracterização detalhada desses acessos (FALEIRO, 2007).

O desenvolvimento de uma coleção nuclear é um exercício de amostragem, que tenta assegurar a conservação dos alelos presentes na coleção base (CORDEIRO e ABADIE, 2007). Diferentes tipos de características e estratégias de amostragem têm sido desenvolvidos para o estabelecimento de coleções nucleares. Procedimentos de estabelecimento e amostragens são disponíveis em VAN HINTUM et al. (2000), BROWN e SPILLANE (1999), VASCONCELOS et al. (2007).

Comumente é estabelecido que uma amostragem de 10% dos acessos fornece um tamanho básico para uma coleção nuclear, para captar entre eles o máximo da diversidade disponível da coleção inteira. Esta generalização é proposta por BROWN (1989), que estimou uma amostragem de 10% para reter no mínimo 70% dos alelos presentes na coleção inteira.

A utilização de amostragens menores, em apenas 1% dos acessos da coleção inicial, nomeadas mini coleções nucleares, tem sido empregada para algumas culturas como: grão de bico (211 acessos; UPADHYAYA e ORTIZ, 2001); sorgo (242 acessos; UPADHYAYA et al., 2009). O tamanho reduzido dessas coleções tem fornecido oportunidades para a sua avaliação eficiente e econômica em vários ambientes e à identificação de novas fontes para variação morfoagronômica, qualidade, tolerância ao estresse abiótico e biótico em várias culturas (UPADHYAYA et al., 2010).

A amostragem de uma coleção de germoplasma para estabelecer uma coleção nuclear requer um esforço integrado envolvendo curadores, melhoristas, geneticista e estatísticos. Definição sobre o tamanho da coleção nuclear de modo a facilitar o seu uso e a escolha de critérios de classificação para os quais os acessos da coleção base tenham informação, são essenciais (ABADIE et al., 2005).

Em relação à validação de coleções nucleares, FALEIRO (2007) relata que o princípio é analisar a variabilidade da coleção base e da coleção nuclear e verificar a porcentagem da variabilidade presente na coleção nuclear. Os cálculos das distâncias entre os acessos da coleção base e a coleção nuclear podem ser realizados com base no polimorfismo do DNA, cálculo da riqueza e frequência alélica baseados em marcadores multialélicos e co-dominantes.

A formação de coleção nuclear tem sido desenvolvida em BAG mundiais para várias espécies vegetais como: arroz (LI et al., 2002), ervilha (LÁZARO et al., 2006), cana-de-açúcar (AMALRAJ et al., 2006), trigo (BALFOURIER et al., 2007), milho (BHATTACHARJEE et al., 2007), sorgo (UPADHYAYA et al., 2009), incluindo *Capsicum* (ZEWDIE et al., 2004; NICOLAI et al., 2013). No Brasil, alguns esforços foram efetuados para a estruturação das coleções nucleares de mandioca (CORDEIRO et al., 1995), milho (NETTO et al., 2004), arroz (ABADIE et al., 2005), soja (OLIVEIRA, 2007) e abóbora (RAMOS, 2003).

Em *Capsicum*, apenas um estabelecimento de coleção nuclear tinha sido publicado (ZEWDIE et al., 2004) até 2013. Essa proposta foi realizada para estabelecer coleções nucleares das espécies de *C. annuum*, *C. baccatum* e *C. chinense* representativas da coleção mantida pela Unidade de Conservação de Recursos Genéticos de Plantas do Sul, Griffin, GA, USA, com base em informações fenotípicas e análise de cluster.

Recentemente, NICOLAI et al. (2013) estabeleceram várias coleções nucleares de *C. annuum* a partir da coleção mantida pelo Instituto Nacional de Pesquisa Agropecuária (INRA), na França, utilizando 28 marcadores moleculares microssatélites a fim de maximizar a diversidade genética, mas incluindo também 6 características fenotípicas de flores e frutos para otimizar a análise com características hortícolas. As coleções nucleares variaram de 8, 16, 32, 64 e 128 acessos representando 37 a 90% da diversidade genética de *C. annuum* e seus parentes selvagens (var. *glabriusculum*). A utilização da estratégia algoritmo M (Maximização) em que marcadores genéticos são usados maximizando a

riqueza de alelos em cada locus, permitiram a seleção dessas amostras nucleares menores e ao mesmo tempo maximizaram a diversidade genética. As coleções nucleares menores favorecem a análise para o seqüenciamento do genoma e análises de marcadores SNPs, uma vez que *Capsicum* possui um genoma grande de 3.3 Gb, o que encarece o seqüenciamento completo. Uma coleção nuclear grande com 332 acessos de *C. annuum*, capturando 97 % da diversidade genética e fenotípica também foi estabelecida para estudos de associação genética.

A organização da coleção de germoplasma em torno de coleções nucleares tem sido tópico de interesse recente para o programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa, como estratégia para melhorar a conservação e o uso desses recursos genéticos. Nesse contexto, o trabalho de tese de doutorado concluído por SILVA (2013) selecionou descritores mínimos para caracterização de acessos do BAG *Capsicum* spp. da Embrapa Hortaliças, caracterizado principalmente com base em dados de natureza qualitativa. Desta coleção, foram considerados 893 acessos (420 *C. annuum*, 106 *C. baccatum*, 307 *C. chinense* e 60 *C. frutescens*), que estavam caracterizados segundo 56 descritores morfológicos. Foram propostas listas de descritores mínimos para a coleção completa e para as subcoleções relacionadas às quatro espécies, que possibilitam reduções de quase 50% no número de descritores. A lista dos 30 descritores mínimos de *C. frutescens* propostos por esse autor foi validada no presente estudo para avaliar a variabilidade genética dos 115 acessos que compõem a coleção de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças.

3.8 População base

A seleção recorrente é um processo cíclico de melhoramento, que envolve a obtenção dos melhores indivíduos ou famílias, que deverão ser avaliados, selecionados e intercruzados, visando, desse modo, aumentar a frequência de alelos favoráveis e, por consequência, melhorar a expressão fenotípica da característica sob seleção.

É um processo extensivamente utilizado em plantas alógamas. Entretanto, nas últimas décadas o seu emprego tem sido ampliado em várias espécies autóгамas. Um dos motivos é que a maioria das características que os melhoristas trabalham são controladas por vários genes e praticamente não existe uma linhagem que concentre todos os alelos favoráveis. A seleção recorrente é um modo eficiente de concentrar o maior número de

alelos favoráveis em uma linhagem, por meio de ciclos sucessivos de seleção e recombinação das melhores famílias (RAMALHO et al., 2001).

A condução de um programa de seleção recorrente envolve três etapas: a formação de uma população base, a avaliação e a seleção das famílias e o inter cruzamento das melhores. Todas etapas possuem inúmeras alternativas, cuja decisão depende de uma série de fatores.

Na formação da população base é necessário que os genitores envolvidos tenham o melhor desempenho possível para a(s) característica(s) sob seleção. Além disso, devem apresentar a maior diversidade genética possível, pois assim a população base irá associar média alta e alto nível de variabilidade genética, que são condições indispensáveis para o sucesso com a seleção. Os melhoristas devem dedicar grande atenção tanto na escolha quanto no número de genitores, pois o programa de seleção recorrente é muito demorado. Em princípio de 10 a 20 genitores é um número satisfatório (RAMALHO et al., 2001). A identificação de genótipos superiores, que atendam aos interesses do mercado em relação a uma série de atributos agronômicos é uma etapa importantíssima para a constituição da população base e reflete no sucesso da seleção recorrente ao longo do tempo.

Após a escolha dos genitores, deve ser definido como esses indivíduos serão cruzados. Há várias opções como: cruzamentos múltiplos, inter cruzamento utilizando a macho-esterilidade ou combinação dos pais e famílias recombinantes. A seleção na população base pode ser fenotípica (massal ou utilizando algum tipo de família). A seleção fenotípica é aconselhável quando a característica apresenta alta herdabilidade e pode ser selecionada visualmente. Para aquelas com menor herdabilidade, a seleção deve ser efetuada a partir da avaliação de famílias em experimentos com repetições como: famílias de meios-irmãos, irmão germanos ou endógamas. Escolhida as melhores famílias (ou indivíduos), essas deverão ser inter cruzadas para obtenção do próximo ciclo, podendo ser adotado o inter cruzamento artificial ou a utilização de macho-esterilidade (RAMALHO et al., 2001).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, T.; CORDEIRO, C. M. T.; FONSECA, J. R.; FREIRE, M. S.; ALVES, R. B. N.; BURLE, M. L.; BRONDANI, C.; RANGEL, P. H. N.; CASTRO, E. M.; SILVA, H. T.; FREIRE, M.; ZIMMERMANN, F.; MAGALHÃES, J. R. Construção de uma coleção nuclear de arroz para o Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 40, p. 129-136, 2005.

ALBRECHT, E.; ZHANG, D.; SAFTNER, R. A.; STOMMEL, J. R. Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 517-538, 2012.

AGUILAR-MELÉNDEZ, A.; MORRELL, P. L.; ROOSE, M. L.; KIM, S. C. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 6, p. 1190-1202, 2009.

AMALRAJ, A.V.; BALAKRISHNAN, R.; JEBADHAS, A. W.; BALASUNDARAM, N. Constituting a core collection of *Saccharum spontaneum* L. and comparison of three stratified random sampling procedures. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 1563-1572, 2006.

BALFOURIER, F.; ROUSSEL, V.; STRELCHENKO, P.; EXBRAYAT-VINSON, F.; SOURDILLE, P.; BOUTET, G.; KOENIG, J.; RAVEL, C.; MITROFANOVA, O.; BECKERT, M.; CHARME, G. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 1265-1275, 2007.

BALLARD, R. E.; MCCLURE, J. W.; ESHBAUGH, W. H.; WILSON, K. G. A chemosystematic study of selected taxa of *Capsicum*. **American Journal of Botany**, v. 57, n. 2, p. 225-233, 1970.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA markers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 127, n. 3, p. 316-324, 2002.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F.; NASCIMENTO FILHO, H. R.; MADURO, C. B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. Espécies domesticadas. **Acta Amazon**, v. 32, p. 177-192, 2002.

BARBOZA, G. E; BIANCHETTI, L. B. Three new species of *Capsicum* (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil. **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 863-871, 2005.

BHATTACHARJEE, R.; KHAIRWAL, I. S.; BRAMEL, P. J.; REDDY, K. N. Establishment of a pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] core collection based on geographical distribution and quantitative traits. **Euphytica**, v. 155, p. 35-45, 2007.

BIANCHETTI L. B. **Aspectos Morfológicos, Ecológicos e Biogeográficos de Dez Táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil**. 1996. 174 f. Tese (Mestrado em Botânica). Universidade de Brasília/UnB, Brasília.

BIANCHETTI, L. B.; CARVALHO, S. I. C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões de gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 355-385.

BROWN, A. H. D Core collections: a practical approach to genetic resources management. **Genome**, v. 31, p. 818-824, 1989.

BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C. Implementing core collections: principles, procedures, progress, problems and promise. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Core Collections for Today and Tomorrow**. Rome: IPGRI, 1999. p 1-9.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida**. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

BÜTTOW, M. V.; BARBIERI, R. L.; NEITZKE, R. S.; HEIDEN, G.; CARVALHO, F. I. F. de. Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões de Embrapa Clima Temperado. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1264-1269, 2010.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 49p.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 27p. (Embrapa Hortaliças, Documentos 94).

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. ; RIBEIRO, C. S. C. ; REIFSCHNEIDER, F. J. B. . *Capsicum* germplasm bank maintained by Embrapa Vegetables, Brazil.. In: **XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 2013**. Turim. Breakthroughs in the Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Turim: Eucarpia. p. 199-204, 2013.

CASTAÑÓN-NÁJERA G.; LATOURNERIE-MORENO L.; MENDOZA-ELOS, M.; VARGAS-LÓPEZ A.; CÁRDENAS-MORALES, H. Colección y caracterización de chile (*Capsicum* spp) en Tabasco, México. **International Journal of Experimental Botany**, v. 77, p. 189-202, 2008.

CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE GOIÁS S/A. **Análise conjuntural 2012**. Goiânia, GO: CEASA-GO, 2012. 215p.

CORDEIRO, C. M. T.; ABADIE, T. Coleções Nucleares. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 575-604.

CORDEIRO, C. M. T.; MORALES, E. A.; FERREIRA, P.; ROCHA, D. M. S.; COSTA, I. R. S.; VALOIS, A. C. C., SILVA, S. Towards a Brazilian core collection of cassava. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; VAN HINTUM, T. J. L.; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. United Kingdom: John Wiley & Sons, 1995. p. 155-168.

CRISÓSTOMO, J. R. **Cultivo de pimenta tabasco no Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria, 2006. 40p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Sistema de Produção, 3).

DeWITT, D.; BOSLAND, P. W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.

DJIAN-CAPORALINO, C.; LEFEBVRE, V.; SAGE-DAUBE`ZE, A-M.; PALLOIX, A. *Capsicum*. In: SINGH, R. J. (Ed.) **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement: vegetable crops**, vol 3. CRC Press., Boca Raton, FL, USA, 2007. p. 185-243.

DOMENICO, C. I. **Caracterização agrônômica e pungência em pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2011. 38 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção Agrícola) - Pós-Graduação – IAC. 2011.

DUARTE, R. B. A. **Histórias de sucesso: agronegócios – horticultura**. Brasília: Sebrae, 2008. Disponível em: <<http://www.casosdesucesso.sebrae.com.br/include/arquivo.aspx/349.pdf>>. Acesso em 10 de outubro de 2011.

ENGLES, J. M. M. Genebank management: an essential activity to link conservation and plant breeding. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 129, p. 17–24, 2002.

ENGLES, J. M. M.; VISSER, B. Genebank management.procedures In: ENGLES, J. M. M.; VISSER, B. (Ed.). **A guide to effective management of germoplasm collections**. Rome: IPGRI, 2003. p. 60-79. (IPGRI Handbooks for Genebanks , 6).

ESHBAUGH, W. H. Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. Reprint from: **National Geographic Society Research Reports**, 1970. Projects, p: 143-162, 1979.

ESHBAUGH, W. H. The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). **Phytologia**, v. 47, p. 153-166. 1980.

ESHBAUGH, W. H. Variation and evolution in *Capsicum eximium* (Solanaceae). **Baileya**, v. 21, n. 4: 193-198, 1982.

ESHBAUGH, W. H. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **New crops**. Wiley, New York. 1993. p. 132-139.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

FINGER, F. L.; LANNES, S. D.; SCHUELTER, A. R.; DOEGE, J.; COMERLATO, A. P.; GONÇALVES, L. S. A.; FERREIRA, F. R. A.; CLOVIS, L. R. ; SCAPIM, C. A. Genetic diversity of *Capsicum chinensis* (Solanaceae) accessions based on molecular markers and morphological and agronomic traits. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p. 1852-1864, 2010.

FONSECA, R. M.; LOPES, R.; BARROS, W. S.; LOPES, M. T. G.; FERREIRA, F. M. Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro – Amazonas. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, p. 187-194, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. **Agricultural production**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> Acesso em: 13 janeiro 2014a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. **Agricultural trade**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> Acesso em: 13 de janeiro 2014b

FRANKEL O. H. Genetic perspective of germplasm conservation. IN: ARBER, W. K.; LLIMENSEE, K.; PEACOCK, W. J.; STARLINGER, P. (Ed.). **Genetic manipulation impact on Man and Society**. Cambridge University Press, Cambridge, 1984. p. 161-170.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant genetic resources today: a critical reappraisal. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.) **Crop genetic resources: conservation and evolution**. London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 249-257.

GOEDERT, C. O. Histórico e Avanços em Recursos Genéticos no Brasil. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 23-59.

HEISER JUNIOR, C. B.; SMITH, P. G. New species of *Capsicum* from South America. **Brittonia**, v. 10, n. 4, p. 194-201, 1958.

INCE, A. G.; KARACA, M.; ONUS, A. N. Development and utilization of diagnostic DAMP-PCR markers for *Capsicum* accessions. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 56, p. 211-221, 2009.

INCE, A. G.; KARACA, M.; ONUS, A. N. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. **Biochemical Genetics**, v. 48; p. 83-95, 2010.

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

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for Capsicum (Capsicum spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

JARRET, R. L.; BALDWIN, E.; PERKINS, B.; BUSHWAY, R. GUTHRIE, K. Diversity of fruit quality characteristics in *Capsicum frutescens*. **HortScience**, v. 42, n. 1, p. 16-19, 2007.

JARRET, R. L. Variation for fruit morphological characteristics in a *Capsicum chinense* Jacq. germplasm collection. **HortScience**, v. 43, n.6, p.1694-1697, 2008.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309-334, 2011.

LÁZARO, A.; AGUINAGALDE, I.; Genetic variation among Spanish pea landraces revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: its application to establish a core collection. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, p. 53-61, 2006.

LI, Z. C.; ZHANG, H. L.; ZENG, Y. W.; YAN, Z. Y.; SHEN, S. Q.; SUN, C. Q.; WANG, X. K. Studies on sampling schemes for the establishment of core collection of rice landraces in Yunnan, China. **Genetic Resources and Crop Evolution** 49, p. 67-74, 2002.

LOAIZA-FIGUEROA, F.; RITLAND, K.; CANCINO, J. A. L.; TANKSLEY, S. D.. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. **Plant Systematic Evolution**, v. 165, p. 159-188, 1989.

LUZ, F. J. F. **Caracterizações morfológica e moleculares de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

McLEOD, M. J.; ESHBAUGH, W. H.; GUTTMAN, S. I. A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum* – Solanaceae. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.), **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. Academic Press, New York. 1979a. p. 701-713.

McLEOD, M. J.; ESHBAUGH, W. H.; GUTTMAN, S. I. An electrophoretic study of *Capsicum* (Solanaceae): the purple flowered taxa. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 106, n. 4, p. 326-333, 1979b.

McLEOD, M. J.; GUTTMAN, S. I.; ESHBAUGH, W.H. Early evolution of Chili peppers (*Capsicum*). **Economic Botany**, v. 36, n. 4, p. 361-368, 1982.

McLEOD, M. J.; GUTTMAN, S. I.; ESHBAUGH, W. H.; RAYLE, R. E. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). **Evolution**, v. 37, n. 3, p. 562-574, 1983.

MONGKOLPORN, O.; TAYLOR, P. W. J. *Capsicum*. In: KOLE, C. (Ed.) **Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p. 43-57.

MONTEIRO, E. R.; BASTOS, E. M.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; NUNES, J. A. R. Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 288-293, 2010.

MOSCONE, E. A.; SCALDAFERRO, M. A.; GRABIELE M.; CECCHINI, N. M.; SANCHEZ GARCIA, Y.; JARRET, R.; DAVINA J. R.; DUCASSE, D. A.; BARBOZA, G. E.; EHRENDORFER, F. The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. **Acta Horticulturae**, v. 745, p. 137-170, 2007.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALLS, A. C. C.; MELO, I. C. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

NASS L. L., SIGRIAST M. S., RIBEIRO C. S. DA C., REIFSCHNEIDER F. J. B. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, S2, p. 75-86, 2012 (Special edition).

NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, A. C.; ANDRADE, R. V. Avaliação agronômica e molecular de acessos da coleção núcleo de milho, subgrupo endosperma duro. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 1, p. 92-107, 2004.

NICOLAI, M.; CANTET, M.; LEFEBVRE, V. ; SAGE-PALLOIX, A. M.; PALLOIX, M. Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity

by human selection of cultivar types. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 2375-2390, 2013.

NUEZ F.; ORTEGA, R. G.; COSTA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996. 607p.

OLIVEIRA, M. F.; GERALDI, I. O.; CRUZ, C. D.; TOLEDO, J. F. F. Avaliação de cinco estratégias para a obtenção da coleção nuclear de soja (*Glycine max* L. Merrill). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 4., São Lourenço, 2007. **Anais...** São Lourenço: UFLA, 2007. CD-ROM.

ORTIZ, R.; DE LA FLOR, F. D.; ALVORADO, G.; CROSSA, J. Classifying vegetable genetic resources - A case study with domesticated *Capsicum* spp. **Scientia horticultrae**, v. 126, p. 186-191, 2010.

PERRY, L.; DICKAU, R.; ZARRILLO, S.; HOLST, I.; PEARSALL, D. M.; PIPERNO, D. R.; BERMAN, M. J.; COOKE, R. G.; RADEMAKER, K.; RANERE, A. J.; RAYMOND, J. S.; SANDWEISS, D. H.; SCARAMELLI, F.; TARBLE, K.; ZEIDLER, J. A. Starch Fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. **Sciences**, v. 315, p. 986-988, 2007.

PICKERSGILL, B. The archaeological record of chili peppers (*Capsicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. **American Antiquity**, v. 34, n. 1, p. 54-61, 1969a.

PICKERSGILL, B. The domestication of chili peppers. In: UCKO, P. J.; DIMBLEBY, G. W. (Ed.), **The domestication and exploitation of plants and animals**. Duckworth, London. 1969b. p.443-450

PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). **Evolution**, v. 25, n. 4, p. 683-691, 1971.

PICKERSGILL, B. Migration of chili peppers, *Capsicum* spp, in the Americas. In: STONES, D. (Ed.). **Pre-Columbian Plant Migration**. Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology Vol.76. Cambridge: Harward University Press, 1984. p. 106-123.

PICKERSGILL, B. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. **Biologisches Zentrablatt**, v. 107, p. 381-389, 1988.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, p. 925-940, 2007.

PICKERSGILL, B.; HEISER, C. B.; McNEILL, J. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.). **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, 1979. p. 679-700.

PINTO, C. M. F.; MARTINS, R. C. Agronegócio Pimenta em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2 (Suplemento - CD ROM), 2011.

RAMOS, S. R. R. **Divergência genética baseada em marcadores moleculares AFLP e indicação de coleção nuclear de *Cucurbita moschata* para o Nordeste do Brasil**. 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; SANTOS, J. B. Melhoramento de espécies autógamas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação-MT, 2001. pp.201-230.

RÊGO E. R; RÊGO M. M.; MATOS, I. W. F.; BARBOSA, L. A. Morphological and chemical characterization of fruits of *Capsicum* spp. accessions. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 364-371, 2011.

REIFSCHEIDER, F. J. B. (Org.). ***Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil***. Brasília, DF: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças, 2000. 133p.

REIFSCHEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Brazilian *Capsicums*: Early History and Future Prospects. **Chronica Horticulturae**, v. 49, n. 3, p. 20-21, 2009.

REIFSCHEIDER F. J. B., RIBEIRO C. S. DA C. Reviewing 30 years of *Capsicum* breeding at Embrapa Vegetables, Brazil. In: **Book of Abstracts**, International Pepper Conference, 21, p. 43, 2012.

REIFSCHEIDER, F. J. B. ; RIBEIRO, C. S. C. ; CARVALHO, S. I. C. Development of new *Capsicum* cultivars at Embrapa (Brazil). In: **XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 2013**. Turim, Itália. Breakthroughs in the Genetics and Breeding of capsicum and Eggplant. Turim: Eucarpia, p. 71-77, 2013.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008a. 200p.

RIBEIRO, C. S. C. ; CARVALHO, S. I. C. ; LOPES, C. A. ; REIFSCHEIDER, F. J. B.. Pimentões e pimentas do gênero *Capsicum*. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. (Org.). **Agricultura Tropical - Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008b, v. 1, p. 595-608.

RIBEIRO, C. S. C.; REIFSCHEIDER, F. J. B. ; CARVALHO, S. I. C. New Jalapeño-type cultivars developed by Embrapa, Brazil. In: **XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, 2013**. Turim. Breakthroughs in the Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Turim: Eucarpia, p. 435-437, 2013.

SAPUCAY, M. J. L. C.; ARAÚJO E. R.; RÊGO E. R.; RÊGO M. M. Diversidade genética, importância relativa e correlação de caracteres quantitativos em pimenteiras. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2 (Suplemento - CD Rom), 2009.

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M. N. An overview of molecular marker methods for plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 25, 2006. p. 2540-2568.

SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR., C.B. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 84, n. 6, p. 413-420, 1957.

SILVA, V. P. S.; BARBOSA, K. C.; ALMEIDA, G. T. S.; RODRIGUES, A. J. A relação agricultura – indústria no município de Lagarto (SE): O caso da pimenta malagueta. **Cadernos de Graduação - Ciências Humanas e Sociais**, v. 11, n. 11, 2010.

SILVA, W. C. J.; CARVALHO S. I. C.; DUARTE, J. B. Identification of minimum descriptors for characterization of *Capsicum* spp. germplasm. **Horticultura Brasileira**. v. 31, p. 190-202, 2013.

SUDRÉ, C. P.; GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES R., AMARAL JÚNIOR A. T.; RIVA-SOUZA, E. M.; BENTO, C. dos S. Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 283-294, 2010.

THUL, S. T.; DAROKAR, M. P.; SHASANY, A. K.; KHANUJA, S. P. S. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. **Molecular Biotechnology**, v. 51, p. 137-147, 2012.

UPADHYAYA, H.D; ORITZ, R.. A mini core subset for capturing diversity and promoting utilization of chickpea genetic resources in crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 1292-1298, 2001.

UPADHYAYA, H. D.; PUNDIR, R. P. S.; DWIVEDI, S. L.; GOWDA, C. L. L.; REDDY, V. G.; SINGH, S. Developing a mini core collection of sorghum for diversified utilization of germplasm. **Crop Science**, v. 49, p. 1769-1780, 2009.

UPADHYAYA, H.; YADAV, D.; DRONAVALLI, N.; GOWDA, C.; SINGH, S. Mini core germplasm collections for infusing genetic diversity in plant breeding programs. **Electronic Journal of Plant Breeding**, v. 1, n. 4, p. 1294-1309, 2010.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

VALOIS, A. C. C. A biodiversidade e os recursos genéticos. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed). **Recursos Genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. (on line). Disponível em: <http://www.cpatna.embrapa.br>. Acesso em: 24 maio 2013.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. (Orgs); GASPAROTTO, C. R.; TOGAWA, R. C.; WERNECK, A. A. (Cols.) **Glossário de Recursos Genéticos Vegetais**. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/recgen/glossario>. Acesso em: 23 jun. 2010.

VAN HINTUM, T. J. L.; BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C.; HODGKIN, T. **Core collections of plant genetic resources**. Roma: IPGRI, 2000, 48p.

VASCONCELOS, E. S.; CRUZ, C.D.; Bhering, L. L.; FERREIRA, A. Estratégias de amostragem e estabelecimento de coleções nucleares. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 4, p.507-514, 2007.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 6, p. 1409-1418, 2001.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. Use of *Capsicum frutescens* L. by the Indigenous Peoples of Taiwan and the Batanes Islands. **Economic Botany**, v. 63, n. 1, p. 43-59, 2009.

ZEWDIE, Y.; TONG, N.; BOSLAND, P. Establishing a core collection of *Capsicum* using a cluster analysis with enlightened selection of accessions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 147-151, 2004.

**1. RELAÇÕES GENÉTICAS E MORFOLÓGICAS ENTRE FORMAS
SILVESTRES E DOMESTICADAS DE PIMENTAS
(*Capsicum frutescens* E *C. chinense*)**

**CHAPTER I. MORPHOLOGICAL AND GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN
WILD AND DOMESTICATED FORMS OF PEPPERS (*Capsicum frutescens* and *C.
chinense*)**

RESUMO

As pimentas *Capsicum chinense* e *C. frutescens* fazem parte da biodiversidade brasileira, e a Bacia Amazônica é a área de maior diversidade para essas espécies, especialmente para a primeira. No entanto, pouco se sabe sobre sua história evolutiva. Com o objetivo de identificar genótipos com características silvestres e domesticadas, 30 acessos do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças foram caracterizados por descritores morfológicos e marcadores moleculares ISSR. Dos 72 *primers* testados, 42% apresentaram amplificação e produziram 136 amplicons com alguns dos *primers*, nomeadamente i7Pv e i57Zm, permitindo a identificação de cada espécie. Os *primers* ISSR também revelaram polimorfismos dentro das espécies, especialmente entre as formas domesticadas e silvestres. Quatro acessos silvestres coletados na região Amazônica (CNPH 4315, CNPH 4325B, CNPH 4337 e CNPH 4372) popularmente conhecidos como olho-de-peixe ou olho-de-periquito foram molecularmente classificados como *C. chinense* e apresentaram frutos com características típicas de espécie silvestre: posição ereta, formato arredondado a campanulado, tamanho pequeno (1,0 cm de comprimento e 0,8 cm de largura), peso médio de 0,2 g, de cor vermelha escura quando maduro, fácil destacamento do cálice e presença de constrição anelar entre o cálice e o pedicelo (discriminativo de *C. chinense*). A forma silvestre CNPH 4353 conhecida como malaguêtinha foi morfológica e molecularmente classificada como *C. frutescens*, demonstrando uma morfologia mais preservada em *C. frutescens* do que em *C. chinense*. Foi encontrada uma correlação significativa entre a caracterização morfológica e molecular, e a combinação das duas análises foi eficaz na identificação e na classificação das formas silvestres e domesticadas, contribuindo para estudos evolutivos no gênero.

Palavras-chaves: caracterização, diversidade, banco de germoplasma, domesticação, ISSR.

ABSTRACT

Capsicum chinense and *C. frutescens* peppers are part of the Brazilian biodiversity, and the Amazon Basin is the area of greatest diversity for them, especially for that former species. Nevertheless, little is known about their evolutionary history. Aiming to identify genotypes with wild and domesticated characteristics, 30 accessions of the germplasm bank of Embrapa Vegetables were characterized using morphological descriptors and ISSR molecular markers. Of the 72 primers tested, 42% showed amplification and produced 136 amplicons with some of the primers, namely i7Pv and i57Zm, allowing the identification of each species. ISSR also revealed polymorphisms within a species, especially between domesticated and wild forms. Four wild accessions collected in the Amazon region (CNPB 4315, CNPB 4372, CNPB 4337 and CNPB 4325B) popularly known as olho-de-peixe or olho-de periquito were molecularly classified as *C. chinense* and showed fruit with similar characteristics as the wild species: upright position, rounded to campanulate shape, small size (1.0 cm long and 0.8 cm wide), average weight of 0.2 g, dark-red color when ripe, easy detachment of calyx and presence of calyx annular constriction (discriminative of *C. chinense*). The wild form CNPB 4353 known as malaguétinha was morphologically and molecularly classified as *C. frutescens*, demonstrating a more preserved morphology in *C. frutescens* than in *C. chinense*. A significant correlation was found between morphological and molecular characterization, and the combination of the two analyses was effective in identifying and classifying the wild forms and contributing to evolutionary studies in the genus.

Key words: characterization, diversity, germplasm bank, domestication, ISSR.

1.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* compreende cerca de 35 táxons (espécies e variedades) que, classificados em categorias de acordo com o nível de domesticação, correspondem a cinco táxons domesticados e trinta silvestres (semidomesticados e silvestres) (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005).

Os ancestrais silvestres de três espécies (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. pubescens*) já foram identificados, embora a história evolutiva das espécies domesticadas de *Capsicum* não tenha sido totalmente consolidada. Esses ancestrais silvestres apresentam frutos eretos, brilhantes, pequenos, ovalados, vermelhos, decíduos e picantes e sua área de ocorrência natural está contida na área de distribuição da respectiva espécie domesticada. Por outro lado, pouco se sabe sobre a história evolutiva de *C. frutescens* e *C. chinense*. Alguns autores comentam sobre a dificuldade em determinar as formas silvestres dessas espécies. WALSH e HOOT (2001) ainda acreditam que não exista forma silvestre verdadeira de *C. chinense*.

C. annuum, *C. chinense* e *C. frutescens* têm sido tradicionalmente tratada como um complexo, devido à sua alta proximidade morfológica e genética. Estas espécies, muitas vezes, receberam um tratamento indiferenciado, inclusive na identificação do possível ancestral imediato (PICKERSGILL, 1988). Cada uma dessas três espécies, no entanto, possui pelo menos uma característica exclusiva que permite a sua clara distinção. Neste sentido, as mesmas características devem ser observadas no ancestral silvestre, assim como na forma domesticada. Por exemplo, *C. annuum* var. *annuum* domesticado e seu ancestral silvestre (*C. annuum* var. *glabriusculum*) apresentam distintivamente ocorrência de apenas uma flor por ramificação e corola sem a presença de manchas. Do mesmo modo, o provável ancestral silvestre de *C. chinense* domesticado deve apresentar constrição na base do cálice (SMITH e HEISER JUNIOR, 1951), uma característica discriminativa desta espécie.

Dos cinco táxons domesticados, *C. chinense* parece ser o que possui menos informações associadas especialmente quanto à definição do centro de origem e provável progenitor, embora seja evidente que a região Amazônica (América do Sul) seja o centro de diversidade dessa espécie (ESHBAUGH, 1993). Entretanto, descobertas recentes podem alterar esse quadro, pois os primeiros exemplares de *C. chinense* comportando as características compartilhadas pelas espécies silvestres do gênero, inclusive com a presença da constrição na base do cálice, foram identificadas em Roraima (Brasil) por BARBOSA et

al. (2002). Além disso, no extremo norte da Amazônica brasileira, os povos indígenas utilizam pimentas *C. chinense* com características silvestres, que nascem naturalmente em serras ou pé-de-serra das regiões do centro-norte e nordeste de Roraima e provavelmente foram dispersas por aves. Para os indígenas, essas pimentas são plantadas em suas roças pela crença mística do “*Curupira*” ou “*Atai-tai*” e recebem o nome simbólico de “*Pimenta do Curupira*” ou simplesmente “*pimi’ró*” (pimenta pequena, na língua Macuxi) (NASCIMENTO FILHO et al., 2007).

As formas domesticadas de *C. chinense* destacam-se pela ampla variabilidade morfológica, expressa na diversidade de formas, tamanhos e cores dos frutos, que são geralmente muito picantes e aromáticos. Vale ressaltar algumas formas com baixa pungência como a pimenta de bico, comum no Estado de Minas Gerais, Brasil. Os tipos de pimenta mais conhecidos dessa espécie são habanero, pimenta-de-cheiro, murupi, pimenta-de-bico (biquinho), pimenta-de-bode e cumari-do-pará (RIBEIRO et al., 2008). No Brasil, a pimenta murupi é o morfotipo preferido pelos indígenas e não-indígenas do Estado de Roraima para preparar molhos e jequitiaia (pó de pimentas). Seus frutos são de formato alongado, superfície rugosa, com coloração amarela ou vermelha quando maduro, peso inferior a 4,5 gramas, aroma característico e pungência elevada (BARBOSA et al., 2010), que pode atingir valores acima de 220.000 SHU (Scoville Heat Unit) (RIBEIRO et al., 2008). Essa espécie é popular em toda a região tropical e muito usada para dar sabor e pungência na cozinha caribenha (MOSES e UMAHARAN, 2012).

De modo geral, *C. frutescens* é caracterizado por apresentar frutos pequenos, cônicos, eretos, picantes, com parede delgada, geralmente coloração vermelha quando maduros e cálice sem constrição na base (CARVALHO et al., 2006). Entretanto, variações na forma, posição, tamanho e coloração dos frutos já foram observadas em populações de *C. frutescens* e, por esses motivos, foram classificadas como domesticadas. O exemplo mais difundido, e por muito tempo considerado a única forma domesticada, é aquela popularmente conhecida como pimenta tabasco (PICKERSGILL, 1971), cultivada nos Estados Unidos. BARAL e BOSLAND (2004) relatam a existência de acessos de *C. frutescens* apresentando frutos grandes, pendentes e persistentes sugerindo a existência de outras formas domesticadas, além do tabasco cultivado.

C. frutescens and *C. chinense* mostram uma adaptação e distribuição, especialmente nas Américas, em regiões tropicais baixas, quentes e úmidas. Desse modo, a distribuição

geográfica de *C. frutescens* corresponde às áreas desde o sul do México, América Central, Caribe (incluindo Índias Ocidentais), até o norte da América do Sul, incluindo a Colômbia, Brasil (especialmente a Amazônia), Peru e Bolívia.

Expedições de coleta na região Amazônica brasileira, desde a década de 90, possibilitaram a obtenção de populações com características capazes de discriminar as espécies *C. chinense* (especialmente a presença de constrição no cálice) e *C. frutescens* (especialmente frutos alongados, paredes finas), bem como características relacionadas à categoria de espécies silvestres. Esses acessos enriqueceram o BAG *Capsicum* da Embrapa Hortaliças e, a partir desses foi possível encontrar cinco materiais com características silvestres, sendo um deles registrado como *C. frutescens* e quatro como *C. chinense*.

A adequada caracterização desses acessos fornece uma indicação do grau de domesticação e da interferência humana. Apenas uma parte do pool gênico original é selecionada no processo de domesticação (gargalo genético) a cada ciclo de seleção. Dessa forma, tal processo está sempre associado a uma redução na diversidade genética da população escolhida (EYRE-WALKER et al., 1998). Assim, a identificação e a incorporação de acessos silvestres em um programa de melhoramento genético podem restituir parte da variabilidade genética perdida e permitir, por meio de combinações genéticas, o surgimento de novos indivíduos mais adaptados, produtivos e resistentes a doenças, dentre outras características.

A partir de 1994, o uso dos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), baseados em SSR, tornaram-se consideravelmente mais acessíveis (ZIETKIEWICZ et al., 1994) para estudos genéticos e no melhoramento genético de espécies de interesse agrícola. A técnica de marcadores ISSR envolve a amplificação de DNA por PCR, usando um único *primer* composto de uma seqüência de microssatélite, ancorado na região 3' ou 5' por dois a quatro nucleotídeos arbitrários (GONZALEZ et al., 2005). A utilização dessa técnica supera a limitação do conhecimento prévio das seqüências dos microssatélites. É um método simples, de custo relativamente baixo quando comparado com outros marcadores, proporciona alta reprodutibilidade e apresenta elevado número de fragmentos polimórficos. Os marcadores ISSR são dominantes e o produto da amplificação não é conhecido, ou seja, são marcadores aleatórios assim como os RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*). Entretanto, marcadores ISSR são mais confiáveis, os *primers* são maiores, por isso

possuem maior superfície de ancoragem e a temperatura de anelamento é mais elevada, o que proporciona uma maior especificidade (BORNET e BRANCHARD, 2001).

Marcadores ISSR têm sido usados para diversos fins, tais como, inferências filogenéticas (DOGAN et al., 2007), avaliação da diversidade genética (AGUILERA et al., 2011), estudos de complexos de espécies (MICHELAN et al., 2012), entre outros.

O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de formas silvestres de *Capsicum* spp., comparando-os com uma amostra representativa dos demais acessos presentes no BAG. Buscou-se, ainda, verificar a exatidão da classificação taxonômica pré-existente e relatar a existência de genótipos com características silvestres pertencentes às espécies *C. frutescens* e *C. chinense*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Material Genético

Uma amostra de 30 acessos do BAG *Capsicum* foi utilizada nesse estudo, incluindo cinco acessos (CNPB 4315, CNPB 4325B, CNPB 4337, CNPB 4353 e CNPB 4372) com características silvestres coletados na região Amazônica (Tabela 1). A amostra compreendeu nove acessos registrados no BAG como pertencentes à espécie *C. frutescens*, dezessete classificados como *C. chinense*, dois acessos da espécie *C. baccatum*, sendo um *C. baccatum* var. *praetermissum* e um *C. baccatum* var. *pendulum* e, finalmente, dois acessos de *C. annuum*, sendo um *C. annuum* var. *glabriusculum* e um *C. annuum* var. *annuum*.

1.2.2 Caracterização morfológica

As sementes dos acessos foram germinadas em bandejas de poliestireno contendo substrato orgânico em casas de vegetação com telas anti-afídicas e, após 45 dias, cinco plantas de cada acesso foram transplantadas para o solo, também sob casa-de-vegetação, dispostas em linhas espaçadas de 1,5 m, sendo o espaçamento entre plantas na linha de 0,60 m. Procedeu-se, então, à caracterização morfológica das plantas a partir de 90 dias após a semeadura, por meio de oito descritores internacionais recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995), todos relacionados ao fruto: cor na maturação, formato, posição,

persistência entre fruto e pedicelo; comprimento, largura, peso e presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo, sendo caracterizadas cinco plantas por acesso. Esses descritores relacionados às características de frutos foram escolhidos por fornecerem uma indicação do grau de domesticação ocorrida no material genético do presente estudo, já que o fruto é o foco da seleção. As espécies foram identificadas por meio de uma chave para identificação de espécies e variedades domesticadas e semidomesticadas do gênero *Capsicum* de ocorrência no Brasil (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

Com base nas médias dos descritores botânicos, foram estimados coeficientes de dissimilaridade genética para cada par de acessos de acordo com a Distância Euclidiana Média Padronizada - DEMP (STEEL e TORRIE, 1980). A matriz de dissimilaridade genética gerada foi submetida a análise de agrupamento por meio do método não ponderado com base na média aritmética UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*) que gerou um dendograma. Para a realização destas análises foi utilizado o programa computacional GENES (CRUZ, 2006). O momento de parada do algoritmo de aglomeração (corte do dendograma) para definir o número de grupos, foi definido segundo a distância genética média entre os genótipos, utilizando-se o programa NTSYS pc 2.1. Realizou-se também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC, 1999).

1.2.3 Caracterização molecular

Folhas de cada acesso foram coletadas e o DNA genômico extraído por meio do método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda. Cada amostra foi, então, diluída para a concentração de 3,0 ng/ μ l.

A diversidade entre os materiais foi avaliada por meio de marcadores ISSR, sendo doze deles desenvolvidos para feijão (i1Pv a i12Pv) (ACAMPORA et al., 2007) e sessenta para milho (i1Zm a i60Zm) (GIANFILIPPI, 2006). Para as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi feito um mix em um volume de 13 μ l contendo: 2,59 μ l de água MilliQ; 1,3 μ l de tampão 10X; 0,25 μ l de MgCl₂ 50 mM; 1,3 μ l de dNTPs 2,5 mM cada;

1,3 µl de BSA 2,5 mg/ml, 3 µl de *primer* a 1,2 mM; 0,26 µl de enzima Taq polimerase (5 U/µl) e mais 3 µl de DNA genômico a 3 ng/µl. As reações de amplificação dos *primers* ISSR ocorreram da seguinte forma: 94 °C por 5 min para desnaturação, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min à 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 min.

As reações de amplificação foram aplicadas em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (0,2 ug/ml), para separação dos fragmentos ISSR. Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

As bandas polimórficas foram classificadas de acordo com a ausência (0) e presença (1) e, sendo criadas matrizes com base no complemento do coeficiente de Jaccard, utilizadas para comparação entre os acessos. Com base nas distâncias genéticas, estabeleceu-se um dendrograma pelo método UPGMA, sendo a consistência dos agrupamentos analisada por meio de 1000 simulações de *bootstrap*, com o auxílio do *software* GENES (CRUZ, 2006) e o ajuste da matriz de dissimilaridade com o respectivo dendrograma estimado pelo coeficiente de correlação cofenético (r) utilizando-se o programa NTSYS pc 2.1. Com auxílio desse mesmo software, a dissimilaridade média global entre os materiais foi calculada e, sobre esse valor, foi traçada uma linha pontilhada no gráfico, servindo como referência para a formação dos grupos de materiais. A dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais foi realizada por meio das coordenadas principais, com auxílio dos programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999). Por fim, a significância da associação entre as matrizes de distância obtidas por marcadores ISSR e por caracteres morfológicos foi estimada com base no coeficiente de correlação de Pearson e no teste t, também por meio do programa Statistica.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização morfológica

Os oito descritores morfológicos utilizados para a caracterização detectaram variação entre os acessos avaliados. A partir desses descritores, foram realizadas análises de agrupamento e seu correspondente dendrograma de similaridade (Tabela 1, Figura 1).

No dendrograma gerado a partir da caracterização com descritores morfológicos (Figura 1), três grupos foram formados ao se considerar o valor de corte correspondente à dissimilaridade média global entre os materiais (= 0,60). O grupo I foi o maior e englobou 18 acessos das quatro espécies estudadas. O grupo II foi formado por 11 acessos de duas espécies, *C. chinense* e *C. baccatum* var. *pendulum*, e o grupo III foi formado por apenas um acesso, correspondente a *C. annuum* var. *annuum* (pimentão).

O grupo I englobou todos os acessos com características silvestres, das quatro espécies avaliadas, *C. frutescens* (acesso CNPH 4353), *C. chinense* (acessos CNPH 4315, CNPH 4325B, CNPH 4372, e CNPH 4337), *C. annuum* (CNPH 4212) e *C. baccatum* (CNPH 3825).

Dentre esses acessos, os quatro representantes silvestres de *C. chinense* se apresentaram muito próximos entre si, indicando grande similaridade morfológica entre os frutos: posição ereta, formato arredondado a campanulada, tamanho pequeno (1,0 cm de comprimento e 0,8 cm de largura), peso médio de 0,2 gramas, coloração vermelho escuro quando maduros, com fácil desprendimento dos cálices (frutos decíduos), favorecendo a remoção e, possivelmente a disseminação das sementes. Foi verificada, também, presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo, característica discriminativa de *C. chinense*.

Todos os acessos de *C. frutescens* estudados foram agrupados no Grupo I. O acesso CNPH 4353, conhecido como malaguetinha também foi agrupado juntamente com os dois acessos domesticados avaliados dessa espécie (CNPH 4161 e CNPH 4266), os quais são cultivares de pimenta tabasco comercializadas no Brasil por empresas de sementes.

Tabela1. Acessos do banco ativo de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças utilizados nas análises morfológicas e moleculares.

Nº CNPH	Tipo	Espécie	Cor do fruto na maturação	Formato do fruto	Posição do fruto	Persistência entre fruto e pedicelo	Comprimento (cm)	largura (cm)	peso (g)	Construção anelar do cálice
4353	Malaguêta	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	pouco persistente	1.5	0.4	0.2	ausente
3891	Malagueta	<i>C. frutescens</i>	laranja	alongado	ereta	persistente	2.5	0.6	0.5	ausente
4266	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	vermelho	alongado	ereta	pouco persistente	2.8	0.7	0.7	ausente
4283	Malagueta	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	intermediária	3.2	0.7	0.4	ausente
4304	Malagueta	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	intermediária	2.4	0.6	0.4	ausente
4364	Malagueta	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	persistente	3.6	0.7	0.7	ausente
4095	Malagueta	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	persistente	2.7	0.7	0.7	ausente
4161	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	pouco persistente	3.2	0.8	1.0	ausente
3000	Tabasco	<i>C. frutescens</i>	vermelho claro	alongado	ereta	persistente	2.2	0.5	0.7	ausente
4366C	Similar a Tabasco	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	intermediária	2.9	0.5	0.6	presente
4361	Similar a Tabasco	<i>C. chinense</i>	laranja	alongado	ereta	intermediária	2.0	0.6	0.4	presente
4325A	Similar a Malagueta	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	pouco persistente	3.3	0.7	0.5	presente
4367A	Similar a Malagueta	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	intermediária	4.2	1.1	13	presente
4315	Olho de peixe	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	arredondado/ campanulado	ereta	pouco persistente	1.0	0.8	0.2	presente
4337	Olho de periquito	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	arredondado/ campanulado	ereta	pouco persistente	1.0	0.8	0.2	presente
4372	Olho de periquito	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	arredondado/ campanulado	ereta	pouco persistente	1.0	0.7	0.2	presente
4325B	Olho de peixe	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	arredondado/ campanulado	ereta	pouco persistente	1.0	0.8	0.2	presente
3773	Bode	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	arredondado/ campanulado	pendente	persistente	1.4	1.5	1.5	presente
15037	Habanero	<i>C. chinense</i>	laranja	campanulado	pendente	persistente	5.6	3.4	10.2	presente
4334A	Murupi	<i>C. chinense</i>	amarelo	alongado	pendente	persistente	6.0	1.1	2.4	presente
4316	Similar a Malagueta	<i>C. chinense</i>	laranja	campanulado	ereta	intermediária	3.4	1.6	2.8	presente
4327	Similar a Habanero	<i>C. chinense</i>	laranja	triangular	pendente	persistente	6.7	3.2	13.4	presente
4328A	Similar a Bode	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	retangular	pendente	persistente	3.6	4.3	16.2	presente
4332	Similar a Cayenne	<i>C. chinense</i>	vermelho	alongado	pendente	persistente	10.5	2.7	12.8	presente
4360	Murupi	<i>C. chinense</i>	amarelo pálido	alongado	pendente	persistente	5.0	1.0	1.6	presente
4330	Similar a Bode	<i>C. chinense</i>	vermelho escuro	triangular	pendente	persistente	3.4	4.3	16.8	presente
3825	Cumari	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	vermelho	triangular	ereta	pouco persistente	0.9	0.6	0.2	ausente
4082	Dedo-de-moça	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	vermelho	alongado	pendente	persistente	4.6	0.9	2.0	ausente
4212	Ornamental	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	vermelho escuro	alongado	ereta	persistente	2.0	0.5	0.4	ausente
40013	Pimentão	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	vermelho escuro	retangular	pendente	persistente	8.2	5.2	65.0	ausente

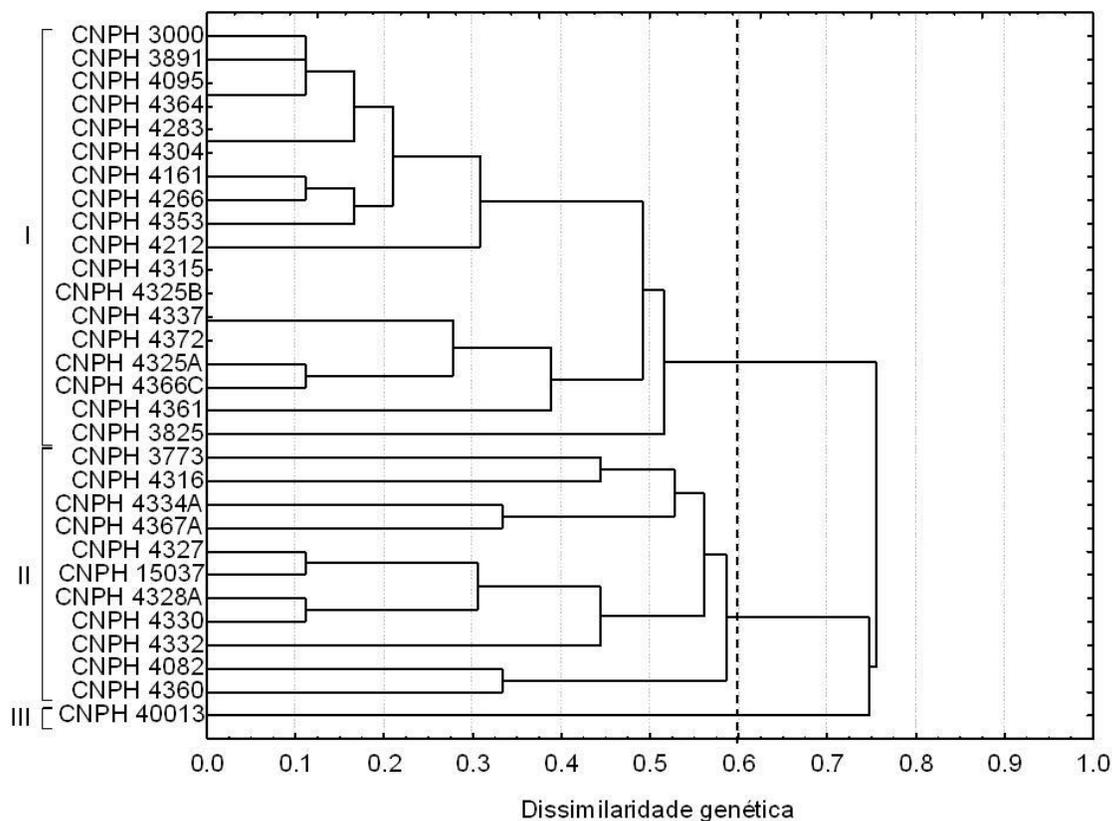


Figura 1. Dendrograma com acessos de *Capsicum* spp. construído com base em dados multicategóricos obtidos a partir de descritores morfológicos.

Quatro descritores apresentaram resultados similares entre os acessos domesticados e silvestres de *C. frutescens*: frutos eretos, de formato alongado, pouca persistência entre o fruto e pedicelo e ausência de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo. Para os demais descritores, houve variação quanto aos resultados. Comprimento, largura e peso dos frutos foram inferiores no acesso silvestre CNPH 4353 (1,5 cm, 0,4 cm e 0,2 gramas, respectivamente), enquanto os dois acessos domesticados (CNPH 4161 e CNPH 4266) produziram frutos pesando mais que 0,7 g e medindo 3,0 cm de comprimento por 0,7 cm de largura.

Ainda nesse mesmo grupo foram reunidos exemplares que apresentavam características silvestres pertencentes às espécies *C. annuum* e *C. baccatum*. O acesso CNPH 4212, uma planta ornamental identificada como *C. annuum* var. *glabriusculum* (forma silvestre de *C. annuum*) e o acesso CNPH 3825, identificado como *C. baccatum* var. *praetermissum* (considerado uma forma silvestre de *C. baccatum*). Ambos os acessos

apresentaram frutos eretos, coloração vermelho escuro quando maduros, formato alongado (CNPH 4212) a triangular (CNPH 3825), medindo de 0,9 cm (CNPH 3825) a 2 cm (CNPH 4212) de comprimento por 0,5 cm de largura e peso variando de 0,2 g (CNPH 3825) a 0,4 g (CNPH 4212).

O grupo II foi formado por acessos que apresentaram características típicas de plantas domesticadas, pertencentes às espécies *C. chinense* (CNPH 3773, CNPH 4316, CNPH 4334A, CNPH 4367A, CNPH 4327, CNPH 15037, CNPH 4328A, CNPH 4330, CNPH 4332 e CNPH 4360) e *C. baccatum* var. *pendulum* (CNPH 4082). Do mesmo modo, o grupo III foi constituído pelos acessos domesticados de *C. annuum* var. *annuum* (CNPH 40013).

Os acessos de *C. chinense* e *C. baccatum* com características típicas de plantas domesticadas apresentaram diferenças nítidas em relação aos acessos silvestres das mesmas espécies, tais como presença de frutos pendentes (os frutos pendentes ficam por debaixo ou protegidos pela folhagem e, desse modo, pouco visíveis aos pássaros), não decíduos (persistentes), de comprimento e largura superiores a 2 e 1,5 cm, respectivamente, peso entre 2 a 17 gramas, além de diferentes formas (retangular, triangular, campanulada, arredondada e alongada) e cores de fruto quando maduro (amarela, amarela-pálida, laranja e vermelha).

O grupo III foi formado pelo único representante domesticado da espécie *C. annuum* (CNPH 40013). Esse acesso é um pimentão distinto em relação aos demais grupos formados por apresentar frutos grandes que atingiram a maior largura e peso dentre os materiais estudados (5,2 cm e 65 gramas, respectivamente).

A variabilidade morfológica entre os acessos, estratificada por espécies, também foi representada no gráfico de dispersão (Figura 2), que sugere a formação de pelo menos três grupos separados, parcialmente correspondentes com as espécies estudadas. O maior grupo consistiu de acessos de *C. chinense*, que ficou isolado de outras espécies. No entanto, o grupo constituído predominantemente de *C. frutescens* incluiu em suas extremidades acessos de *C. annuum* e *C. baccatum*. O terceiro grupo correspondeu a dois acessos de espécies diferentes, um *C. annuum* e um *C. baccatum*.

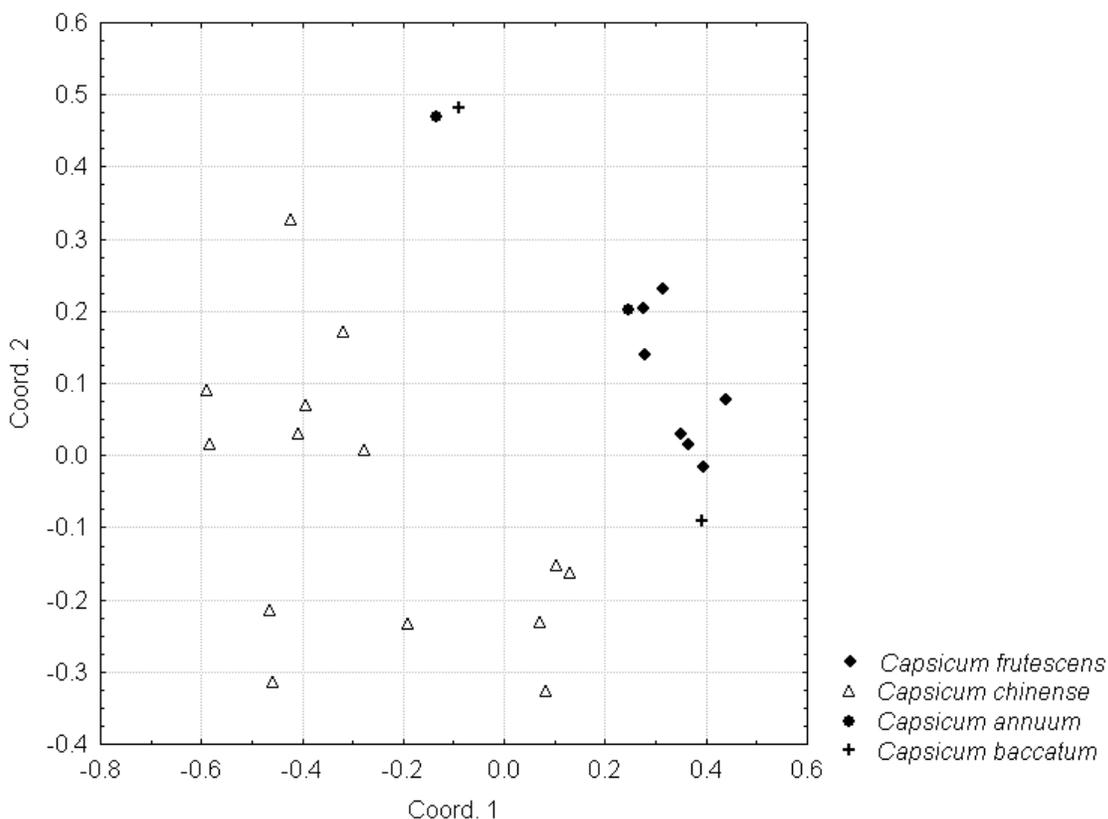


Figura 2. Dispersão de acessos de *Capsicum* spp. obtida a partir de dados multicategóricos de descritores morfológicos

1.3.2 Caracterização molecular

Dos 72 *primers* ISSR testados, trinta (42%) apresentaram amplificação para os materiais analisados e todos demonstraram polimorfismo, produzindo um total de 136 *amplicons* polimórficos, com média de 4,5 *amplicons* polimórficos por *primer*. Esses *primers* possibilitaram a identificação de polimorfismos entre todas as espécies analisadas e alguns deles, tais como i7Pv e i57Zm (Figura 3), permitiram diferenciar as espécies *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens* e, portanto, podem ser usados de forma auxiliar na sua identificação.

Com base no padrão revelado pelos 136 *amplicons* polimórficos, realizou-se o agrupamento dos acessos e seu correspondente dendrograma de similaridade (Figura 4). As distâncias entre os acessos e a distribuição dos mesmos, estratificados por espécie, também podem ser observadas nos gráficos de dispersão (Figura 5).

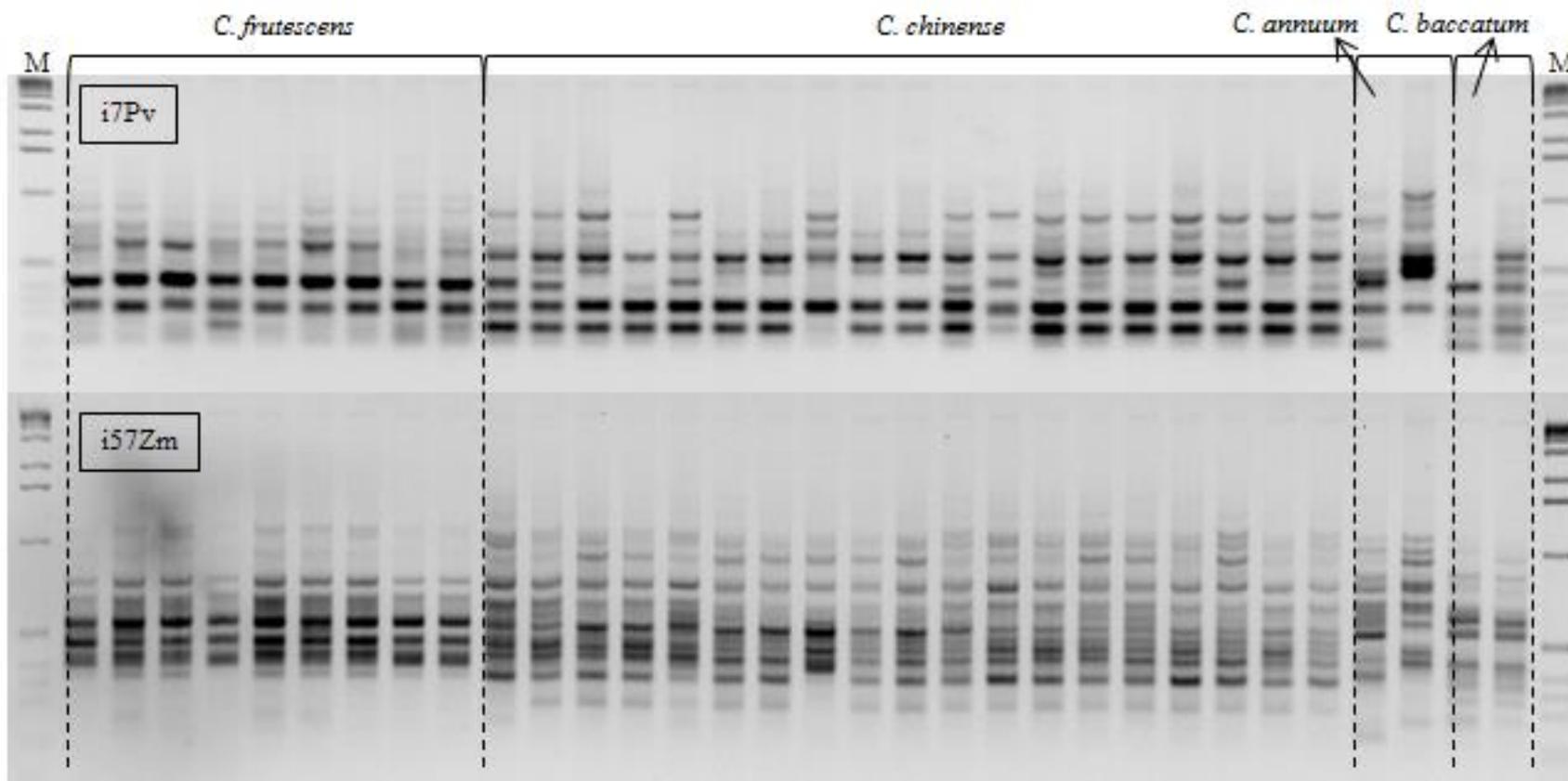


Figura 3. Polimorfismos entre e dentro de espécies do gênero *Capsicum* verificados por meio da aplicação de dois primers iSSR (i7Pv e i57Zm); “M” indica o marcador de peso molecular 1 Kb Ladder® (Invitrogen®).

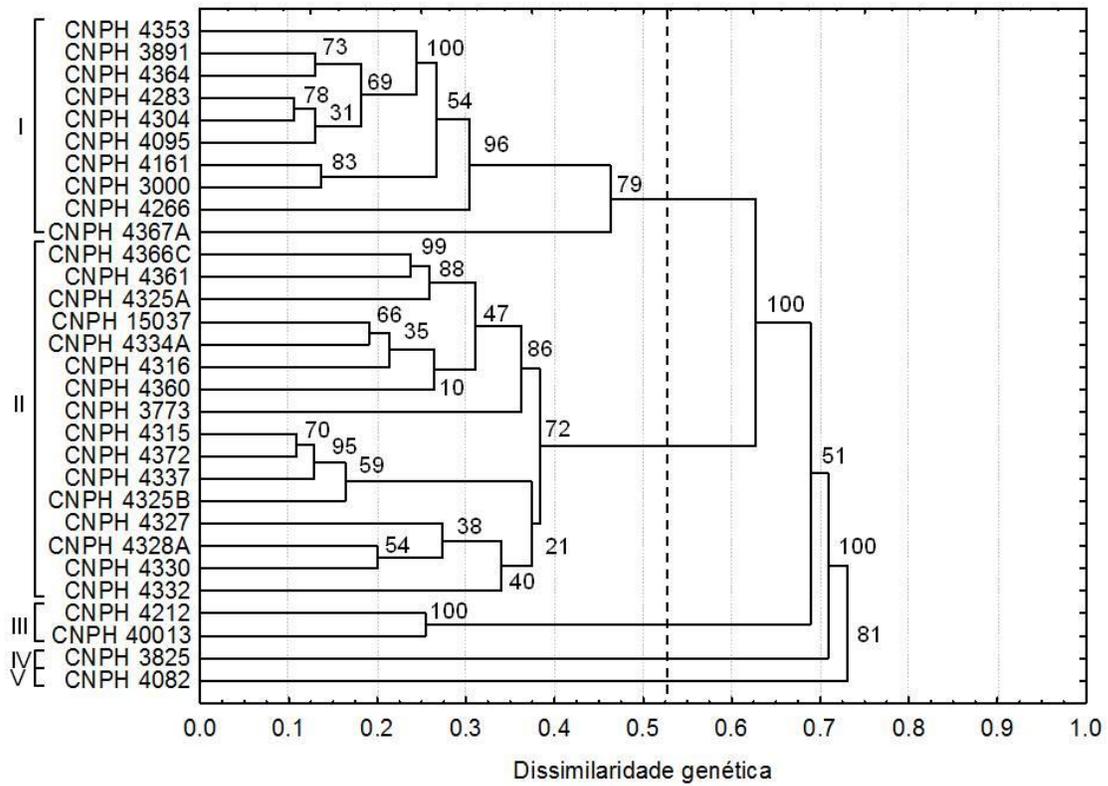


Figura 4. Dendrograma com acessos de *Capsicum* spp. construído com base em dados binários obtidos por meio de marcadores moleculares do tipo ISSR.

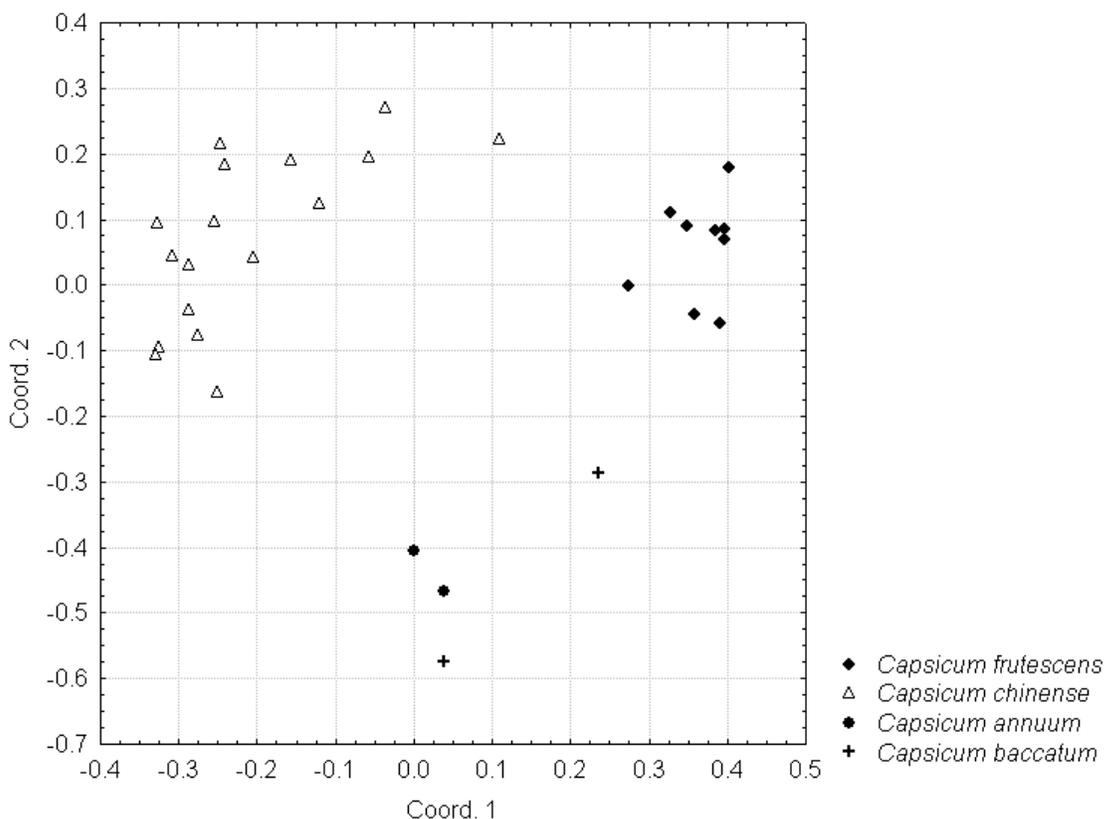


Figura 5. Dispersão de acessos de *Capsicum* spp. obtida a partir de dados binários de marcadores moleculares do tipo ISSR.

A correlação entre a matriz de valores co-fenéticos e a matriz de similaridade foi de 0,94, indicando um excelente ajuste entre a matriz e o gráfico. Cinco grupos foram formados ao se considerar o valor de corte correspondente à dissimilaridade média global entre os materiais (0,53), sendo que dois desses grupos, IV e V, foram formados somente por um acesso e corresponderam às variedades *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. baccatum* var. *pendulum*, respectivamente. O grupo III foi constituído por dois acessos da mesma espécie, sendo um *C. annuum* var. *glabriusculum* e o outro *C. annuum* var. *annuum*. Os maiores grupos, I e II, englobaram 10 e 16 acessos e corresponderam às espécies *C. frutescens* e *C. chinense*, respectivamente.

Os acessos apresentando características silvestres foram, em geral, agrupados com os demais materiais da mesma espécie. A única exceção ocorreu com a espécie *C. baccatum*, em que o material domesticado e o silvestre formaram grupos exclusivos, não se reunindo com nenhum outro material. Em *C. chinense*, um subgrupo foi formado com

coeficiente de dissimilaridade de 0,37 em relação ao material mais próximo, dentro do grupo formado pela espécie.

Finalmente, verificou-se a correlação entre a análise morfológica e a molecular ($r = 0,56$). Esse valor é significativo ($p < 0,01$) pelo teste t, porém de magnitude intermediária, indicando que as análises, embora estejam correlacionadas, não apresentam exatamente os mesmos agrupamentos.

1.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a caracterização morfológica permitiu separar as formas silvestres dos acessos domesticados de três espécies de *Capsicum* (*C. chinense*, *C. annuum* e *C. baccatum*). No entanto, a separação não ocorreu de forma tão evidente entre as formas silvestres e domesticadas da espécie *C. frutescens* (Figura 1). *C. frutescens* apresenta morfologia altamente conservada entre os acessos e ao utilizarmos somente oito descritores e todos eles relacionados ao fruto, é possível que se tenha reduzido a precisão da análise e que isso tenha ocasionado a não separação entre as formas silvestres e domesticadas.

Todos os acessos de *C. frutescens* estudados são encontrados no Grupo I do dendograma da caracterização morfológica. Uma explicação plausível seria que a forma dessa espécie apresenta uma morfologia altamente conservada (quando comparado a outras espécies do gênero) e mostram características de fruto (tamanho, posição e cor) típicos das espécies silvestres (WALSH e HOOT, 2001). Por esta razão, autores como JETT (1973) propõe *C. frutescens* como ancestral provável das outras espécies domesticadas.

As diferenças entre as formas silvestres e domesticadas de *C. chinense* foram nitidamente distinguidas nesse estudo. Ademais, as características morfológicas identificadas nos acessos silvestres estudados são compartilhadas com as de espécies silvestres em geral, ou seja, os frutos são eretos, brilhantes, pequenos (geralmente menores que 2 cm), de forma ovada, são vermelhos quando maduros, soltam-se facilmente da planta (decíduos) e são geralmente picantes (PICKERSGILL, 1969; 1971). Todas essas características estão associadas à atratividade dos frutos e à dispersão das sementes realizada por pássaros. A presença e o tamanho do bico dos pássaros acabam por selecionar frutos decíduos, pequenos e de forma arredonda e a ausência de dentes impede a mastigação e a ocorrência de danos mecânicos às sementes. Além disso, os pássaros conseguem distinguir cores, atraindo-se pelas plantas com frutos eretos, brilhantes e

vermelhos. Por fim, os pássaros são neurologicamente insensíveis a capsaicina. A capsaicina é um metabólito secundário responsável pela pungência das pimentas, que não tem efeito repelente nos dispersores de sementes benéficos tais como os pássaros (TEWKSBURY e NABHAN, 2001).

As características encontradas exclusivamente nas plantas domesticadas normalmente não estão presentes na natureza e sua presença está possivelmente relacionada ao processo de domesticação, em que características de importância para o homem são selecionadas em detrimento dos traços que representariam vantagens competitivas para as plantas em ambiente natural. É provável que os acessos silvestres estudados tenham preservado características como produção de frutos pequenos, eretos, posicionados acima da folhagem, com fácil desprendimento e coloração vermelha intensa do fruto maduro por significarem, esses traços, vantagens competitivas quanto a dispersão de sementes realizadas por pássaros.

Mesmo ao considerarmos as modificações morfológicas induzidas pelo processo de domesticação, é de se esperar que as espécies domesticadas (ou em fase de domesticação) compartilhem algumas características distintivas de seus parentes silvestres. Por exemplo, *C. baccatum* var. *pendulum* (domesticado) apresenta distintivamente flores brancas com manchas amarelas ou douradas na base dos lobos da corola, assim como seu ancestral silvestre (*C. baccatum* var. *baccatum*); *C. pubescens* apresenta distintivamente flores com corolas liláses, assim como seu ancestral silvestre (*C. eximium*).

Os resultados desse trabalho apresentaram acessos de *C. chinense* domesticados discriminados pela presença de uma constrição na base do cálice, que também foi verificada nas formas silvestres, coletadas na região Amazônica (CNPB 4315, CNPB 4325B, CNPB 4337 e CNPB 4372).

Ao se considerar o valor de dissimilaridade média global como referência para delimitação dos grupos no dendrograma dos marcadores moleculares (Figura 4), apenas em *C. baccatum* houve separação entre o acesso silvestre e o cultivado. Observou-se, no entanto, que três exemplares identificados como silvestres de *C. chinense* na caracterização morfológica (CNPB 4315, CNPB 4337 e CNPB 4372) foram posicionados no agrupamento II da caracterização molecular correspondente aos acessos da espécie *C. chinense* e reunidos em um sub-grupo altamente coeso (coeficiente de bootstrap = 95%), demonstrando que esses materiais possuem entre si maior proximidade genética do que em

relação aos demais materiais domesticados. Entretanto, quando foi considerado o acesso CNPH 4325B, formou-se um sub-grupo menos coeso (coeficiente de bootstrap = 59%), com alto grau de similaridade embora esse material, na caracterização morfológica, tenha sido considerado como idêntico aos três exemplares silvestres.

Partindo-se do pressuposto de que existe uma relação de ancestralidade entre as formas silvestres e domesticadas, a ocorrência de forma simpátrica entre elementos das diferentes categorias, ou seja, a existência de uma coincidência ou sobreposição parcial entre a área de distribuição da espécie domesticada e a área da espécie silvestre proximamente relacionada corroboram essa conclusão. Desse modo, ESHBAUGH (1970) com base na morfologia e resultados de cruzamentos, propõe a relação de ancestralidade entre *C. baccatum* var. *pendulum* (domesticado) e *C. baccatum* var. *baccatum* (ancestral silvestre) e aponta as terras baixas da Bolívia como provável região de onde teria acontecido o processo de domesticação para a espécie. PICKERSGILL (1971) em evidências morfológicas e cromossômicas apresenta relação de ancestralidade entre *C. annuum* var. *annuum* (domesticado) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (ancestral silvestre) e identifica o México como a provável região de onde teria acontecido o processo de domesticação para a espécie; ESHBAUGH (1976) de acordo com evidências morfológicas, quimiotaxonômicas e cruzamentos considera que *C. eximium* e *C. cardenasii* representem o complexo de espécies ancestrais que deu origem à espécie domesticada *C. pubescens* e identifica as terras de elevação mediana da Bolívia como a provável região de onde teria acontecido o processo de domesticação para a espécie.

As formas silvestres de *C. chinense* avaliadas no presente trabalho foram obtidas na região Amazônica brasileira, ou seja, na área de distribuição geográfica da respectiva espécie domesticada e provável região de onde teria acontecido o processo de domesticação para a espécie. As evidências da proximidade genética com as formas domesticadas dessa espécie foram fornecidas na caracterização molecular.

C. chinense apresenta melhor adaptação às condições de calor úmido do que as demais espécies domesticadas de *Capsicum*. Nesse sentido, pensa-se que tenha sido domesticada nas planícies a leste dos Andes e espalhada em associação com a mandioca (PICKERSGILL, 1969).

Durante o processo de domesticação, quando o homem possui o papel de principal agente de seleção, ele é capaz de interferir no processo de evolução natural de uma espécie,

distanciando o elo entre as espécies domesticadas e silvestres. Além disso, muitas espécies podem representar formas intermediárias entre a silvestre e a domesticada (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

De modo geral, *C. frutescens* por apresentar características de espécies silvestres (forma, coloração e posição dos frutos) e padrões isoenzimáticos e morfológicos semelhantes a *C. chinense*, foi considerada por alguns (ESHBAUGH et al., 1983 entre outros) como a forma ancestral de *C. chinense*. Todavia, os estudos de BARAL e BOSLAND (2004) e ALBRECHT et al. (2012) não concordam com essa hipótese, e seus resultados mostram claramente a existência de duas espécies distintas morfológica, filogenética e reprodutivamente.

Tanto o acesso CNPH 4353 (malaguétinha), no presente estudo apontado como forma silvestre de *C. frutescens*, quanto os outros acessos tradicionalmente cultivados e comercializados de *C. frutescens*, apresentaram resultados similares para alguns descritores morfológicos (especialmente quanto ao tamanho, posição e coloração dos frutos). Esses resultados estão de acordo com os de DeWITT e BOSLAND (2009) ao concluírem que *C. frutescens* é a espécie que apresenta a morfologia mais conservada, com poucas formas, tamanhos e cores de frutos em relação a *C. annuum*, *C. baccatum* ou *C. chinense*.

Em geral, populações silvestres e domesticadas diferem em várias características que são alvos da seleção humana. No entanto, algumas plantas domesticadas são indistinguíveis das silvestres e portanto não são geneticamente fixadas para alguma característica que as distinga das populações silvestres. Todavia, a frequência de alelos que regem os caracteres sujeitos a seleção humana presumivelmente diferem, o que caracteriza pelo menos uma domesticação incipiente ou semidomesticação (PICKERSGILL, 2007).

Na caracterização morfológica (Figura 1), todos os acessos com características de espécies silvestres, independentemente da classificação taxonômica da espécie, foram agrupados no grupo I. Neste grupo, observa-se que CNPH 4212 (*C. annuum* var. *glabriusculum*) aparece como um grupo irmão de todos os outros acessos de *C. frutescens*, demonstrando uma certa proximidade da espécie *C. annuum* e *C. frutescens*, enquanto CNPH 3825 (*C. baccatum* var. *praetermissum*) aparece como o grupo irmão de todos os outros acessos do grupo I, demonstrando uma maior dissimilaridade e independência de todos os acessos do grupo (incluindo acessos de *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*). Estes dados são consistentes com a literatura recente que indica linhas evolutivas

independentes entre diferentes complexos de espécies relacionadas: complexo *C. annuum* (*C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. galapagoense*); complexo *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. tovarii*) e complexo *C. pubescens* (*C. pubescens*, *C. eximium* e *C. cardenasii*) (INCE et al., 2010; ALBRECHT et al., 2012).

Verificou-se, também, que na caracterização molecular os componentes do grupo *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* mostraram-se geneticamente próximos entre si e distintos do subgrupo de *C. baccatum*, corroborando a análise morfológica do grupo I. As espécies *C. frutescens* (grupo I) e *C. chinense* (grupo II) apresentaram maior proximidade entre si (similaridade = 0,37), com um coeficiente bootstrap de 100%, seguidas de *C. annuum* (grupo III; similaridade = 0,31) e *C. baccatum*, a mais distinta em relação aos grupos formados (grupo IV e V; similaridade = 0,29 e 0,27, respectivamente). Esses resultados corroboram aqueles já registrados na literatura com base na morfologia (PICKERSGILL et al., 1979) e com a utilização de técnicas moleculares (BUSO et al., 2002; WALSH e HOOT, 2001; TAM, et al., 2009; INCE, et al., 2010; ALBRECHT et al., 2012), entre outros.

Vale ressaltar que as variedades *C. baccatum* var. *praetermissum* (grupo IV) e *C. baccatum* var. *pendulum* (grupo V) apresentaram, entre si, baixa similaridade genética (0,26), demonstrando a alta distância genética existente entre variedades hipoteticamente pertencentes à mesma espécie (*C. baccatum*).

A questão relativa à inclusão de variedades de *C. baccatum* dentro da mesma espécie, apesar da baixa similaridade com relação a elas, durou até o trabalho de KOCHIEVA et al. (2004) que, utilizando ferramentas moleculares AFLP (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados), RAPD e ISSR para determinar o relacionamento genético entre espécies e variedades de *Capsicum*, apresentaram resultados que dão suporte ao reconhecimento de *C. praetermissum* como espécie autônoma e não mais uma variedade de *C. baccatum*. A conclusão apontada por KOCHIEVA et al. (2004) já havia sido relatada por BUSO et al. (2002), analisando o DNA cloroplástico e, mais recentemente, por ALBRECHT et al. (2012). Além disso, a mesma observação também é apontada no presente trabalho, em que a baixa similaridade observada entre *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. baccatum* var. *pendulum* justificaria a discriminação de espécies diferentes.

Devido à proximidade entre as duas espécies *C. chinense* e *C. frutescens*, existem acessos domesticados que possuem fenótipos intermediários, dificultando a identificação das mesmas quando a classificação é baseada exclusivamente em dados morfológicos, visto que há sobreposição desses caracteres e influência de fatores ambientais. As informações moleculares auxiliam nas evidências das diferenças existentes entre essas duas espécies (BARAL e BOSLAND, 2004). A estreita relação entre elas foi compartilhada nas características de flor e na proximidade a nível genotípico (THUL et al., 2012).

De acordo com a caracterização morfológica no presente estudo, o acesso CNPH 4367A foi inicialmente classificado como *C. chinense*. Entretanto, quando realizada a caracterização molecular esse mesmo acesso (CNPH 4367A) foi incluído no grupo I, da espécie *C. frutescens* (Figura 5). Ao se considerar somente o grupo de *C. frutescens*, esse acesso apresentou-se como o mais divergente. De fato, as características morfológicas do material (flores eretas, frutos eretos, de forma alongada e, quando maduros, vermelhos e com presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo) o coloca em uma condição intermediária ou indefinida entre as duas espécies, podendo representar um estágio intermediário no caminho evolutivo de diferenciação das duas espécies ou, até mesmo um híbrido resultante da fecundação cruzada entre as duas espécies. Resultado semelhante foi verificado no trabalho de TAM et al. (2009), que ao utilizar técnica de SSAP (*Sequence-specific amplification polymorphism*) e avaliar a estrutura genética de 86 acessos de sete espécies de *Capsicum*, reclassificaram um acesso de *C. frutescens* como *C. chinense*. De acordo com CARVALHO et al. (2006) é possível que ocorra fluxo gênico entre variedades e até mesmo entre diferentes espécies do gênero, pois existe certa taxa de alogamia (ou polinização cruzada), favorecida por diferentes taxas de compatibilidade. Segundo BARAL e BOSLAND (2004), a cultivar greenleaf tabasco oferece um excelente exemplo de fenótipo intermediário e representa uma hibridação introgressiva e não uma variação intraespecífica. Essa cultivar foi desenvolvida por hibridação interespecífica entre *C. frutescens* e *C. chinense* seguido por retrocruzamento repetido para *C. frutescens*.

A correlação entre a análise molecular e a morfológica, realizadas no presente estudo, foi significativa, embora de magnitude intermediária. Esse dado confirma a confiabilidade das informações obtidas em ambos os métodos independentemente, mas demonstra, também, a importância de se realizar as duas análises em conjunto para a caracterização dos materiais em um banco de germoplasma. As características morfológicas

nem sempre representam a distância genética de forma clara e, portanto, a análise morfológica tende a ser mais superficial e influenciada pelo ambiente. A análise molecular, por outro lado, apresenta uma descrição mais detalhada e fiel à distância genética real, permitindo a máxima exploração da diversidade existente do banco. Porém, como ponto negativo, não proporciona, por si só, informações sobre características de interesse para o melhoramento, tais como resistência a estresses e produtividade. Assim, a associação de análises morfológicas e moleculares, como realizada no presente trabalho, é sugerida para a caracterização completa e detalhada de bancos de germoplasma visando o melhoramento de plantas.

Existe uma série de pontos importantes para estudos adicionais direcionados na identificação e uso de um ancestral silvestre de uma cultura. Em termos culturais, um ancestral silvestre revela quais eram os recursos disponíveis em uma determinada região, em determinado tempo, e parte das necessidades humanas que os levaram a domesticá-lo. Em termos biológicos, pode-se mapear a atual distribuição geográfica, inferir sobre a distribuição pretérita e mapear a difusão da espécie depois de domesticada; identificar os centros de diversidade e de domesticação; identificar quais modificações estão associadas à domesticação; estabelecer o grau de parentesco ou relação de ancestralidade, entre outras. Uma característica partilhada para quase todas as plantas domesticadas é a drástica redução na variabilidade genética durante e após o processo de domesticação. Desse modo, o desenvolvimento de atividades direcionadas para conservação e utilização desse tipo de recurso genético é plenamente justificada, pois a incorporação de um ancestral silvestre em um programa de melhoramento pode restituir parte da variabilidade genética perdida, facilitando o desenvolvimento de genótipos para condições específicas de estresses bióticos e abióticos, o que acarretaria um salto qualitativo e quantitativo para a cultura domesticada.

1.5 CONCLUSÕES

Os resultados revelaram que a associação da caracterização morfológica e molecular foram eficazes e úteis para a identificação e classificação das formas silvestres de *C. frutescens* e *C. chinense*. Por meio da análise molecular, quatro exemplares com características silvestres (CNPB 4315, CNPB 4325B, CNPB 4337 e CNPB 4372) foram classificados como *C. chinense* e apresentaram características morfológicas semelhantes às de espécies silvestres. É possível, ainda, que esses materiais coletados na Bacia Amazônica,

considerada a maior área de diversidade de *C. chinense*, compartilhem das mesmas características morfológicas dos ancestrais silvestres dessa espécie. Na análise molecular, a forma silvestre CNPH 4353 foi classificada como *C. frutescens*. Entretanto, não se distinguiu dos acessos de características domesticadas. Esses resultados subsidiarão estudos evolutivos do gênero, análises mais detalhadas de diversidade genética e esclarecimento das relações filogenéticas entre os acessos no contexto do BAG de *Capsicum* da Embrapa.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAMPORA, A.; CIAFFI, M.; PACE, C.; PAOLACCI, A. R.; TANZARELLA, O. A. Pattern of variation for seed size traits and molecular markers in Italian germplasm of *Phaseolus coccineus* L. **Euphytica**, v. 157, p. 69-82, 2007.

AGUILERA, J. G.; PESSONI, L. A.; RODRIGUES, G. B.; ELSAYED, A. Y.; SILVA, D. J. H.; BARROS, E. G. Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, p. 243-252, 2011.

ALBRECHT, E.; ZHANG, D.; SAFTNER, R. A.; STOMMEL, J. R. Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 517-538, 2012.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F.; NASCIMENTO FILHO, H. R.; MADURO, C. B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. Espécies domesticadas. **Acta Amazon**, v. 32, p. 177-192, 2002.

BARBOSA R. I; MOURÃO JÚNIOR, M.; LUZ, F. J. F. Morphometric patterns and preferential uses of *Capsicum* peppers in the State of Roraima, Brazilian Amazonia. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 477-482, 2010.

BIANCHETTI, L. B.; CARVALHO, S. I. C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões de gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 355-385.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p. 209-215, 2001.

BUSO, G. S. C.; AMARAL, Z. P. S. A.; BIANCHETTI, L. B.; FERREIRA, M. E. **Análise de seqüências de DNA cloroplástico de espécies do gênero *Capsicum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 15p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 37).

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 27p. (Embrapa Hortaliças, Documentos 94).

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG, 2006. 382p.

DeWITT, D.; BOSLAND, P. W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.

DOGAN, B.; DURAN, A.; HAKKI, E. E. Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. **Annales Botanici Fennici**, v. 44, p. 353-358, 2007.

ESHBAUGH, W. H. A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). **Brittonia**, v. 22, p. 31-43, 1970.

ESHBAUGH, W. H. Genetic and biochemical systematic studies of chile peppers (*Capsicum* – Solanaceae). **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 102, n. 6, p. 396-403, 1976.

ESHBAUGH, W. H. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **New crops**. Wiley, New York. 1993. p. 132-139.

ESHBAUGH, W. H.; SMITH, P. G.; NICKRENT, D. L. *Capsicum tovarii* (Solanaceae), a new species of pepper from Peru. **Brittonia**, v. 35, p. 55-60, 1983.

EYRE-WALKER, A.; GAUT, R. L.; HILTON, H.; FELDMAN, D. L.; GAUT, B. S. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 4441-4446, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

GIANFILIPPI, F. **Studio della diversità molecolare in popolazioni locali italiane di lenticchia (*Lens culinaris* Medik) tramite marcatori ISSR**. Tesi de láurea Agrária, Università degli studi della Tuscia, Tuscia. 2006.

GONZALES, A.; WONG, A.; DELGADO-SALINAS, A.; PAPA, R.; GEPTS, P. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Science**, v. 45, n. 2, p. 606-615, 2005.

INCE, A. G.; KARACA, M.; Onus, A. N. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. **Biochemical Genetics**, v. 48, p. 83-95, 2010.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

JETT, S. C. Comment of Pickersgill's "Cultivated plants as evidence for cultural contacts". **American Antiquity**, v. 38, p. 223-225, 1973.

KOCHIEVA, E. Z.; RYZHOVA, N. N.; VAN DOOIJEWERT, W.; BOUKEMA, I.W.; ARENS, P.; VOORRIPS, R. E. Assessment of genetic relationships in the genus *Capsicum* using different DNA marker systems. European Association for Research on Plant Breeding (EUCARPIA), Wageningen, Netherlands, **Proceedings of the XIIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant**, Noordwijkerhout, Netherlands, p. 44-50, 2004.

MICHELAN, V. S.; TREVISAN, R.; SILVA, C. R. M.; SOUZA, R. F.; LUCENO, M.; VANZELA, A. L. L. Morphological and genomic characterization of *Rhynchospora tenuis* complex (Cyperaceae) and its taxonomic implications. **Rodriguesia**, v. 63, p. 775-784, 2012.

MOSES, M.; UMAHARAN, P. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Capsicum chinense*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 137, p. 250-262. 2012.

NASCIMENTO FILHO, H. R.; BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. II. Hábitos e formas de uso. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 561-568, 2007.

PICKERSGILL, B. Archaeological record of chili-peppers (*Capsicum* spp) and sequence of plant domestication in Peru. **American Antiquity**, 34: 54-61, 1969.

PICKERSGILL, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (Genus *Capsicum*). **Evolution**, v. 25, p. 683-691, 1971.

PICKERSGILL, B. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. **Biologisches Zentrablatt**, v. 107, p. 381-389, 1988.

PICKERSGILL, B. Domestication of plants in the Americas: insights from mendelian and molecular genetics. **Annals of Botany**, v. 100, p. 925-940, 2007.

PICKERSGILL, B.; HEISER, C. B.; McNEILL, J. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.). **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, 1979. p. 679-700.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 200p.

SAS INSTITUTE INC.. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.

SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR, C. B. Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 362-368, 1951.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics a biometrical approach**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Publishing, 1980. 633p.

TAM, S. M; LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; SAGE-PALLOIX, A. M.; MHIRI, C.; GRANDBASTIEN, M. A. LTR-retrotransposons Tnt1 and T135 markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 973-989, 2009.

TEWKSBUURY J. J.; NABHAN, G. P. Seed dispersal - Directed deterrence by capsaicin in chillies. **Nature**, v. 412, p. 403-404, 2001.

THUL, S. T.; DAROKAR, M. P.; SHASANY, A. K.; KHANUJA, S. P. S. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. **Molecular Biotechnology**, v. 51, p. 137-147, 2012.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 6, p. 1409-1418, 2001.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 176-183, 1994.

**CAPÍTULO 2. TRANSFERIBILIDADE DE *PRIMERS* MICROSSATÉLITES DE
Capsicum annuum PARA *C. frutescens* E *C. chinense***

**CHAPTER 2. TRANSFERABILITY OF MICROSATELLITE PRIMERS FROM
Capsicum annuum TO *C. frutescens* AND *C. chinense***

RESUMO

As espécies de pimentas *Capsicum frutescens* (inclui a popular pimenta malagueta) e *C. chinense* (representada por vários tipos de pimentas: de-cheiro, de-bode, cumari-do-Pará, habanero e biquinho) são preferencialmente consumidas e cultivadas no Brasil. Vários acessos de ambas as espécies são conservados no banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Hortaliças. A transferibilidade de *primers* microssatélites (SSR) entre espécies aparentadas é uma estratégia que permite realizar a caracterização dessas coleções, uma vez que não existem *primers* SSR desenvolvidos especificamente para *C. frutescens* e *C. chinense*, de forma a potencializar o uso desse germoplasma. O objetivo desse trabalho foi analisar a transferibilidade de um conjunto de *primers* de *C. annuum* para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense*. Dos 185 *primers* SSR de *C. annuum* (CA) analisados, 116 (62,7%) apresentaram transferibilidade para as duas espécies. Destes, 19 (16,37%) apresentaram-se polimórficos com uma média de 2,89 alelos por *loco* para *C. frutescens* e 35 (30,17%) mostraram polimorfismo com uma média de 3,3 alelos por *loco* para *C. chinense*. Além disso, com a análise dos resultados, pôde-se verificar que 17 destes *primers* podem ser utilizados para se analisar amostras constituídas pelas duas espécies estudadas. Os marcadores microssatélites CA transferidos e polimórficos para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* possibilitarão estudos da variabilidade genética, identificação de duplicatas, estudo da filogenia e seleção assistida por marcadores

Palavras-chaves: pimentas, banco de germoplasma, polimorfismo, melhoramento genético.

ABSTRACT

The pepper species *Capsicum frutescens* (includes the popular malagueta) and *C. chinense* (represented by several types of peppers, such as de-cheiro, de-bode, cumari-do-Pará, habanero and biquinho) are typically grown and consumed in Brazil. Several accessions of both species are conserved in the active germplasm bank (BAG) of Embrapa Vegetables. Transferability of microsatellite primers (SSR) between related species is a strategy that allows characterizing these collections, since no SSR primers specific for *C. frutescens* and *C. chinense* has been developed. The aim of this study was to analyze the transferability of a primer set of *C. annuum* to the species *C. frutescens* and *C. chinense*. From the 185 *C. annuum* SSR primers (CA) analyzed, 116 (62.7%) were transferable to those two species. Nineteen of them (16.37%) were polymorphic for *C. frutescens* with an average of 2.89 alleles per *locus* and 35 (30.17%) showed polymorphism for *C. chinense* with an average of 3.3 alleles per *locus*. Furthermore, it could be verified that 17 of those primers can be used to analyze samples composed by the two species. The polymorphic microsatellite *loci* transferred to *C. frutescens* and *C. chinense* will make studies of genetic variability possible, with a number of applications such as the identification of duplicates, phylogeny studies and marker assisted selection.

Key words: peppers, germplasm bank, polymorphism, breeding.

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um importante centro secundário de espécies domesticadas do gênero *Capsicum*, possuindo considerável diversidade em *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense* (REIFSCHNEIDER, 2000). Destas, *C. frutescens* (a popular pimenta malagueta) é uma das espécies de pimenta mais consumidas e comercializadas no Brasil e *C. chinense* (representada pelas pimentas-de-cheiro, de-bode, cumari-do-Pará, habanero e biquinho) é classificada como a mais brasileira das espécies domesticadas, sendo a Bacia Amazônica sua área de maior diversidade. Ambas as espécies possuem uma gama de acessos no BAG da Embrapa Hortaliças. A caracterização da variabilidade genética dessas espécies por meio de marcadores moleculares auxiliará o programa de melhoramento da Embrapa, uma vez que poderá detectar dissimilaridade entre diferentes acessos em nível de DNA.

Os marcadores do tipo microssatélites ou *Single Sequence Repeats* (SSR) são sequências curtas repetitivas que ocorrem frequentemente nos genomas eucariotos. Em comparação a outros tipos de marcadores moleculares, SSR apresenta boa confiabilidade, reprodutibilidade, discriminação e boa relação custo benefício (SMITH et al., 1997). Devido a sua distribuição onipresente nos genomas e ao seu alto polimorfismo, os SSR têm sido amplamente utilizados em estudos sobre diversidade genética, evolução, construção de mapas genéticos, *quantitative trace loci* (QTL) e mapeamento genético (PENG et al., 2000; LEE et al., 2004).

Dentre os diferentes marcadores, os SSR são ferramentas indicadas para uma análise genômica detalhada. Esses marcadores caracterizam-se por serem multialélicos, bastante estáveis e co-dominantes, ou seja, em cada loco analisado é possível distinguir homozigotos e heterozigotos, assim como identificar o genótipo específico de cada indivíduo de acordo com os alelos presentes na população estudada. Uma vez obtidos os *primers* informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (FERREIRA et al., 2007).

O desenvolvimento de SSR é tradicionalmente feito por isolamento de bibliotecas genômicas da espécie de interesse (KALIA et al., 2011). Por outro lado, diversos estudos demonstram semelhança em sequências de DNA em regiões localizadas nas bordas das sequências repetitivas, constituintes dos microssatélites, em espécies diferentes (CIAMPI et

al., 2008), indicando a possibilidade de se transferirem *primers* microssatélites entre espécies aparentadas.

A transferibilidade de marcadores SSR entre espécies vegetais aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família tem sido avaliada como uma estratégia bastante oportuna devido ao gasto de tempo e alto custo financeiro para o desenvolvimento desses marcadores. Vários trabalhos têm demonstrado transferibilidade elevada de marcadores SSR para espécies dentro do mesmo gênero como relatado, por exemplo, em *Cucumis* (RITSCHER et al., 2004), *Arachis* (BRAVO et al., 2006) e até mesmo em *Capsicum* (YI et al., 2006; NAGY et al., 2007; INCE, et al., 2010). No entanto, o sucesso da transferibilidade pode variar dependendo das espécies trabalhadas. Espera-se, por exemplo, que a probabilidade de se obter transferibilidade seja inversamente proporcional à distância evolucionária entre as espécies (COTA et al., 2012).

No presente trabalho, objetivou-se analisar a transferibilidade de um conjunto de *primers* de *C. annuum* para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense*, de forma a possibilitar o estudo de materiais mantidos no BAG de *Capsicum* da Embrapa e contribuir para a conservação e uso desse germoplasma.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os doze acessos com maior variabilidade morfológica (Tabela 1) foram selecionados de uma coleção de 115 acessos de *C. frutescens* e 480 de *C. chinense* do BAG de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças com base na caracterização morfológica feita por meio de cinco descritores internacionais recomendados para frutos de *Capsicum* (IPGRI, 1995): cor na maturação, formato, posição, presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo e espessura da parede. Assim, foram selecionados quatro acessos de *C. frutescens* (CNPH 3891, CNPH 4266, CNPH 4353, CNPH 4364), seis acessos de *C. chinense* (CNPH 4315, CNPH 4316, CNPH 4327, CNPH 4328A, CNPH 4332, CNPH 4360) e ainda mais dois acessos de *C. chinense*, CNPH 4361 e CNPH 4325A, que apresentaram características morfológicas típicas das duas espécies estudadas, levantando dúvida quanto à classificação taxonômica.

Tabela 1. Caracterização morfológica dos frutos de doze acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Acesso (CNPB)	Espécie	Tipo	CM	Posição	Fruto		
					Formato	EP	PCA
3891	<i>C. frutescens</i>	Malagueta	laranja	ereta	alongado	0,4	não
4266	<i>C. frutescens</i>	Tabasco	vermelho	ereta	alongado	0,3	não
4353	<i>C. frutescens</i>	Malagueta	vermelho	ereta	alongado	0,5	não
4364	<i>C. frutescens</i>	Malagueta	vermelho	ereta	alongado	0,6	não
4361	<i>C. chinense</i>	Malagueta	laranja	ereta	alongado	0,9	sim
4325A	<i>C. chinense</i>	Similar a Malagueta	vermelho	ereta	alongado	0,8	sim
4315	<i>C. chinense</i>	Olho de peixe	vermelho	ereta	campanulado	0,5	sim
4316	<i>C. chinense</i>	Similar a Malagueta	laranja	pendente	campanulado	1,8	sim
4327	<i>C. chinense</i>	Similar a Habanero	laranja	pendente	triangular	2,9	sim
4328A	<i>C. chinense</i>	Similar a Bode	vermelho	pendente	retangular	3	sim
4332	<i>C. chinense</i>	Similar a Cayenne	vermelho	pendente	alongado	2,6	sim
4360	<i>C. chinense</i>	Murupi	amarelo	pendente	alongado	1,2	sim

CM (Cor do fruto na maturação); EP (Espessura da parede em mm); PCA (presença de constrição anelar).

Folhas de cada acesso foram coletadas e o DNA genômico extraído por meio do método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com diferentes padrões de DNA Lambda. Cada amostra foi, então, diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

Cento e oitenta e cinco pares de *primers* microssatélites de *C. annum* desenvolvidos em um programa de análise genômica de *Capsicum* no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (BUSO et al., 2000) foram avaliados.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em *C. frutescens* e *C. chinense* foi feita com mix contendo: 2,65 μl de água MilliQ; 1,3 μl de tampão 10X; 0,25 μl de MgCl₂ 50 mM; 1,3 μl de dNTPs 2,5 mM cada; 1,3 μl de BSA 2,5 mg/ml, 3 μl de primer a 0,9 mM; 0,2 μl de enzima Taq polimerase (5 U/μl) e mais 3 μl de DNA genômico a 3 ng/μl. As reações de amplificação ocorreram da seguinte forma: 94 °C por 5 min para desnaturação, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 72 °C por 10 min. A reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1,5% utilizando-se tampão tris-borato-EDTA 1X e, em seguida, PCR com os *primers* que

amplificaram produtos visíveis foram avaliados em gel de poliacrilamida a 5% corado com nitrato de prata, seguindo-se o protocolo de CRESTE et al. (2001).

A avaliação do tamanho das bandas (alelos) foi realizada manualmente, utilizando-se como comparativo o padrão de tamanho DNA Ladder 10 pb, sendo as bandas com seus respectivos tamanhos em pares de base anotados em planilha e analisados por meio da função *summary statistics* do software Power Marker (LIU, 2004), que contabilizou tamanho da amostra, número de observações (equivalente ao número de genótipos avaliados subtraído do número de genótipos faltantes), número de genótipos, disponibilidade (com relação às amostras não consideradas), número de alelos, frequência do alelo mais abundante, diversidade do gene (probabilidade de dois alelos escolhidos aleatoriamente serem diferentes, índice também denominado heterizogiosidade esperada), heterozigiosidade (heterozigiosidade observada; é a proporção de indivíduos heterozigotos na população) e conteúdo médio de informação polimórfica (PIC), uma medida relacionada a qualidade ou a capacidade do marcador em diferenciar os indivíduos por meio da sua informação de polimorfismos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se a ocorrência de transferibilidade para *C. frutescens* e *C. chinense* em 116 (62,7%) dos 185 *primers* SSR de *C. annuum* (CA) analisados. Os *primers* microssatélites desenvolvidos para *C. annuum* foram, portanto, transferíveis às duas espécies na maioria das vezes. Outros casos de sucesso na transferibilidade de *primers* microssatélites para espécies do mesmo gênero foram reportados, tal como em *Euterpe*, de *E. edulis* para *E. oleracea*, em que os sete *loci* testados apresentaram 100% de aproveitamento (OLIVEIRA et al., 2010) e em *Anacardium*, de *A. occidentale* para *A. humile*, tendo se verificado transferibilidade de todos os 11 *loci* analisados (COTA et al., 2012).

No presente estudo, dentre os *primers* transferíveis, 19 (16,37%) apresentaram-se polimórficos para *C. frutescens* (Tabela 2) e 35 (30,17 %) mostraram polimorfismo para *C. chinense* (Tabela 3). Taxas mais elevadas de polimorfismo foram obtidas por INCE et al. (2010), que detectaram a ocorrência de polimorfismos entre as espécies *C. annuum* e

Tabela 2. Primers transferíveis de *Capsicum annuum* para *C. frutescens*.

Primers (CA)	Motif	Foward primer/ reverse primer (5' - 3')	Allele number	Size range (bp)	Gene diversity (H_e)	Heterozigosity (H_o)	PIC
19	(TC) ₁₂	CCGCAATGGCAGTATGATCT/ CGGCTCTATCTACAACGGTG	4	98-104	0.69	1.00	0.63
20	(AG) ₂₇	CCGTAAGAAATCAAACCAC/ GCATGCACACATAAAACACTC	3	68-88	0.63	0.00	0.55
26	(AG) ₂₃	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ TGACTCAAATGCTCTCTGAA	5	100-124	0.69	0.75	0.65
27	(CA) ₁₂ (CT) ₁₇ ATCG(CT) ₉	GCAGAGGACCAGTTAGCATA/ TGTCTGAGTCCACGATGCT	3	128-132	0.63	0.50	0.55
29	(AG) ₂₁	TGGGTAAGGTAAGTACTAGTAG/ GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	2	114-126	0.50	0.00	0.38
39	(CT) ₁₃	CATCCATATATCGATCGGCT/ TTTCGACCATGTTCCAGATCC	3	88-98	0.63	0.00	0.55
41	(AG) ₂₇	GACATCAGTGTCTGCAA/ ACACTGGGTATGTTGTTGTA	3	152-172	0.63	0.00	0.55
49	(AG) ₂₁	CTATCTTCGCATATAGGCAG/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	2	130-132	0.38	0.00	0.30
52	(GT) ₁₄ (AG) ₁₄ TAGC(GA) ₁₀	TAGCAGAGGACCAGTTAGCA/ ATGTTCTGAGTCCACGATGC	3	114-130	0.59	1.00	0.51
56	(AG) ₂₃	CTTCGCATATAGGCAGATCA/ TCTCTGTGGCTGACTCAAAT	3	110-130	0.41	0.50	0.37
62	(AG) ₂₂	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ GGTCAGACTACGCTCTCTCA	4	78-84	0.66	0.50	0.60
79	(TC) ₂₆	CACTGGGTATGTTGTGTAA/ CCGTAAGAAATCATACCAC	3	90-110	0.63	0.00	0.55
88	(AG) ₂₂	AATGGATGTTCCCTTGCTTT/ CAACTGATCAACCATTCCGT	2	160-162	0.38	0.00	0.30
96	(AG) ₂₃	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	3	108-116	0.59	1.00	0.51
159	(AG) ₁₉	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA/ ATTGCTTTAGCTCAGAATGG	3	110-120	0.63	0.50	0.55
167	(TC) ₂₄	CATTCTTCTTCTCAAACG/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	2	80-84	0.38	0.00	0.30
172	(TC) ₉ GCTA(TC) ₁₄ (CA) ₁₃	ATGTTCTGAGTCCACGATGC/ CTTAGCAGAGGGCCAGTTAG	3	120-132	0.59	0.25	0.51
174	(CT) ₁₈	CCTGCATTACCATCTAGGA/ GGAGCCTTGCCATAACAGAT	2	252-254	0.50	0.00	0.38
178	(CT) ₂₅	CCCAACTCATTTAATTCCAC/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	2	160-162	0.38	0.00	0.30
Média	-	-	2,89		0,55	0,32	0,48

Tabela 3. Primers transferíveis de *Capsicum annuum* para *C. chinense*.

Primers (CA)	Motif	Foward primer/ reverse primer (5' - 3')	Allele number	Size range (bp)	Gene diversity (H_e)	Heterozigosity (H_o)	PIC
1	(AG) ₁₉	TGGCATGGTACTTCTTAGCA/ AGACACCAAGCCATCAATTA	4	110-116	0.65	0.88	0.58
11	(CT) ₁₂	GTTGTTATCTCCTTTTCCCA/ AAATGTTAGGAACTCACCAG	5	78-94	0.66	0.25	0.62
19	(TC) ₁₂	CCGCAATGGCAGTATGATCT/ CGGCTCTATCTACAACGGTG	2	98-100	0.22	0.25	0.19
20	(AG) ₂₇	CCGTAAAGAAATCAAACCAC/ GCATGCACACATAAACACTC	3	68-90	0.32	0.13	0.29
24	(TC) ₁₁	GTTATCTCCTTTTCCCAATC/ AAATGTTAGGAACTCACCAG	5	84-94	0.63	0.25	0.59
26	(AG) ₂₃	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ TGACTCAAATGCTCTCTGAA	4	100-120	0.73	0.63	0.68
27	(CA) ₁₂ (CT) ₁₇ ATCG(CT) ₉	GCAGAGGACCAGTTAGCATA/ TGTTCTGAGTCCACGATGCT	5	120-130	0.68	0.80	0.64
29	(AG) ₂₁	TGGGTAAGGTAAGTACTTAGTAG/ GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	3	114-128	0.40	0.25	0.35
41	(AG) ₂₇	GACATCAGTGTTCTGCAAA/ ACACTGGGTATGTTGTTGTA	3	152-174	0.32	0.13	0.29
49	(AG) ₂₁	CTATCTTCGCATATAGGCAG/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	3	120-128	0.61	0.86	0.53
54	(AG) ₂₅	GCAGAACATACTGAGACAGA /CTAAGTGGTCATTCGAAGAG	2	136-138	0.22	0.00	0.19
55	(GT) ₇ (GA) ₂₃	CAGCGCTAAACAGAAGGAA/ CTCTCTAAACACAAACGGCT	2	114-140	0.38	0.00	0.30
56	(AG) ₂₃	CTTCGCATATAGGCAGATCA/ TCTCTGTGGCTGACTCAAAT	3	110-120	0.54	0.13	0.45
62	(AG) ₂₂	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ GGTCAGACTACGCTCTCTCA	4	78-84	0.49	0.38	0.46
66	(TC) ₁₈	CAACCCATACAAATCATCCA/ AGGGTTGAGCAATTCATAGA	2	122-124	0.38	0.00	0.30
67	(GA) ₂₅	CCGAGAAAATGCACACAA/TG ACATACTCTTCCTACAGCTA	4	90-104	0.68	0.13	0.62
75	(TC) ₂₆	CAACACTAAGTGGTCATTCG/ CTGAGACAGAAATTCTTGCT	2	136-138	0.38	0.00	0.30
79	(TC) ₂₆	CACTGGGTATGTTGTTGTA/ CCGTAAAGAAATCATAACCAC	3	90-112	0.32	0.13	0.29

Tabela 3. Continuação...

80	(TC) ₂₀ (TG) ₇	CTCAAGTGTGCCAGGTGATT/ GAGAGACAGGAAGAGACGT ACA	2	106-122	0.22	0.00	0.19
88	(AG) ₂₂	AATGGATGTTCCCTTGCTTT/ CAACTGATCAACCATTCCGT	4	150-162	0.67	0.38	0.61
94	(GT) ₅ (AG) ₂₂	ACACAAAATGTCCCCGAA/ CCATTGACAAGGACAATTCT	2	112-114	0.22	0.00	0.19
95	(AG) ₂₀	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	4	108-120	0.66	0.43	0.62
96	(AG) ₂₃	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	4	108-120	0.70	0.88	0.64
98	(AG) ₂₀	CGAGCTAATGGCATGGTACT/ TCAGACACCAAGCCATCAAT	3	122-128	0.55	1.00	0.46
99	(AG) ₂₃	TTCGCATATAGGCAGATCAA/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	3	120-130	0.54	0.13	0.45
101	(AG) ₁₇	TGATTAGGGCGTAGGGTTTA/ TATTCCTCTCACCTCCGCT	2	130-134	0.22	0.00	0.19
105	(AG) ₂₀	CTTCGCATATAGGCAGATCA/ GGCTGACTCAAATGCTCTCT	3	112-120	0.54	0.13	0.45
130	(AG) ₄₄	TGCATACGCTGGTGTGTC/ TTCAGCTGTGGTTATGGG	3	112-126	0.55	0.25	0.46
131	(AG) ₂₆	AAATGCACACAAAAACAC/ AATATGACCACATTTGTG	3	114-130	0.66	0.14	0.59
136	(AG) ₁₆	GTGGACTAACAGACTCAACG/ CTGATGATGCAGAACATGAT	2	150-156	0.47	0.00	0.36
140	(GA) ₁₂	GTGTGTCTGTGTGCATGAGC/ TTCAGCTGTGGTTATGGGA	3	90-114	0.55	0.38	0.46
159	(AG) ₁₉	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA / ATTGCTTTAGCTCAGAATGG	4	110-120	0.55	0.25	0.51
167	(TC) ₂₄	CATTCTCTTCTTCTCAAACG/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	5	80-130	0.66	0.63	0.62
172	(TC) ₉ GCTA(TC) ₁₄ (CA) ₁₃	ATGTTCTGAGTCCACGATGC/ CTTAGCAGAGGGCCAGTTAG	3	88-132	0.36	0.14	0.33
174	(CT) ₁₈	CCTGCATTCAACATCTAGGA/ GGAGCCTTGCCATAACAGAT	5	160-260	0.62	0.29	0.59
178	(CT) ₂₅	CCCAACTCATTTAATTCCAC/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	5	160-200	0.57	0.38	0.54
Média	-	-	3,30		0,50	0,29	0,44

C. frutescens com 34 pares de *primers* microssatélites, dentre os 45 pares testados, correspondendo a uma taxa de 75,55% de polimorfismo.

Embora, dentro de cada espécie, os *primers* que detectaram polimorfismos entre os acessos tenham sido diferentes, dezessete deles foram coincidentes, ou seja, foram polimórficos tanto entre os acessos de *C. frutescens* quanto entre os de *C. chinense*. Assim, considerando-se que a temperatura de anelamento utilizada neste estudo foi padronizada em 56 °C, ressalta-se que esses 17 *primers* podem ser utilizados para se analisar amostras constituídas pelas duas espécies estudadas. Dentre esses *primers*, CA49 se destacou por ter apresentado faixa de amplitude de alelos diferente entre as duas espécies (130-132 pb para *C. frutescens* e 120-128 pb para *C. chinense*), sendo, portanto, capaz de diferenciá-las. A amplitude de tamanho dos alelos foi de 68 a 254 e 68 a 260 pb para *C. frutescens* e *C. chinense*, respectivamente.

Um total de 55 alelos foi encontrado a partir dos 19 *loci* SSR polimórficos entre os acessos de *C. frutescens*. O número de alelos por *loco* variou de 2 a 4 com média de 2,89. O conteúdo de informação polimórfico (PIC) variou de 0,30 a 0,65. Os *loci* que apresentaram maior informação de polimorfismo foram: CA 62, CA 19, CA 26 com valores de 0,60; 0,63 e 0,65, respectivamente. Em dez dos 19 *loci* (CA 20, CA 29, CA 39, CA 41, CA 49, CA 79, CA 88, CA 167, CA 174, CA 178) a heterozigotidade observada (H_o) foi 0, correspondendo a 100% homozigotos e, em três locos (CA 19, CA 52, CA 96), verificou-se H_o igual a 1, correspondendo a 100% de indivíduos heterozigotos.

O número de alelos identificados entre os indivíduos amostrados de *C. chinense* foi de 119, com variação de 2 a 5 alelos por *loco* e média de 3,33. Observou-se em apenas 8 dos 35 *loci* (CA54, CA 55, CA 66, CA 75, CA 80, CA 94, CA 101, CA 136) H_o igual a 0 e 5 dos 35 *loci* (CA 1, CA 27, CA 49, CA 96, CA 98) apresentaram valores de H_o superiores à heterozigotidade esperada (H_e). Os *loci* analisados em *C. chinense* mostraram uma variação do PIC de 0,19 a 0,68, com nível elevado (superior a 0,5) de informação de polimorfismo, de 0,62 para CA 11, CA 67, CA 95 e CA 167 e de 0,64 e 0,68 para CA 96 e CA 26, respectivamente.

O valor médio do PIC obtido tanto para *C. frutescens* (0,48) quanto *C. chinense* (0,44) foi maior em relação ao observado por NAGY et al. (2007) em 14 linhagens de *C. annuum* avaliadas por meio de dois marcadores microssatélites (EPMS= 0,30 e GPMS= 0,27) e menor, quando o referido autor avaliou 33 genótipos de oito espécies domesticadas e silvestres de *Capsicum* (EPMS= 0,67 e GPMS= 0,68). Esse nível mais elevado de polimorfismo interespecífico encontrado foi, provavelmente, devido ao fato

de que os materiais usados eram muito diversificados. Marcadores microssatélites polimórficos desenvolvidos para mapeamento em *Capsicum* por LEE et al. (2004) a partir de bibliotecas genômicas demonstraram um elevado valor de PIC (0,75), sendo o dobro do valor obtido pelos mesmos autores com *primers* desenhados a partir do banco de dados GenBank (0,38).

A diferença entre o número de alelos nos indivíduos amostrados para *C. chinense* e *C. frutescens* foi nitidamente percebida nesse estudo. O menor número de alelos apresentados para *C. frutescens*, assim como o alto índice de homozigose encontrado apesar da escolha dos materiais estudados ter buscado a maior representatividade do germoplasma disponível (Tabela 1), é, possivelmente, reflexo da variabilidade genética apresentada por essa espécie, visto que *C. frutescens* é a espécie que apresenta a morfologia mais conservada, com poucas formas, tamanhos e cores de frutos em relação a *C. annuum*, *C. baccatum* ou *C. chinense* (DeWITT e BOSLAND, 2009). Ao contrário, *C. chinense* destaca-se pela ampla variabilidade morfológica, expressa na diversidade de formas, tamanhos e cores dos frutos, que são geralmente muito picantes e aromáticos (RIBEIRO et al., 2008).

2.4 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites CA desenvolvidos foram transferíveis e polimórficos para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* e poderão ser de grande valia para estudos da variabilidade genética, identificação de duplicatas, estudo da filogenia e seleção assistida por marcadores, entre outras aplicações.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAVO, J. P.; HOSHINO A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, 516-524, 2006.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida**. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and

transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1074-1077, 2008.

COTA, L. G.; MOREIRA, P. A.; MENEZES, E. V.; GOMES, A. S., ERICSSON, A. R. O.; OLIVEIRA, D. A.; MELO JR., A. F. Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4609-4616, 2012.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DeWITT, D.; BOSLAND, P. W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

INCE, A. G.; KARACA, M.; ONUS, A. N. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. **Biochemical Genetics**, v. 48; p. 83-95, 2010.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, p. 309-334, 2011.

LEE, J. M.; NAHM, S. H.; KIM, Y. M.; KIM, B. D. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 619-627, 2004.

LIU, J. Programa PowerMarker (versão 3.25). Disponível em <http://www.powermarker.net>, 2004.

NAGY, I.; STÁGEL, A.; SASVÁRI, Z.; RÖDER, M.; GANAL, M. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, v. 50, p. 668-688, 2007.

OLIVEIRA, M. S. P.; SANTOS, J. B.; AMORIM, E. P.; FERREIRA, D. F. Variabilidade genética entre acessos de açaizeiro utilizando marcadores microssatélites. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1253-1260, 2010.

PENG, J.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; RÖDER, M. S.; RONIN, Y. I.; LI, Y. C.; NEVO, E. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*:

genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasilinear linkage. **Genome Research**, v. 10, n. 10, p. 1509-1531, 2000.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Org.). **Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças, 2000. 133p.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 200p.

RITSCHER, P. S.; LINS, T. C. L.; TRISTAN, R. L.; BUSO, G. S. C.; BUSO, J. A.; FERREIRA, M. E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon. **BMC Plant Biology**, v. 4, 9-24, 2004.

SMITH J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p.163–173, 1997.

YI, G.; LEE, J. M.; LEE, S.; CHOI, D.; KIM, B. D. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 114, p.113–130, 2006.

**CAPÍTULO 3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, MOLECULAR E DO
TEOR DE CAPSAICINÓIDES EM ACESSOS E POSSÍVEIS HÍBRIDOS
NATURAIS DE *Capsicum frutescens* E *C. chinense***

**CHAPTER 3. MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND CAPSAICINOID
CHARACTERIZATION OF ACCESSIONS AND PUTATIVE NATURAL
HIBRIDS OF *Capsicum frutescens* AND *C. chinense***

RESUMO

As espécies domesticadas *Capsicum chinense* e *C. frutescens* são muito próximas geneticamente, sendo difícil a distinção dos acessos destas espécies, principalmente se for considerada a possibilidade de ocorrência de híbridos naturais interespecíficos. O objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização morfológica e molecular, bem como a determinação do teor de capsaicinóides nos acessos e possíveis híbridos naturais de *C. chinense* e *C. frutescens*. Foram utilizados 12 descritores morfológicos e alelos de 16 *loci* microssatélites. Para quantificar o teor de capsaicinóides, foram analisados os teores de capsaicina, dihidrocapsaicina, norcapsaicina e total de capsaicinóides nos frutos por cromatografia líquida de alta eficiência. Para confirmar a ocorrência de híbridos naturais, testes de viabilidade polínica e de compatibilidade genética foram realizados entre os acessos utilizados. Os resultados mostraram que embora as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* apresentem similaridades e características compartilhadas com sobreposição de caracteres morfológicos, são de fato distintas pelas análises com microssatélites. Testes de viabilidade polínica e de compatibilidade genética evidenciaram a possibilidade de ocorrência de híbridos naturais entre *C. chinense* e *C. frutescens*. Os acessos CNPH 4325A e CNPH 4361 apresentaram indicativos de serem resultados de hibridização natural, em especial o acesso CNPH 4361, que apresenta características típicas de ambas as espécies, observadas nas flores e nos frutos, ocupando uma posição intermediária tanto no dendrograma como no gráfico de dispersão na análise molecular. A ocorrência de alelos em heterozigose em seis *loci* e conteúdo de capsaicina, de 154 mil SHU, também sugeriram que o acesso CNPH 4361 é um híbrido natural entre *C. chinense* e *C. frutescens*.

Palavras-chaves: viabilidade polínica, caracterização reprodutiva, relações genéticas entre as espécies, identificação de espécies.

ABSTRACT

The domesticated species *Capsicum chinense* and *C. frutescens* are very close genetically and the morphologic distinction between these species is difficult, especially considering the possibility of natural interspecific hybridization. In this study, we aimed to perform morphological and molecular characterization, as well as the determination of capsaicinoids in the accessions and putative natural hybrids of *Capsicum chinense* and *C. frutescens*. Twelve morphologic descriptors and 16 microsatellite *loci* were used. The determination of capsaicinoids comprised the analysis of capsaicin, dihydrocapsaicin, norcapsaicin and total capsaicinoids in fruits by means of high performance liquid chromatography (HPLC). To confirm the occurrence of natural hybrids, pollen viability and genetic compatibility tests were carried out between the studied accessions. Although the species *C. chinense* and *C. frutescens* showed similarities, they were molecularly distinct by microsatellite analyzes. Pollen viability and genetic compatibility tests evidenced the possibility of natural hybridization between *C. chinense* and *C. frutescens*, especially for CNPH 4361, which presented similar characteristics of the both species in flowers and fruits, occupying an intermediate position in the dendrogram and in the scatter plot of the molecular analysis. The occurrence of heterozygous alleles at six *loci* and content of capsaicin of 154 thousand SHU also suggests CNPH 4361 is a natural hybrid between *C. chinense* and *C. frutescens*.

Key words: polen viability, reproductive characterization, genetic relationships among species, identification of species.

3.1 INTRODUÇÃO

A partir da introdução das pimentas e dos pimentões na Europa, botânicos e outros estudiosos se depararam com algumas dificuldades para esclarecer as delimitações de cada espécie, assim como as relações existentes dentro e entre elas. Dentre as dificuldades enfrentadas, ressalta-se o fato de que muitas das plantas estudadas se encontravam em processo de domesticação ou completamente domesticadas, submetidas, assim, à seleção humana. Nos processos artificiais de seleção, promove-se uma série de eventos, tais como cruzamentos intraespecíficos, propagação clonal, hibridação interespecífica, isolamento geográfico e, como consequência disso, são gerados cultivares ou landraces, que podem apresentar até mesmo condições como a poliploidia (PICKERSGILL, 1986a, 1986b). Todas essas alterações associadas à domesticação dificultaram sobremaneira os trabalhos taxonômicos e de identificação de espécies do gênero *Capsicum*.

A existência de uma íntima relação entre *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* fez com que essas espécies fossem tratadas como um único complexo (PICKERSGILL et al., 1979; ESHBAUGH et al., 1983). Essa terminologia (complexo) se refere à reunião de espécies com proximidade morfológica e reprodutiva extremamente alta, sendo difícil a discriminação em diferentes espécies. PICKERSGILL (1988) acreditava que as espécies que apresentavam pequenas diferenças morfológicas, de difícil distinção, também deveriam apresentar barreiras reprodutivas fracas ou desenvolvidas com imperfeição e, por esse motivo, questionava a identidade das espécies do complexo *annuum/chinense/frutescens* como distintas. Essa similaridade estimulou a elaboração de hipóteses sobre a real identidade de *C. chinense* e *C. frutescens* questionando se as duas se comportavam como entidades distintas ou não.

Dessa forma, PICKERSGILL (1977) propôs o agrupamento de *C. chinense* e *C. frutescens* em uma única espécie. ESHBAUGH (1993) apontaram que *C. chinense* e *C. frutescens* representariam variações dentro da mesma espécie, formando um contínuo morfológico por meio de uma sobreposição de caracteres. BARAL e BOSLAND (2004), citando outros autores, comentaram que a maior questão taxonômica envolvendo *C. chinense* e *C. frutescens* é se as duas espécies são realmente diferentes ou se são apenas variedades botânicas de uma mesma espécie. Mais recentemente, então, GUZMÁN et al. (2005) concluíram que as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* são, de fato, morfológicamente distintas, mas somente quando consideradas

sob uma perspectiva taxonômica e não sob uma perspectiva biológica. Por outro lado, resultados atuais, especialmente aqueles gerados por ferramentas moleculares e corroborados por dados morfológicos e reprodutivos concordam que *C. chinense* e *C. frutescens*, embora similares, representam duas espécies filogenética e reprodutivamente distintas (BARAL e BOSLAND, 2004; KOCHIEVA et al., 2004; ALBRECHT et al., 2012; IBIZA et al., 2012; BROW et al., 2013).

Durante a caracterização morfológica de acessos mantidos no BAG de *Capsicum* na Embrapa Hortaliças, observou-se que a maior parte dos acessos apresentavam frutos com características morfológicas específicas de *C. chinense* (flores eretas ou medianamente pendentes, frutos geralmente pendentes com formatos e cores altamente variados, parede externa espessa e presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo) ou de *C. frutescens* (flores exclusivamente eretas, frutos exclusivamente eretos, alongados, vermelhos, picantes, com parede externa muito fina e sem constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo), podendo ser claramente diferenciados e, assim, classificados. No entanto, alguns acessos, como CNPH 4361 e CNPH 4325A, reuniram características específicas de ambas as espécies (flores eretas, frutos eretos, de forma alongada, vermelhos quando maduros, parede externa mediana e presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo), sugerindo a possibilidade de se tratarem de híbridos naturais.

A possibilidade de formação de híbridos entre *C. chinense* e *C. frutescens* foi comprovada desde trabalhos mais antigos (SMITH e HEISER JUNIOR, 1957; ESHBAUGH, 1970; PICKERSGILL et al., 1979; PICKERSGILL, 1984, 1988) até trabalhos mais recentes (BARAL e BOSLAND, 2004; MELO et al., 2010; STELARI et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011; LIJUN e XUEXIAO, 2012). Um estudo comparativo entre os possíveis híbridos identificados no BAG de *Capsicum* e outros acessos representativos da diversidade existente em *C. frutescens* e *C. chinense*, realizados por meio de caracterização morfológica, determinação do teor de capsaicinóides e da aplicação de marcadores microssatélites poderiam, em tese, verificar a hipótese de hibridização natural nos acessos CNPH 4361 e CNPH 4325A.

Adicionalmente, a avaliação da capacidade reprodutiva desses materiais por meio da análise da viabilidade polínica seria um indicativo da distância genética entre os parentais, podendo assim proporcionar maior entendimento sobre a relação entre as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* e, em especial, esclarecer se a hibridização entre essas duas espécies poderia originar um indivíduo potencialmente fértil.

A viabilidade do pólen é considerada uma etapa decisiva na fertilização, pois indica a capacidade do grão de pólen em germinar no estigma da flor e fertilizar o óvulo (DAFNI, 1992). Informações sobre a viabilidade do pólen são essenciais para estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de plantas, permitindo a confirmação e compreensão dos resultados relatados de certos cruzamentos. De um modo geral, a viabilidade do pólen de um híbrido varia desde valores muito baixos, sugerindo a esterilidade masculina completa, para valores intermediários a alto, indicando a fertilidade da combinação. A viabilidade do pólen inferior a 50 % pode resultar a partir de uma falta de homologia cromossômica, provavelmente devido a distância genética entre as espécies, presença de translocações de heterozigotos ou devido à presença de genes de esterilidade masculina citoplasmática.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular, assim como do teor de capsaicinóides de acessos e possíveis híbridos naturais de *C. chinense* e *C. frutescens*. Testes de viabilidade polínica e compatibilidade genética foram realizados para confirmar a existência de dois possíveis híbridos naturais.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material genético

Foram analisados quatro acessos de *C. frutescens* (CNPB 3891, CNPB 4266, CNPB 4353, CNPB 4364), cinco de *C. chinense* (CNPB 4315, CNPB 4316, CNPB 4327, CNPB 4328A, CNPB 4332, CNPB 4360) e dois possíveis híbridos naturais destas duas espécies (CNPB 4325A e CNPB 4361), os quais foram multiplicados e caracterizados no telado da Embrapa Hortaliças (Tabela 1).

3.2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica foi feita utilizando-se descritores internacionais recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995): sete descritores para flor (número de flor por axila, posição da flor, cor da corola, cor da antera, cor do filamento, posição do estigma e margem do cálice) e cinco descritores para frutos (cor na maturação, formato, posição, presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo e espessura da parede). As espécies foram identificadas por meio de uma chave para identificação de

espécies e variedades domesticadas e semidomesticadas do gênero *Capsicum* de ocorrência no Brasil (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

3.2.3 Caracterização molecular

Folhas de cada acesso foram coletadas e o DNA genômico extraído utilizando-se o método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% de concentração, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com padrões de DNA Lambda de diferentes concentrações. Cada amostra foi diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

Reações de amplificação de amostras de DNA de cada acesso foram realizadas utilizando 16 pares de *primers* SSR selecionados a partir de 185 pares de *primers* microssatélites de *C. annuum* desenvolvidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (BUSO et al., 2000). As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram feitas em volume de 10 μl composta pela seguinte combinação de reagentes: 5,55 μl de água MilliQ; 1,0 μl de tampão 10X; 0,3 μl de MgCl₂ 50 mM; 0,8 μl de dNTPs 2,5 mM cada; 0,8 μl de BSA 2,5 mg/ml, 0,3 μl de *primer* a 5 μM; 0,25 μl de enzima Taq polimerase (5 U/μl) e mais 1 μl de DNA genômico a 3 ng/μl. As reações de amplificação ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 15 min para desnaturação, 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 1,30 min à 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 60 °C por 50 min. Os produtos da amplificação foram resolvidos em gel de poliacrilamida a 5% de concentração, de acordo com o protocolo de CRESTE et al. (2001), submetido a uma corrente elétrica ajustada para 90 watts por aproximadamente 60 minutos, sendo corado com nitrato de prata para a verificação do perfil eletroforético obtido.

As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2006), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo: DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j; NLC = Número de Locos Coincidentes; NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente) para encontros (0 1) e (1 0).

As matrizes de distâncias genéticas obtidas foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento dos acessos. Para a formação de grupos via dendrograma, foi utilizado como critério de agrupamento o método UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*). Foi realizada também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais usando o método das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

3.2.4 Determinação do teor de capsaicinóides

Os teores de capsaicina, dihidrocapsaicina, norcapsaicina e total de capsaicinóides nos frutos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se o método AOAC Official Method 995.03 (GRYPA, 2011) para determinação entre 750 e 650.000 Unidades de Calor Scoville (SHU).

Amostras dos frutos de cada um dos 12 acessos foram picadas e colocadas em estufa, com ventilação forçada de ar, para secagem durante 3 dias à temperatura de aproximadamente 60 °C. As amostras secas de cada acesso foram trituradas em moinho e pesadas em alíquota de 12,5 g e colocadas em um frasco ao qual adicionou-se 100 ml de etanol desnaturado. Os frascos foram acoplados a um condensador por refluxo e mantidos a 80 °C, durante 5 horas. Ao final deste período, o sobrenadante foi mantido em geladeira a 4° C, para posterior análise por HPLC.

As amostras foram filtradas através de uma membrana FG (fluoropore) em PTFE 0,45 µm de poro hidrofóbica, com auxílio de uma seringa de 5 ml, coletando-se 2 ml do material filtrado em frascos para HPLC. As condições do HPLC foram formadas por uma fase móvel composta por acetonitrila (40%) e água contendo 1% de ácido acético (60%), que atravessa uma fase estacionária formada pela coluna 150 mm x 4,6 mm x 5 m a um fluxo de 1,5 ml por minuto, resultando em um tempo total de corrida de 30 minutos para cada amostra. Foram injetados 20 µl de cada amostra em duplicatas, que percorreram a fase estacionária juntamente com a fase móvel. Os picos de capsaicinóides foram obtidos a partir de um detector do tipo fotodiodo (PDA-“photodiode array detector”) UV-vis (ultravioleta – visível), utilizando-se como referência o comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos capsaicinóides foi baseada na comparação do tempo de retenção dos picos relativos aos capsaicinóides encontrados em amostras de padrões comerciais de capsaicina e dihidrocapsaicina. A quantificação dos capsaicinóides foi feita a partir da área do pico obtida da injeção do

padrão de capsaicina, na concentração de 0,015 mg/ml e 0,15 mg/ml, a cada 6 amostras injetadas, conforme a fórmula a seguir:

$$C = (Pc/Ps) \times (Cs/Wt) \times (200/0,89) \times 16100$$

C – quantidade de capsaicina em SHU

Pc – Área do pico relativo a capsaicina

Ps - Área do pico relativo ao padrão de capsaicina

Cs – Concentração do padrão de capsaicina

Wt – Peso da amostra teste

3.2.5 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética

Para a análise da viabilidade dos grãos de pólen foram utilizados protocolos convencionais de GUERRA e SOUZA (2002), e SINGH (2002). Para cada acesso foram coletados, aleatoriamente, botões florais, em diferentes fases de desenvolvimento de plantas mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças. Esses botões foram fixados em etanol-ácido acético (3:1) por 24 h e estocados em álcool a 70% em refrigerador, até o momento da análise.

A viabilidade do pólen foi estimada no Laboratório de Citogenética da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia. Para cada acesso foram analisados pelo menos 1000 grãos de pólen/flor corados com orceína acética a 2%. Grãos com tamanhos visivelmente normais, protoplasma corado e com a exina intacta foram considerados como viáveis e aqueles vazios ou mal formados, como inviáveis.

Cruzamentos artificiais foram realizados entre quatro acessos de *C. chinense* (CNPH 4315, CNPH 4316, CNPH 4328 A, CNPH 4360) e quatro acessos de *C. frutescens* (CNPH 3891, CNPH 4353, CNPH 4364, CNPH 4266), com os dois acessos que levantaram dúvida quanto à classificação taxonômica (CNPH 4361 e CNPH 4325A) Para a obtenção da geração F1, foram realizadas todas as possíveis combinações artificiais entre os acessos, incluindo hibridizações recíprocas, conforme o esquema da Tabela 2.

As hibridações foram realizadas nas plantas mantidas em casa de vegetação na Embrapa Hortaliças. Os cruzamentos foram executados colocando-se o pólen extraído da planta usada como pai sobre o estigma da flor da planta usada como mãe. Antes dessa operação, a flor que recebeu o pólen foi emasculada (as anteras foram retiradas)

na fase de botão. Inicialmente, dez hibridizações por combinação foram efetuadas, mas nos casos em que a flor foi abortada após a polinização, a hibridação foi repetida. Até 20 hibridizações foram feitas para algumas combinações.

A porcentagem de pegamento, o número de frutos, o número de sementes e a germinação de sementes obtidas foram estimados para cada cruzamento realizado. A taxa de pegamento foi calculada por meio das anotações do número de hibridizações efetuadas e abortadas. Os frutos maduros na geração F1 foram colhidos e a produção de sementes em cada fruto foi registrada. A porcentagem de germinação das sementes F1 foi avaliada em laboratório. Duas plântulas F1 de cada combinação híbrida foram selecionadas e transplantadas para vasos em casa de vegetação, para verificar a produção de frutos e sementes na geração F2.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização morfológica

As características morfológicas verificadas nas flores e nos frutos dos doze acessos de *Capsicum*, bem como a classificação das espécies por meio da chave de identificação são apresentadas na Tabela 1.

Dentre as doze características de flores e frutos avaliadas, os quatro acessos de *C. frutescens* são os que mostram as menores variações. As flores desses acessos são eretas, corola branca esverdeada, posição do estigma excerto e apresentam variações no número de flores por axila (uma ou duas e às vezes três), cor da antera (azul pálido ou azul violeta), cor do filamento (violeta claro ou branco) e margem do cálice (inteira ou medianamente dentada). Os frutos são eretos, formato alongado, coloração vermelha quando maduros, sem constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo e com variação na espessura da parede de 0,3 a 0,6 mm. Entretanto, os seis acessos de *C. chinense* apresentam grande variabilidade para todas as características avaliadas, exceto para a cor da corola (branca esverdeada), margem do cálice medianamente dentada e presença de constrição entre o cálice e o pedúnculo, característica exclusiva desta espécie. Variações são observadas nas flores quanto ao número de flores por axila (uma ou duas e às vezes três), posição da flor (ereta e ou medianamente pendente), cor da antera (violeta ou amarela), cor do filamento (violeta ou branco) e posição do estigma (excerto ou mesmo nível). Os frutos apresentam variações na coloração quando maduros (amarelo, laranja ou vermelho), posição (ereta ou pendente), formato (alongado, campanulado, retangular ou triangular) e espessura da parede (0,5 a 3 mm).

Tabela 1. Caracterização morfológica das flores e dos frutos de doze acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

N ^o Acesso CNPq	Espécie *	Espécie **	Tipo	Flor							Fruto				
				NFA	Posição flor	Cor da corola	Cor da antera	Cor do filamento	Posição estigma	Margem cálice	CM	Posição	Formato	EP	PC
3891	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>	Malagueta	2	ereta	branca esverdeada	azul pálido	violeta claro	excerto	inteira	vermelho	ereta	alongado	0.4	não
4266	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>	Tabasco	1	ereta	branca esverdeada	azul pálido	violeta	excerto	intermed.	vermelho	ereta	alongado	0.3	não
4353	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>	Malagueta nha	2 (3)	ereta	branca esverdeada	azul violeta	branco	excerto	inteira	vermelho	ereta	alongado	0.5	não
4364	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>	Malagueta	2 (3)	ereta	branca esverdeada	azul violeta	violeta claro	excerto	inteira	vermelho	ereta	alongado	0.6	não
4361	?	<i>C. frutescens</i>	Similar a Tabasco	2 (3)	ereta	branca esverdeada	amarela	branco	excerto	intermed.	laranja	ereta	alongado	0.9	sim
4325A	?	<i>C. chinense</i>	Similar a Malagueta	2	ereta	branca esverdeada	violeta forte	violeta	mesmo nível	inteira	vermelho	ereta	alongado	0.8	sim
4315	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Olho de peixe	2	ereta	branca esverdeada	violeta	violeta	excerto	intermed.	vermelho	Ereta	campanulado	0.5	sim
4316	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Similar a Malagueta	2 (3)	ereta	branca esverdeada	violeta forte	violeta	excerto	intermed.	laranja	pendente	campanulado	1.8	sim
4327	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Similar a Habanero	1	intermed.	branca esverdeada	amarela	branco	excerto	intermed.	laranja	pendente	triangular	2.9	sim
4328 A	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Similar a Bode	2 (3)	ereta , intermed.	branca esverdeada	amarela	violeta claro	excerto	intermed.	vermelho	pendente	retangular	3.0	sim
4332	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Similar a Cayenne	2 (3)	ereta, intermed.	branca esverdeada	amarela	violeta claro	excerto	intermed.	vermelho	pendente	alongado	2.6	sim
4360	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>	Murupi	2	Ereta	branca esverdeada	amarela	branco	mesmo nível	intermed.	amarelo	pendente	alongado	1.2	sim

NFA (Número de flores por axila), CM (Cor do fruto na maturação); EP (Espessura da parede em mm); PC (presença de constricção anelar).

*Espécies identificadas pela caracterização morfológica.

**Espécies identificadas pela caracterização molecular.

Os acessos CNPH 4361 e CNPH 4325A, possíveis híbridos naturais, reuniram características de ambas as espécies observadas nas flores (posição ereta, corola branca esverdeada, cor do filamento branco ou violeta, posição do estigma excerto ou mesmo nível, margem do cálice inteira ou medianamente dentada) e nos frutos (posição ereta, formato alongado, vermelho ou laranja quando maduro, espessura da parede mediana de 0,8 a 0,9 mm e presença de constrição anelar entre o cálice e o pedúnculo).

3.3.2 Caracterização molecular

A análise de agrupamento realizada conforme as distâncias genéticas (Figura 1) apresenta nítida separação dos 12 acessos em 2 grupos distintos com alto valor de dissimilaridade genética (0,84). Os acessos típicos de *C. frutescens* (CNPH 3891, CNPH 4266, CNPH 4353, CNPH 4364) e o acesso CNPH 4361, um dos possíveis híbridos, foram alocados no grupo localizado na parte superior do dendrograma. O outro grupo englobou os tipos varietais de *C. chinense* (CNPH 4315, CNPH 4316, CNPH 4327, CNPH 4328A, CNPH 4332 e CNPH4360) e o acesso CNPH 4325A, também um possível híbrido. Os dois possíveis híbridos ficaram em posições distintas no gráfico. O acesso CNPH 4361 foi agrupado com os acessos de *C. frutescens*, apresentando uma dissimilaridade genética relativamente alta (0,58) em relação ao material mais próximo (CNPH 4353), também visível no gráfico de dispersão (Figura 2). Já o acesso CNPH 4325A apresentou dissimilaridade genética consideravelmente baixa com relação ao grupo de acessos mais próximo (de 0,25 ao grupo formado por CNPH 4316 e CNPH 4360, acessos típicos da espécie *C. chinense*).

A análise dos alelos obtidos por meio de genotipagem (Tabela 2), verificou que, em alguns *loci*, os possíveis híbridos apresentaram uma mistura de alelos que ocorreram de forma exclusiva em cada espécie nos materiais estudados. Para o acesso CNPH 4361, essa mistura ocorreu em seis (CA 29, CA 56, CA 88, CA 167, CA 172 e CA178) dos 16 *loci* estudados e para o CNPH 4325A, somente em dois (CA 27 e CA 174). O acesso CNPH 4361 apresentou 16 alelos exclusivos para *C. frutescens* e seis exclusivos para *C. chinense*, enquanto CNPH 4325A apresentou dois e 17 exclusivos para *C. frutescens* e *C. chinense*, respectivamente.

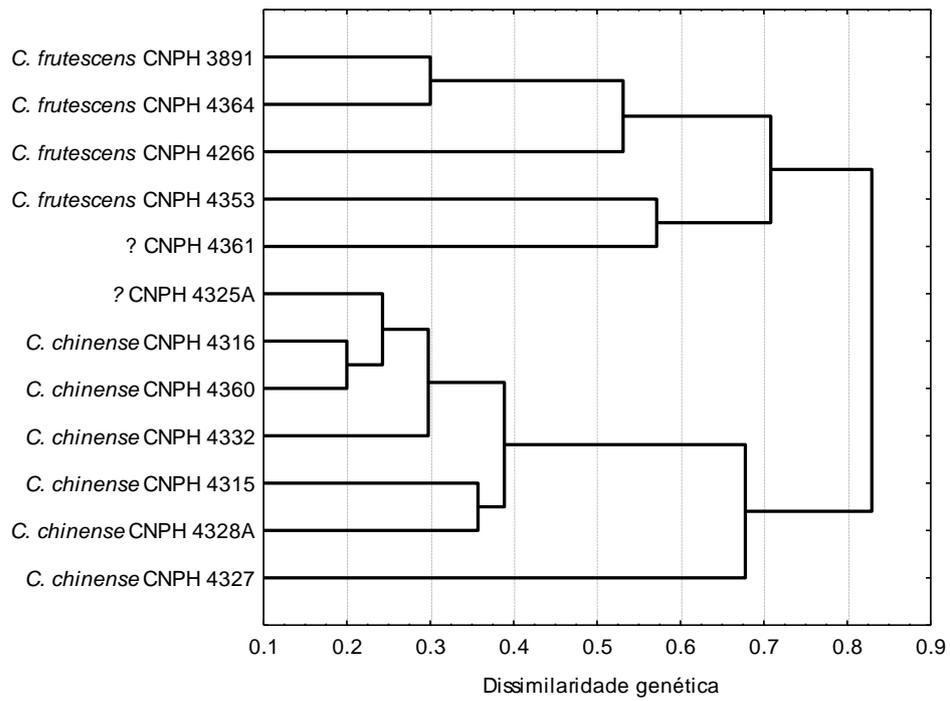
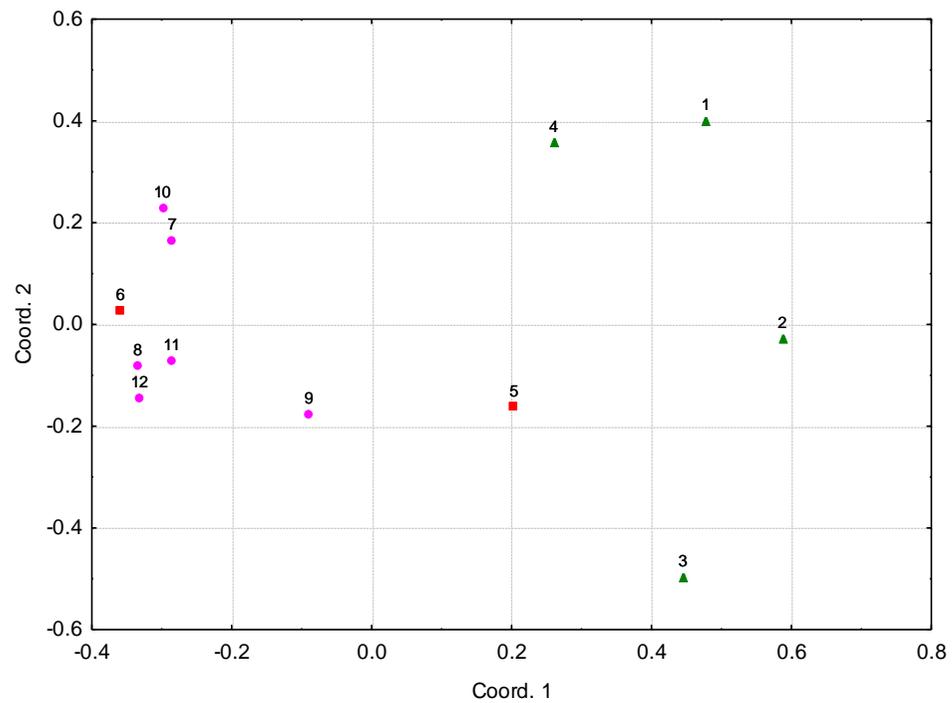


Figura 1. Análise de agrupamento de 12 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas a partir da coincidência alélica de 16 *loci* microssatélites.



Legenda	
1= CNPH 3891	7= CNPH 3825
2= CNPH 4266	8= CNPH 3825
3= CNPH 4353	9= CNPH 3825
4= CNPH 4364	10= CNPH 3825
5= CNPH 4361	11= CNPH 3825
6= CNPH 4325A	12= CNPH 3825

Figura 2. Dispersão gráfica de 12 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se coincidências alélicas de 16 *loci* microssatélites.

Tabela 2. Genotipagem de doze acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Primers (CA)	Alelos presentes (pb)											
	<i>C. frutescens</i>				supostos híbridos		<i>C. chinense</i>					
	CNPH 3891	CNPH 4266	CNPH 4353	CNPH 4364	CNPH 4361*	CNPH 4325A*	CNPH 4315	CNPH 4316	CNPH 4327	CNPH 4328 ^a	CNPH 4332	CNPH 4360
19	100/98	100/98	104/102	100/98	100/98	98/98	98/98	98/98	100/98	98/98	98/98	98/98
20	70/70	68/68	68/68	88/88	88/68	88/88	88/88	88/88	90/90	88/88	88/88	88/88
26	124/100	120/114	116/100	100/100	100/100	120/114	120/114	120/116	116/116	120/116	100/100	116/100
27	-	130/128	-	132/132	130/128	132/122	122/120	-	122/120	-	-	122/122
29	126/126	114/114	114/114	126/126	128/114	128/128	128/128	128/128	128/128	128/120	120/120	128/128
41	154/154	152/152	152/152	172/172	172/152	172/172	172/172	172/172	174/174	172/172	172/172	172/172
49	130/130	130/130	132/132	130/130	-	128/122	128/120	128/122	128/120	122/122	128/122	128/122
56	110/110	110/110	130/110	128/110	120/110	120/120	118/118	118/118	118/118	120/120	120/120	120/120
62	82/80	82/82	84/84	82/78	84/78	78/78	82/80	78/78	78/78	82/80	78/78	78/78
79	92/92	90/90	90/90	110/110	110/90	110/110	110/110	110/110	112/112	110/110	110/110	110/110
88	162/162	162/162	160/160	162/162	162/150	158/150	160/160	158/158	160/160	160/160	160/150	150/150
96	114/108	114/108	116/108	114/108	108/108	120/116	120/114	120/114	120/114	120/116	120/116	120/116
167	84/84	84/84	80/80	84/84	86/80	86/85	86/85	86/86	130/130	88/85	86/85	86/86
172	130/130	132/132	132/132	130/130	132/120	120/120	120/120	120/120	88/88	120/120	-	120/120
174	254/254	252/252	252/252	254/254	254/252	260/254	260/260	250/250	250/250	-	250/250	250/250
178	162/162	162/162	160/160	162/162	164/160	164/164	164/164	164/164	200/200	166/163	164/163	164/164

*Alelos com a cor vermelha ocorrem exclusivamente nos acessos estudados da espécie *C. frutescens* e azul, *C. chinense*.

3.3.3 Determinação do teor de capsaicinóides

O teor de capsaicinóides totais, norcapsaicina, dihidrocapsaicina e capsaicina encontrados para amostras dos frutos secos dos doze acessos estão apresentados na Tabela 3. Os resultados obtidos para o teor de capsaicinóides totais para a espécie *C. frutescens* (CNPH 3891, CNPH 4353, CNPH 4364, CNPH 4266) variaram de 150 a 234 mil SHU e para a espécie *C. chinense* (CNPH 4315, CNPH 4316, CNPH 4328 A, CNPH 4360) de 12,03 a 249 mil SHU.

Diferenças significativas foram observadas para o conteúdo de norcapsaicina, dihidrocapsaicina e capsaicina. O teor mais elevado de norcapsaicina foi observado na espécie *C. chinense* (CNPH 4316: 9.327 SHU) e de dihidrocapsaicina para a espécie *C. frutescens* (CNPH 4364: 76.249 SHU).

O acesso CNPH 4360 (*C. chinense*) apresentou o maior teor de capsaicina (200.243 SHU). Para a espécie *C. frutescens* o maior teor de capsaicina encontrado foi no acesso CNPH 4353 (169.166 SHU). Entretanto, o menor teor de capsaicina (9,92 SHU) foi obtido para o acesso CNPH 4328A (*C. chinense*). O possível híbrido CNPH 4361 mostrou conteúdo de capsaicina intermediário (154.008 SHU).

Tabela 3. Teor de capsaicinóides totais, norcapsaicina, dihidrocapsaicina e capsaicina de acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Nº Acesso CNPH	Tipo	Capsaicinóides Totais (SHU)	Norcapsaicina (SHU)	Dihidrocapsaicina (SHU)	Capsaicina (SHU)
3891	Malagueta	150.787,25 a	2.993,00 d	39.109,93 e	108.096,30 f
4266	Tabasco	196.271,70 c	2.786,89 d	53.343,49 c	140.153,25 d
4353	Malagueta	234.749,70 b	4.500,06 c	61.095,34 b	169.166,30 b
4364	Malagueta	202.250,55 c	5.433,14 b	76.249,34 a	120.580,05 e
4361	Similar a Tabasco	186.726,30 d	4.108,95 c	28.620,81 f	154.008,50 c
4325 A	Similar a Malagueta	183.014,30 d	1.310,30 e	41.595,72 e	140.120,05 d
4315	Olho de peixe	196.711,55 c	1.601,79 e	33.007,63 f	162.114,15 c
4316	Similar a Malagueta	203.393,40 c	9.327,01 a	30.941,88 f	163.136,50 c
4327	Similar a Habanero	222.127,65 b	6.230,31 b	41.889,71 e	174.019,60 b
4328 A	Similar a Bode	12,03 f	0 f	2,11 g	9,92 g
4332	Similar a Cayenne	9.742,00 f	1.000,00 f	2.575,36 g	7.177,84 g
4360	Murupi	249.640,20 a	2.419,40 d	46.989,70 d	200.243,10 a

Letras diferentes na coluna indicam médias significativamente diferentes pelo teste de Scott Knott a 5%. Os dados foram transformados para X+1 antes da realização das análises. Coeficiente de variação (CV) = 3,75% para Capsaicinóides totais, 10,86% para Norcapsaicina, 4,33% para Dihidrocapsaicina e 3,89% para Capsaicina.

3.3.4 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética

Elevada porcentagem de grãos de pólen viáveis foi observada para a maioria dos acessos de *C. chinense* (73,4% a 95%), com exceção do acesso CNPH 4327 (57%) (Tabela 4). Os acessos de *C. frutescens* apresentaram valores intermediários de viabilidade do pólen (64,7% a 88,6%). Os dois acessos CNPH 4361 e CNPH 4325A apresentaram resultados distintos. O acesso CNPH 4325A apresentou alta porcentagem de viabilidade de pólen (90,3%), enquanto o acesso CNPH 4361, destacou-se pela baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis (38,8%).

Tabela 4. Estimativa da viabilidade polínica de doze acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Nº Acesso CNPH	Espécie *	Flor**					Média Geral %
		1	2	3	4	5	
3891	<i>C. frutescens</i>	95,2	90,8	92,8	84,2	80,2	88,6
4266	<i>C. frutescens</i>	66,0	68,6	57,6	56,0	75,5	64,7
4353	<i>C. frutescens</i>	79,7	73,5	81,1	82,4	83,3	80,0
4364	<i>C. frutescens</i>	61,1	52,0	59,0	93,1	93,6	71,8
4361	<i>C. frutescens</i>	41,0	36,5	40,6	38,1	37,7	38,8
4325 A	<i>C. chinense</i>	94,7	86,4	94,0	85,5	90,7	90,3
4315	<i>C. chinense</i>	78,0	70,9	84,7	77,4	56,1	73,4
4316	<i>C. chinense</i>	95,4	92,8	94,9	97,5	94,6	95,0
4327	<i>C. chinense</i>	47,2	57,0	59,5	72,9	48,5	57,0
4328 A	<i>C. chinense</i>	88,7	94,7	94,2	94,6	94,4	93,3
4332	<i>C. chinense</i>	71,2	83,9	83,10	86,2	89,4	83,5
4360	<i>C. chinense</i>	93,8	89,4	91,5	90,8	92,4	91,6

*Espécies identificadas pela caracterização molecular

**Porcentagem do pólen viável em 1000 grãos de pólen/flor

Com relação à compatibilidade genética (Tabela 5), as hibridações intraespecíficas apresentaram variações na taxa de pegamento de 47,2% a 84,74%; número de frutos na F1 de 4 a 11; número de sementes na F1 de 1 a 8; germinação das sementes na F1 de 73% a 98,6%; número de frutos na F2 de 14 a 27 e número de sementes na F2 de 4 a 6. Nas hibridações interespecíficas, as variações observadas foram: taxa de pegamento de 53,2 a 83,2%; número de frutos na F1 de 7 a 10; número de sementes na F1 de 2 a 5; germinação das sementes na F1 de 75,2% a 85,1%; número de frutos na F2 de 11 a 38 e número de sementes na F2 de 4 a 7.

Tabela 5. Cruzamentos de acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma da Embrapa Hortaliças.

Combinações de hibridações	Cruzamentos ♀ x ♂	Taxa Média de Pegamento (%)	Médias na F1			Médias na F2	
			Nº fruto	Nº sementes /fruto	Germinação de sementes %	Nº fruto	Nº sementes /fruto
<i>C. frutescens</i> x <i>C. chinense</i>	3891 x 4325A 4353 x 4325A 4364 x 4325A 4266 x 4325A	83,2	7	5	71,8	38	4
<i>C. chinense</i> x <i>C. frutescens</i>	4325A x 3891 4325A x 4353 4325A x 4364 4325A x 4266	76,9	10	2	85,1	32	4
<i>C. chinense</i> x <i>C. chinense</i>	4315 x 4325A 4316 x 4325A 4328A x 4325A 4360 x 4325A	84,7	9	4	73	27	6
<i>C. chinense</i> x <i>C. chinense</i>	4325A x 4315 4325A x 4316 4325A x 4328A 4325A x 4360	70,3	11	4	79,7	22	5
<i>C. frutescens</i> x <i>C. frutescens</i>	3891 x 4361 4353 x 4361 4364 x 4361 4266 x 4361	73,4	7	8	70	14	4
<i>C. frutescens</i> x <i>C. frutescens</i>	4361 x 3891 4361 x 4353 4361 x 4364 4361 x 4266	47,2	4	1	98,6	16	6
<i>C. chinense</i> x <i>C. frutescens</i>	4315 x 4361 4316 x 4361 4328A x 4361 4360 x 4361	77,9	10	4	75,2	11	4
<i>C. frutescens</i> x <i>C. chinense</i>	4361 x 4315 4361 x 4316 4361 x 4328A 4361 x 4360	53,2	7	2	76,9	13	7

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Caracterização morfológica

No presente estudo, nos quatro acessos identificados morfológicamente como *C. frutescens* está presente o caracter posição da flor ereta e nos seis acessos de *C. chinense* a constrição anelar entre o pedicelo e cálice. Os acessos CNPH 4361 e CNPH 4325A apresentaram esses dois caracteres típicos das duas espécies estudadas. A ocorrência simultânea de características típicas de ambas espécies dificulta a classificação taxonômica.

Considerando a diversidade morfológica e estrutural observada em plantas cultivadas, PICKERSGILL (1988) comenta que, os caracteres morfológicos influenciados pela seleção humana, por si só, não são confiáveis ou não são suficientes para a delimitação de espécies. Entretanto, para cada espécie, existem outros caracteres (não influenciados pela seleção artificial) que podem ser considerados como diagnósticos para a maior parte dos acessos, pois apresentam estabilidade e podem, realmente, ajudar na discriminação das espécies, embora muitos deles não sejam exclusivos, mas compartilhados por mais de uma espécie. BARAL e BOSLAND (2004), por exemplo, apontam que os caracteres constrição do cálice e posição das flores são muito utilizados para diferenciar *C. chinense* de *C. frutescens*. Comentam que apenas o caracter posição da flor (flor ereta) está presente em 98% dos acessos de *C. frutescens*, porém esse mesmo caracter é compartilhado por 8% dos acessos pertencentes a *C. chinense*. Outra observação dos autores é que o caracter constrição anelar entre o pedicelo e cálice está presente em mais de 92% dos acessos de *C. chinense*, porém é compartilhado com 5% dos acessos de *C. frutescens*.

PICKERSGILL (1988) e WALSH e HOOT (2001) apontam que, como muitas espécies domesticadas possuem expressão diversificada de alguns caracteres e que, muitas vezes, existe uma sobreposição de caracteres morfológicos, torna-se muito difícil a correta identificação utilizando-se somente a caracterização com base na morfologia e, que essa tarefa exige a aplicação conjunta de outros métodos. Esse tipo de erro é comum para todas as espécies do gênero, mas especialmente freqüente para aquelas do complexo *annuum/chinense/frutescens*, com ênfase para *C. chinense* e *C. frutescens*.

3.4.2 Caracterização molecular

A formação de híbridos é um fator que pode ampliar os problemas relacionados

à identificação com base na caracterização morfológica e só podem ser identificados com a aplicação de outras técnicas, especialmente as moleculares.

A bibliografia registra vários exemplos de acessos que inicialmente foram identificados por descritores morfológicos e que tiveram a identificação revista depois de passarem por caracterização molecular. ALBRECHT et al. (2012), em coleções do USDA/ARS, apontam que alguns acessos, inicialmente identificados como *C. chinense*, foram reidentificados como *C. frutescens*.

BOSLAND e BARAL (2007), ao estudarem a pimenta Bhut Jolokia proveniente de Assam, na Índia, constataram que se tratava de uma das pimentas mais picantes do mundo, atingindo um milhão de SHU, bem como identificaram por meio de caracteres morfológicos como *C. chinense*. Entretanto, na análise molecular, a presença de marcadores RAPD específicos para as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* revelou uma hibridização interespecífica natural, com maior proximidade para *C. chinense* e que talvez tenha ocorrido introgressão genética de *C. frutescens*.

Neste contexto, a presença em heterozigose de alelos supostamente exclusivos de cada espécie é um forte indicativo da ocorrência de hibridização entre as duas espécies, principalmente no acesso CNPH 4361. Esse indicativo, no CNPH 4325A, não é tão forte, mas, a ocorrência de mistura dos alelos supostamente específicos de cada espécie, em pelo menos dois *loci*, nesse acesso, pode indicar que a hibridização tenha ocorrido em alguma geração anterior, seguida de algum processo de retrocruzamento recorrente para *C. chinense*. A produção de alguma quantidade de pólen viável, mesmo que inferior aos materiais não híbridos, confirma a possibilidade de que os híbridos tenham continuado o processo reprodutivo, avançando, assim, um certo número de gerações. A ocorrência de alelos específicos de *C. chinense* no acesso CNPH 4325A em número muito superior (17) ao de *C. frutescens* (2) permite compreender melhor o agrupamento coeso do acesso CNPH 4325A com *C. chinense* (0,25 de dissimilaridade genética). O mesmo não ocorreu com o acesso CNPH 4361, que apresentou agrupamento pouco coeso com *C. frutescens* (0,58 de dissimilaridade genética), explicado pela presença de grande número de alelos específicos de *C. chinense* (6), os quais se apresentaram em heterozigose com alelos específicos de *C. frutescens* em seis *loci*.

A análise molecular apresenta indicativos de que os acessos CNPH 4361 e CNPH 4325A tenham sido resultado de hibridização natural. É possível, no entanto, que um número diferente de gerações tenha ocorrido após esse evento em cada um dos possíveis híbridos estudados.

3.4.3 Determinação do teor de capsaicinóides

A pungência, conferida pela concentração de capsaicinóides, é uma das características e atributos de qualidade dos frutos mais importante e atrativa encontrada em ambas espécies. O grau sensorial de pungência produzido pela capsaicina tradicionalmente medido em Unidades de Calor Scoville (SHU) variam de zero a mais de 300.000 (pimentas muito picantes). O nível de pungência para a pimenta malagueta varia entre 80 a 164 mil SHU e as recordistas brasileiras em pungência são as da espécie *C. chinense*, conhecidas como pimenta cumari-do-Pará e pimenta murupi, cujos valores atingem cerca de 210 e 223 mil SHU, respectivamente (RIBEIRO et al., 2008; REIFSCHNEIDER et al., 2009).

Nesse sentido, embora *C. chinense* tenha apresentado materiais com baixíssima pungência, essa espécie apresentou acessos altamente pungentes, cuja pungência é equivalente ou até mesmo superior aos acessos de *C. frutescens*. O teor mais elevado de norcapsaicina foi observado em um acesso de *C. chinense* e de dihidrocapsaicina em um acesso de *C. frutescens*. Em geral, foi verificada uma tendência de maiores teores de dihidrocapsaicina em *C. frutescens* do que em *C. chinense* nos acessos estudados. Os possíveis híbridos apresentaram valores de capsaicina próximos aos de *C. frutescens*.

Nos Estados Unidos, a pimenta tabasco é considerada muito picante e a pungência varia entre 30.000 a 50.000 SHU (DeWITT e BOSLAND, 1996). Na Índia, a variedade Tezpur (*C. frutescens* var. Nagahari) parece ser a pimenta mais picante dessa espécie, que segundo MATHUR et al. (2000) atingiu um nível de pungência muito alto de 855.000 SHU.

No presente estudo, a pimenta mais picante foi a tipo murupi (CNPH 4360 – *C. chinense*) com teor de capsaicina de 200 mil SHU. O maior teor de capsaicina encontrado para a espécie *C. frutescens* foi para a pimenta malagueta (CNPH 4353) com 169 mil SHU. A pimenta tabasco (CNPH 4266) com 140 mil SHU apresentou um teor bem mais elevado que a pimenta tabasco dos Estados Unidos (entre 30.000 a 50.000 SHU). O acesso CNPH 4361 mostrou conteúdo de capsaicina de 154 mil SHU.

3.4.4 Avaliação da viabilidade polínica e compatibilidade genética

Apesar de uma forte semelhança morfológica entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens*, SMITH e HEISER JUNIOR (1957) compararam sistematicamente pela primeira vez as duas espécies e relatam que são distinguidas morfológicamente e apresentam uma barreira de esterilidade eficaz altamente desenvolvida, que as mantém

separadas. Os ensaios de hibridação entre as referidas espécies resultaram em uma produção muito baixa de sementes, bem como uma viabilidade muito baixa de pólen nas plantas da geração F1, que produziram sementes não viáveis. Entretanto, o nível de compatibilidade de cruzamento entre *C. chinense* e *C. frutescens* verificado por ESHBAUGH (1976) é pelo menos tão alto como o de *C. annuum* var. *annuum* e *C. annuum* var. *aviculare*. Esse autor comenta que *C. frutescens* e *C. chinense* estão mais próximos morfologicamente do que as duas variedades de *C. annuum*.

Os resultados obtidos no estudo sinalizam que a viabilidade de pólen do acesso CNPH 4361, um possível híbrido, foi a mais baixa (38,8%) em relação aos demais acessos avaliados. Esse acesso foi coletado na região Amazônica considerada área de maior diversidade da espécie *C. chinense* e de ocorrência de populações silvestres de *C. frutescens*, sendo mais um indicativo da possibilidade de formação de híbridos naturais entre *C. chinense* e *C. frutescens*. O acesso CNPH 4325A, que também apresentou possibilidade de ser um híbrido pela caracterização morfológica, mas que, na análise molecular mostrou-se altamente similar a *C. chinense*, apresentou alta viabilidade de pólen (90,3%), um indicativo de que a hibridização, caso tenha de fato ocorrido foi há um número considerável de gerações.

Na caracterização reprodutiva de híbridos interespecíficos realizada por MONTEIRO et al. (2011), o híbrido obtido do cruzamento entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* também apresentou viabilidade de pólen alta (94%), confirmando que estas duas espécies são compatíveis, possibilitando a produção de híbridos férteis. Entretanto, no estudo de BARAL e BOSLAND (2004), a viabilidade do pólen de progênies F1 derivadas das hibridações interspecíficas entre *C. chinense* e *C. frutescens* foi de 28% e das progênies F1 derivadas da hibridação intraspecífica dessas espécies foi de 75%.

Quando as diferenças morfológicas são sutis, as barreiras interespecíficas à troca de genes estão, também, imperfeitamente desenvolvidas. Dessa forma, a classificação de *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* como espécies distintas poderia ser questionada (PICKERSGILL, 1988).

A separação de *C. chinense* e *C. frutescens* em espécies distintas tem sido questionada por alguns pesquisadores (ESHBAUGH, 1993; PICKERSGILL, 1988). Verifica-se, dessa forma que esses conflitos têm confundido as relações biológicas e taxonômicas entre estas duas espécies.

Diante do exposto, as possíveis combinações de híbridos entre o CNPH 4631 com quatro acessos de *C. chinense* e com quatro de *C. frutescens* não apresentaram

diferenças na fertilidade, quando cruzados com qualquer uma das espécies. As observações verificadas nesse estudo preliminar de hibridizações tendem a concordar com as conclusões obtidas por GUZMÁN et al. (2005) que as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens* não são distintas sob uma perspectiva biológica.

3.5 CONCLUSÃO

Os resultados sinalizam que embora as espécies *C. chinense* e *C. frutescens* apresentem similaridades e características compartilhadas com sobreposição de caracteres morfológicos, são de fato molecularmente distintas pelas análises com base em marcadores microssatélites. Os acessos CNPH 4325A e CNPH 4361 coletados na região Amazônica, considerada área de maior diversidade da espécie *C. chinense* e de ocorrência de populações silvestres de *C. frutescens*, apresentam características morfológicas e alelos específicos de ambas espécies e indicativos de serem resultado de hibridização natural.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, E.; ZHANG, D.; SAFTNER, R. A.; STOMMEL, J. R. 2012. Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 517-538, 2012.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BOSLAND, P.W.; BARAL, J.B. 'Bhut Jolokia' - the world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. **HortScience**, v. 42, n. 2, p. 222-224, 2007.

BROWN, C. H.; CLEMENT, C. R.; EPPS, P.; LUEDELING, E.; WICHMANN, S. The Paleobiolinguistics of domesticated chili pepper (*Capsicum* spp.). **Ethnobiology Letters**, v. 4, p. 1-11, 2013.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida**. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.;

- REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.19, n. 4, p. 299-306, 2001.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG, 2006. 382p.
- DAFNI, A. **Pollination ecology – a practical approach**. Oxford University Press, New York, 1992. 250p.
- DeWITT, D.; BOSLAND, P. W. **Peppers of the world: an identification guide**. Berkeley: Ten Speed Press, 1996. 219p.
- ESHBAUGH, W. H. A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). **Brittonia**, v. 22, p. 31-43, 1970.
- ESHBAUGH, W. H. Genetic and biochemical systematic studies of chile peppers (*Capsicum* – Solanaceae). **Bulletin Torrey Botanical Club**, v. 102, n. 6, p. 396-403, 1976.
- ESHBAUGH, W. H.; GUTTMAN, S. I.; McLEOD, M. J. The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species. **Journal Ethnobiology**, v. 3, n. 1, p. 49-54, 1983.
- ESHBAUGH, W. H. History and exploitation of a serendipitous new crop discovery. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **New crops**. Wiley, New York. 1993. p. 132-139.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.
- GRYPA, R. Spices and other condiments. In: HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists International**. AOAC, Gaithersburg, Maryland, USA. 18th edition (Current Through Revision 4), cap. 43, p.14-15, 2011.
- GUERRA, M.; SOUZA M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC-Editora, 2002. 131p.
- GUZMÁN, F. A.; AYALA, H.; AZURDIA, C.; DUQUE, M. C.; DE VICENTE, M. C. AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala: home gardens as an option for conservation. **Crop Science**, v. 45, p. 363-370, 2005.
- IBIZA, V. P.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; NUEZ, F. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. **Genetic Resources Crop Evolution**, v. 59, p. 1077-1088, 2012.
- INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.
- KOCHIEVA, E. Z.; RYZHOVA, N. N.; VAN DOOIJEWERT, W.; BOUKEMA, I.W.; ARENS, P.; VOORRIPS, R. E. Assessment of genetic relationships in the genus

Capsicum using different DNA marker systems. European Association for Research on Plant Breeding (EUCARPIA), Wageningen, Netherlands, **Proceedings of the XIIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and eggplant**, Noordwijkerhout, Netherlands, p. 44-50, 2004.

LIJUN, O.; XUOXIAO, Z. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 752-757, 2012.

MATHUR, R., DANGI, R. S.; DASS, S. C., MALHOTRA, R. C. The hottest chilli variety in India. **Current Science**, v. 79, p. 287–288, 2000.

MELO, D. M.; CHARLO, H. C. O.; BOTELHO, A. P.; CASTOLDI, R.; BRAZ, L.T. Cruzamentos interespecíficos entre *Capsicum chinense* e *C. frutescens*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, S2598-S2603, 2010. *Hortic. bras.*, v. 28, n. 2 (Suplemento - CD Rom), julho 2010 S2602

MONTEIRO, C. E. S.; PEREIRA, T. N. S.; CAMPOS, K. P. de. Reproductive characterization of interspecific hybrids among *Capsicum* species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 241-249, 2011.

PICKERSGILL, B. Taxonomy and the origin and evolution of cultivated plants in the New World. **Nature**, v. 268, p. 591–595, 1977.

PICKERSGILL, B. Migration of chili peppers, *Capsicum* spp, in the Americas. In: STONES, D. (Ed.). **Pre-Columbian Plant Migration**. Papers of the Peabody Museum of Archaeology and Ethnology Vol.76. Cambridge: Harvard University Press, 1984. p. 106-123.

PICKERSGILL, B. Domestication and its taxonomic consequences. **Acta Horticulturae**, v. 182, p. 319-327. 1986a.

PICKERSGILL, B. Evolution of hierarchical variation patterns under domestication and their taxonomic treatment. In: STYLES, B.T. (Ed.). **Infraespecific classification of wild and cultivated plants**. Systematics Association Special Volume, n. 29. Oxford: Oxford University Press, 1986b. p.191-209.

PICKERSGILL, B. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. **Biologisches Zentrablatt**, v. 107, p. 381-389, 1988.

PICKERSGILL, B.; HEISER, C. B.; McNEILL, J. Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: HAWKES, J. G.; LESTER, R. N.; SKELDING, A. D. (Ed.). **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press, 1979. p. 679-700.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 200p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Brazilian *Capsicums*: Early History and Future Prospects. **Chronica Horticulturae**, v. 49, n. 3, p. 20-21, 2009.

SAS INSTITUTE INC.. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Carolina, Cary. 1989.

SINGH, R. J. 2002. **Plant Cytogenetics.** Boca Raton: CRC Press. 488 p.

SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR., C.B. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 84, n. 6, p. 413-420, 1957.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

STELLARI, G. M.; MAZOUREK, M.; JAHN, M. M. Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of *Capsicum*. **Heredity**, v. 104, p. 460 - 471, 2010.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 6, p. 1409-1418, 2001.

**CAPÍTULO 4. VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Capsicum frutescens* COM
BASE EM CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES**

**CHAPTER 4. GENETIC VARIABILITY OF *Capsicum frutescens* BASED ON
MORPHOLOGIC AND MOLECULAR TRAITS**

RESUMO

Dentre as cinco espécies domesticadas de *Capsicum*, *C. frutescens* tem sido pouco estudada e explorada no melhoramento de plantas. Nesse sentido, a caracterização pode exercer um papel estratégico, potencializando o máximo aproveitamento dos recursos genéticos disponíveis. O objetivo desse trabalho foi de avaliar a variabilidade genética dos 115 acessos que compõem a coleção ativa de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças, com base em características morfológicas e marcadores moleculares microssatélites (SSR). A caracterização morfológica foi feita utilizando-se 57 descritores internacionais e a caracterização molecular baseada em 239 alelos de 24 *loci* microssatélites. Foram estimadas distâncias genéticas entre os 115 acessos, a partir das quais foram realizadas análises de agrupamento por meio de dendrogramas e dispersões gráficas baseadas em escalas multidimensionais. Foram, ainda, estimadas as correlações entre as variáveis morfológicas quantitativas e entre as análises morfológicas e moleculares. A diversidade genética intraespecífica foi analisada e quantificada tanto por meio dos descritores morfológicos quanto por meio dos marcadores SSR, permitindo a formação de seis grupos de similaridade em cada uma das análises. Os marcadores SSR demonstraram maior capacidade de discriminação em relação aos descritores morfológicos para os tipos mais populares de *C. frutescens* encontrados no Brasil (pimenta malagueta, malagueta e tabasco). A altura e a largura das plantas foram as variáveis que apresentaram maior contribuição no índice de diversidade genética. A variabilidade genética analisada no trabalho evidencia a importância dos recursos genéticos para o desenvolvimento de novas cultivares de *C. frutescens* com potencial para diversos nichos de mercados.

Palavras-chaves: pimentas, polimorfismo, microssatélites, descritores, banco de germoplasma, análise multivariáveis.

ABSTRACT

Among the five domesticated species of *Capsicum*, *C. frutescens* has been little studied and exploited in plant breeding. In this sense, characterization can play a strategic role optimizing the use of the genetic resources available. This study aimed at evaluating genetic variability of 115 accessions that compose the *C. frutescens* active germplasm collection of Embrapa Vegetables, based on morphological, agronomic and microsatellite (SSR) traits. Morphologic and agronomic characterization were carried out using 57 international descriptors, and molecular characterization, based on 239 SSR alleles from 24 *loci*. Genetic distance among 115 accessions was estimated and clustering analyses were carried out from dendrogram and dispersion graphics based on multidimensional scaling. Correlation coefficients among quantitative morpho-agronomical variables and among the morphological and the molecular analyses were also estimated. The intraspecific genetic diversity was analyzed and quantified by means of morphologic and agronomic descriptors and by means of SSR markers, allowing the formation of six similarity groups in each analysis. The SSR markers showed greater capacity for discrimination of morphological and agronomic traits for the most popular types of *C. frutescens* found in Brazil (pimenta malagueta, malagueta and tabasco). Height and width of plants were the variables that showed the highest contribution to the genetic diversity coefficient. Genetic variability analyzed in this research highlights the importance of the genetic resources for developing new cultivars of *C. frutescens* with potential for many markets.

Key words: peppers, polymorphism, SSR markers, descriptors, germplasm bank, multivariate analyses.

4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante centro de diversidade de espécies domesticadas do gênero *Capsicum*, como: *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*. Apenas *C. pubescens* não é encontrada no Brasil (REIFSCHNEIDER, 2000).

Capsicum frutescens é uma das espécies domesticadas mais cultivadas no Brasil. As plantas desta espécie são tipicamente eretas com uma ou duas flores por nó, com corolas verdes ou branco esverdeadas. Não há presença de cálice dentado e constrição anelar no cálice, localizada entre o cálice e o pedúnculo. Os frutos são eretos, macios e decíduos (D'ARCY e ESHBAUGH, 1974) e geralmente são pequenos, cônicos, com paredes muito finas, coloração vermelha quando maduros e elevado teor de capsaicina (RIBEIRO et al., 2008).

A variabilidade morfológica de *C. frutescens* é inferior à verificada em outras espécies domesticadas do gênero (SMITH e HEISER JUNIOR, 1957). Segundo DeWITT e BOSLAND (2009), a razão da reduzida diversidade de formas, tamanhos e cores de frutos em relação às espécies domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum* ou *C. chinense*) não é bem definida.

É importante ressaltar que a diversidade morfológica dos frutos é guiada pelo homem, ou seja, as diferenças de tamanho, forma e cor resultam da seleção do homem com base nos frutos que são colhidos para o próximo cultivo. Provavelmente existe uma correlação entre a diversidade desses caracteres e o processo de seleção (domesticação). Isso pode ser um indicativo de que *C. frutescens* não tenha sido submetida a rígidos ou frequentes processos de seleção ou que tenha ocorrido de forma tão intensa e restritiva, propiciando uma variabilidade morfológica inferior em relação as outras espécies domesticadas.

Alguns estudos podem ser encontrados descrevendo a variabilidade do germoplasma de *C. frutescens*. A variabilidade genética entre acessos *C. frutescens* tem sido verificada com base em marcadores moleculares RAPD (BARAL e BOSLAND, 2004), LTR-retrotransposon (TAM et al., 2009), características físico-químicas de frutos (JARRET et al., 2007), além de descritores morfoagronômicos (SUDRÉ et al., 2005).

BARAL e BOSLAND (2004) relatam a existência dos acessos de *C. frutescens* mostrando frutos grandes, pendentes e persistentes. JARRET et al. (2007) analisaram frutos de 40 acessos de *C. frutescens* da coleção de germoplasma do departamento de

Agricultura dos EUA, para uma série de parâmetros de qualidade dos frutos, incluindo: tamanho, peso, concentração de capsaicinoides, sacarose, glicose, frutose, ácido málico e ácido total equivalente e verificaram uma faixa de variação de 4 a 14 vezes em valores para as características examinadas, sugerindo a presença de variabilidade suficiente para essas características dentro desta espécie.

A variabilidade genética nesta espécie domesticada quase não foi explorada no melhoramento de plantas. Existem poucas cultivares de pimenta da espécie *C. frutescens* comercializadas no mundo: tabasco, tabasco greenleaf, malagueta e siling labuyo (DeWITT e BOSLAND, 2009). Além disso, ocorrem muitos erros de identificação dessa espécie e muitas cultivares listadas em catálogos de sementes como *C. frutescens* são na realidade cultivares de *C. annuum*.

O conhecimento da variabilidade genética entre os acessos de uma espécie tem uma grande importância para o manejo correto e o uso destes recursos nos programas de melhoramento genético e para diversificação de sistemas produtivos. Nesse contexto, a caracterização da coleção de germoplasma tem uma aplicação estratégica na valoração dos recursos genéticos, além de proporcionar dados básicos que são necessários ao melhoramento de plantas ou para a identificação e caracterização de genes de interesse (CASTELLEN et al., 2007).

A caracterização morfológica e agrônômica é normalmente a forma mais acessível e econômica para quantificar a variabilidade genética. Por sua vez, a caracterização molecular é uma ferramenta útil para a avaliação da variabilidade genética de coleções de germoplasma, pois os marcadores moleculares podem ser obtidos em grande número, apresentam comportamento mendeliano, são neutros e não sofrem efeitos ambientais. Os marcadores microssatélites conhecidos com SSR (*Simple Sequence Repeats*) são co-dominantes, detectam alto nível de polimorfismo, são multialélicos, bastantes estáveis e indicados para o estudo da variabilidade genética em plantas (FERREIRA et al., 2007; FALEIRO, 2007).

A obtenção do conhecimento científico por meio da caracterização de acessos de *C. frutescens* utilizando marcadores moleculares e características morfológicas permite a valoração, a conservação e o uso de uma biodiversidade essencialmente brasileira, com o intuito de identificar novas fontes potenciais de variabilidade genética, orientar e aumentar a eficiência do programa de melhoramento e contribuir para o desenvolvimento de novas cultivares de tipos varietais como a pimenta malagueta.

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho avaliar a variabilidade genética dos 115 acessos que compõem a coleção ativa de germoplasma de *C.*

frutescens da Embrapa Hortaliças, com base em características morfológicas e marcadores moleculares microssatélites.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material genético

O material genético utilizado no trabalho foi analisado em campo e telado na área experimental da Embrapa Hortaliças, Brasília-DF, no período de setembro de 2009 a março de 2010. Cento e quinze acessos do BAG de *Capsicum*, mantido na Embrapa Hortaliças, foram avaliados com base em características morfológicas e moleculares (Tabela 1). A semeadura desses acessos foi realizada em bandejas de isopor de 72 células, contendo substrato orgânico, mantidas em casa de vegetação. Cerca de 45 dias depois, as mudas foram transplantadas para o solo, ainda em telado em espaçamento de 0,60 m entre plantas e 1,5 m entre fileiras. A irrigação foi realizada por gotejamento e o cultivo conforme o recomendado para sistemas de produção de pimentas *Capsicum* (RIBEIRO et al., 2008).

Tabela 1. Acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma de *Capsicum*, mantido na Embrapa Hortaliças, avaliados com base em características morfológicas e moleculares.

	REGISTRO Nº CNPH	ORIGEM	ESPÉCIES IDENTIFICADAS MORFOLOGICAMENTE	ESPÉCIES IDENTIFICADAS MOLECULARMENTE
1	63	Minas Gerais	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
2	287	Goiás	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
3	595	Sete Lagoas, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
4	597	Anápolis, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
5	1386	Arapiraca, AL	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
6	2631	Paracatu, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
7	2744	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
8	2841	Brasiléia, AC	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
9	2866 A	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
10	2866 B	Guajará Mirim, RO	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
11	2869	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
12	2870	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
13	2871	Porto Velho, RO	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
14	3000	Europa	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
15	3241	Brasília, DF	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
16	3257	São Luís, MA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
17	3286	Castanhal, PA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
18	3349	Lagoa Santa, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
19	3374	Ceasa, DF	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
20	3399	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
21	3410	Formosa, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
22	3414	Petrópolis, RJ	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
23	3440	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
24	3446	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
25	3448	Manaus, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
26	3453	Manaus, AM	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
27	3462	Irlanduba, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
28	3470	Irlanduba, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
28	3484	Pres. Figueiredo, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
30	3499	Manacapuru, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
31	3535 A	Rio Preto da Eva, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
32	3535 B	Rio Preto da Eva, AM	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
33	3539	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
34	3546	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
35	3550	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
36	3606 A	Uruará, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
37	3606 B	Uruará, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
38	3612	Silves, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
39	3621	Montes Claros, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
40	3630	EUA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
41	3645	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
42	3646	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
43	3647	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
44	3648	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
45	3649	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
46	3667	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
47	3696	Goiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
48	3697	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
49	3698	Piracanjuba, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
50	3715	Boa Vista, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
51	3716	Boa Vista, RO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
52	3746	-	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
53	3804	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
54	3805	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
55	3806	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
56	3813	Caldas Novas, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>

Tabela 1. Continuação...

57	3815	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
58	3816 A	Piracanjuba, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
59	3816 B	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
60	3818	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. frutescens</i>
61	3819	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
62	3820	Salvador, BA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
63	3821	Salvador, BA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
64	3835	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
65	3847	Barretos, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
66	3861	Chá Grande, PE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
67	3880	Nova Estrela, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
68	3885	Ji-Paraná, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
69	3891	Rolim de Moura, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
70	3894	Ouro Preto do Oeste, RO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
71	3906	Campo Grande, MT	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
72	3932	Manaus, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
73	3944	Natal, RN	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
74	3984	Farroupilha, RS	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
75	4005	Araguatins, TO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
76	4011	Petrolina de Goiás, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
77	4020	Belo Horizonte, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
78	4037	Guaraí, TO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
79	4052	São Luís, MA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
80	4069	Ceasa, DF	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
81	4082	Abadiânia, GO	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>
82	4083	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
83	4084 A	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
84	4084 B	Abadiânia, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
85	4085	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
86	4095	Porto Alegre, RS	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
87	4105	Petrolina de Goiás, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
88	4138	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
89	4154 A	Belo Horizonte, MG	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
90	4154 B	Belo Horizonte, MG	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
91	4161	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
92	4184	Bujari, AC	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
93	4191	Rio Branco, Acre	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
94	4195	Rio Branco, Acre	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
95	4212	Brasília, DF	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>
96	4224	Rianópolis, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
97	4231	Ceres, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
98	4237	Rialma, GO	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
99	4263	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
100	4264	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
101	4265	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
102	4266	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
103	4267	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
104	4268	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
105	4269	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
106	4270	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
107	4271	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
108	4272	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
109	4273	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
110	4274	Itapuranga, GO	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
111	4283	São Gabriel da Cachoeira, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
112	4304	São Gabriel da Cachoeira, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
113	4353	Marituba, PA	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
114	4364	Cucuí, AM	<i>C. frutescens</i>	<i>C. frutescens</i>
115	4367	Cucuí, AM	<i>C. chinense</i>	<i>C. chinense</i>
115 acessos de <i>C. frutescens</i>			97 acessos de <i>C. frutescens</i>	104 acessos de <i>C. frutescens</i>

4.2.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos 115 acessos foi feita utilizando-se 57 descritores internacionais recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995). As informações obtidas com base nos 57 descritores foram comparadas com as informações obtidas com base em 30 descritores mínimos de *C. frutescens* propostos por SILVA et al. (2013) e em 12 descritores quantitativos selecionados entre os 57 descritores (Tabela 2). As espécies foram classificadas por meio de uma chave para identificação de espécies e variedades domesticadas e semidomesticadas do gênero *Capsicum* de ocorrência no Brasil (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

Os dados da caracterização morfológica que compreenderam as 57 características qualitativas e quantitativas categóricas, foram utilizados para estimar a distância genética entre os acessos utilizando análise de correspondência simples, que permite explorar estatisticamente um conjunto de dados multivariados de “n” indivíduos avaliados em “p” variáveis categóricas. A mesma metodologia para estimar a distância genética entre os acessos foi utilizada com base nas informações dos 30 descritores mínimos.

As estimativas das distâncias genéticas entre os acessos com base nas 12 características quantitativas foram realizadas de acordo com a Distância Euclidiana Média Padronizada (STEEL e TORRIE, 1980). A contribuição relativa de cada descritor quantitativo foi mensurada segundo o método de SINGH (1981). Correlações fenotípicas entre as características quantitativas foram estimadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2006).

As matrizes de distâncias genéticas entre os 115 acessos de *C. frutescens* calculadas com base em 57 descritores internacionais, 30 descritores mínimos e 12 características quantitativas foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrogramas, utilizando-se como critério o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*) e também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC, 1999).

Tabela 2. Dados de passaporte e descritores morfológicos de *Capsicum* aplicados na caracterização morfológica.

Passaporte/Parte Vegetativa	Inflorescência/Semente	Fruto
Procedência ¹	Macho esterilidade	Persistência do fruto ¹
Espécie	Margem do cálice ¹	Nº de lóculos ^{1,2}
Altura da planta ^{1,2}	Nº de flores/axila ¹	Espessura da parede ²
Largura da planta ^{1,2}	Pigmentação do cálice	Comprimento do pedúnculo ²
Cor da folha ¹	Posição da flor ¹	Peso do fruto ²
Forma da folha	Posição do estigma ¹	Largura do fruto ²
Densidade de folha ¹	Construção anelar do cálice	Pungência ¹
Forma da haste ¹	Cor da mancha da corola	Formato do fruto
Cor da haste ¹	Cor da antera ¹	Dias início frutificação ^{1,2}
Comprimento da haste ^{1,2}	Cor do filamento ¹	Cor do fruto imaturo
Diâmetro da haste ^{1,2}	Cor da corola	Cor do fruto maduro ¹
Densidade de ramificação ¹	Dias início florescimento ^{1,2}	Comprimento da placenta
Antocianina nodal ¹	Forma da corola ¹	Aroma ¹
Hábito de crescimento	Cor da semente	Comprimento do fruto ^{1,2}
Brotação abaixo da primeira bifurcação ¹	Nº de semente/fruto	Apêndice da ponta do fruto
Pubescência da folha	Superfície da semente	Mistura varietal
Pubescência da haste		Segregação
		Ombro do fruto
		Posição do fruto ¹
		Mancha de antocianina
		Pescoço da base do fruto
		Forma da ponta do fruto
		Secção transversal ¹
		Superfície do fruto ¹

¹ Descritores mínimos para *Capsicum frutescens*

² Descritores quantitativos

4.2.3 Caracterização molecular

Amostras de folíolos de duas plantas de cada acesso, coletadas individualmente, foram obtidas para a extração do DNA, realizada pelo método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998). A concentração de DNA de cada

tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com padrões de DNA Lambda com diferentes concentrações. Cada amostra foi diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

Reações de amplificação de amostras de DNA de duas plantas de cada um dos 115 acessos foram realizadas utilizando 24 pares de *primers* SSR selecionados a partir de 185 pares de *primers* microssatélites de *C. annuum* desenvolvidos no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (BUSO et al., 2000) e outros 14 pares de *primers* microssatélites desenvolvidos por NAGY et al. (2007). Os pares de *primers* que geraram marcadores com maior resolução e polimorfismo foram utilizados na caracterização molecular dos acessos de *C. frutescens*. A reação foi realizada em volume de 10 μl composta pela seguinte combinação de reagentes: 5,55 μl de água MilliQ; 1,0 μl de tampão 10X; 0,3 μl de MgCl₂ 50 mM; 0,8 μl de dNTPs 2,5 mM cada; 0,8 μl de BSA 2,5 mg/ml, 0,3 μl de *primer* a 5 μM marcados com fluorescências 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarela); 0,25 μl de enzima Taq polimerase (5 U/μl) e mais 1 μl de DNA genômico a 3 ng/μl. As reações de amplificação ocorreram da seguinte forma: 95 °C por 15 min para desnaturação, 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 1,30 min à 56 °C para anelamento e 1 min a 72 °C e, ao final, uma extensão de 60 °C por 50 min.

A genotipagem das 230 amostras de DNA foi realizada de forma automatizada com uso de um sequenciador modelo ABI 3730 e, para sua utilização, o preparo das amostras, após a PCR, foi feito misturando-se 1 μl da reação a 10 μl do agente desnaturante formamida (HiDi) e 1 μl do padrão de peso molecular (ROX). A mistura foi então desnaturada por 5 minutos a 95 °C. Após a passagem pelo sequenciador, a demarcação dos picos de fluorescência e dos alelos detectados para a obtenção da genotipagem foi feita manualmente com auxílio do *software* GeneMapper versão 4.1 (*Applied Biosystems*), sendo o arredondamento do tamanho dos alelos realizado por meio do *software* AlleloBin (PRASANTH et al., 2006). Por fim, obteve-se uma planilha com a identificação de cada planta analisada e os respectivos alelos, presentes em cada um dos 24 locos SSR analisados.

Para cada um dos 24 pares de *primers* SSR foi estimado o número de alelos e o conteúdo informativo de polimorfismo ou PIC (Tabela 3), através do programa Power Marker (LIU, 2004).

Tabela 3. *Primers* microssatélites utilizados na análise de 115 acessos de *Capsicum*.

<i>Primers</i>	Sequência 5'→3' F/R	Temperatura de anelamento (°C)	Número de Alelos	PIC
19 ¹	CCGCAATGGCAGTATGATCT/ CGGCTCTATCTACAACGGTG	56	4	0.46
20 ¹	CCGTAAAGAAATCAAACCAC/ GCATGCACACATAAACTC	56	7	0.58
26 ¹	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ TGA CTCAAATGCTCTCTGAA	56	10	0.59
27 ¹	GCAGAGGACCAGTTAGCATA/ TGTTCTGAGTCCACGATGCT	56	12	0.64
29 ¹	TGGGTAAAGGTA CTTAGTAG/ GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	56	10	0.67
41 ¹	GACATCAGTGTTCTGCAAA/ ACACTGGGTATGTTGTTGTA	56	7	0.59
49 ¹	CTATCTTCGCATATAGGCAG/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	12	0.75
52 ¹	TAGCAGAGGACCAGTTAGCA/ ATGTTCTGAGTCCACGATGC	56	11	0.65
56 ¹	CTTCGCATATAGGCAGATCA/ TCTCTGTGGCTGACTCAAAT	56	10	0.65
62 ¹	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ GGTCAGACTACGCTCTCTCA	56	9	0.56
79 ¹	CACTGGGTATGTTGTTGTAA/ CCGTAAAGAAATCATACCAC	56	5	0.57
88 ¹	AATGGATGTTCCCTTGCTTT/ CAACTGATCAACCATTCCGT	56	10	0.46
96 ¹	CGCATATAGGCAGATCAAAT/ AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	10	0.62
131 ¹	AAATGCACACAAAAACAC/ AATATGACCACATTTGTG	56	8	0.49
159 ¹	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA/ ATTGCTTTAGCTCAGAATGG	56	13	0.70
167 ¹	CATTCTCTTCTCTCAAACG/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	56	13	0.50
172 ¹	ATGTTCTGAGTCCACGATGC/ CTTAGCAGAGGGCCAGTTAG	56	12	0.69
174 ¹	CCTGCATTCAACATCTAGGA/ GGAGCCTTGCCATAACAGAT	56	8	0.44
178 ¹	CCCAACTCATTTAATTCCAC/ CACGTCAATCTGTTGTGAAA	56	12	0.52
EPMS 331 ²	AACCCAATCCCCTTATCCAC/ GCATTAGCAGAAGCCATTTG	57	11	0.69
EPMS 376 ²	ACCCACCTTCATCAACAACC/ ATTTGTGGCTTTTCGAAACG	57	7	0.48
EPMS 386 ²	ACGCCAAGAAAATCATCTCC/ CCATTGCTGAAGAAAATGGG	57	7	0.53
EPMS 417 ²	CGCATATACATACATAAATTCTTTC/ TCAACATCTCACCGAAGCTG	57	6	0.36
GPMS 112 ²	TCCCTCAGCAGCAACAATTT/ GTCGGGCTCTTTGATTGTGT	57	16	0.59
Média		57	9.6	0,57
Total			239	

¹BUSO et al., 2000; ²NAGY et al., (2007)

As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2006), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo: DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j ; NLC = Número de Locos Coincidentes; NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente).

A matriz de distâncias genéticas obtidas foi utilizada para realizar as análises de agrupamento por meio de dendrograma, utilizando-se como critério de agrupamento, o método do UPGMA e também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC, 1989) e Statistica (STATSOFT INC, 1999).

Foram estimadas as correlações entre as distâncias genéticas calculadas com base em marcadores moleculares SSR e as calculadas com base em 57 descritores internacionais, 30 descritores mínimos e 12 características quantitativas, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, com o auxílio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2006).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização morfológica

Após o emprego da chave para identificação de espécies na caracterização morfológica, alguns acessos registrados como *C. frutescens* no BAG *Capsicum* foram re-classificados como pertencentes às espécies *C. chinense* (16 acessos), *C. baccatum* var. *pendulum* (1 acesso) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (1 acesso) (Tabela 1).

Dos 57 descritores utilizados na caracterização morfológica (Tabela 2), 16 foram monomórficos, ou seja, não foram verificadas diferenças entre os acessos avaliados: pubescência da haste, forma da folha, pubescência da folha, posição da flor, cor da corola, cor da mancha da corola, pigmentação do cálice, constrição anelar do cálice, posição do fruto, apêndice da ponta do fruto, pescoço na base do fruto, comprimento da placenta, cor da semente, número da semente/fruto, macho esterilidade e mancha de antocianina. Dois destes descritores estão entre descritores mínimos sugeridos por SILVA et al. (2013): posição da flor e posição do fruto.

Os descritores que apresentaram maiores diferenças de classes entre os acessos de *C. frutescens* foram: altura da planta, largura da planta, comprimento da haste, diâmetro da haste, dias para início do florescimento, número de flores por axila, dias para início da frutificação, peso do fruto e comprimento do pedúnculo.

Entre as 12 características quantitativas, as que apresentaram maior contribuição relativa para a divergência genética pelo método de Singh foram a largura e altura da planta e as que apresentaram menor contribuição foram a largura do fruto e o número de lóculos (Tabela 4).

Tabela 4. Contribuição relativa de 12 descritores morfológicos quantitativos de *Capsicum* para divergência genética pelo método de SINGH (1981).

Descritores Quantitativos	Contribuição Relativa (%)
Comprimento do fruto	0.022
Largura do fruto	0.005
Espessura da parede	0.008
Comprimento do pedúnculo	0.009
Peso do fruto	0.058
Numero de lóculos	0.006
Altura da planta	39.563
Largura da planta	47.701
Comprimento da haste	4.894
Diâmetro da haste	0.026
Dias de florescimento	3.700
Dias de frutificação	4.006

O comprimento e a largura do fruto apresentaram correlação positiva e estatisticamente significativa entre si e com a espessura da parede do fruto, comprimento do pedúnculo, peso do fruto, e número de lóculos (Tabela 5). A espessura da parede do fruto também foi positivamente correlacionada com o peso do fruto e com número de lóculos, mas foi negativamente correlacionada com o comprimento da haste. O comprimento do pedúnculo foi positivamente correlacionado com o peso do fruto e este com o número de lóculos. O número de lóculos mostrou correlação negativa com o comprimento da haste (Tabela 5).

A altura e a largura da planta foram positivamente correlacionada entre si e com o comprimento e diâmetro da haste, mas a largura da planta foi negativamente correlacionada com dias para início de florescimento e de frutificação. O comprimento

da haste mostrou correlação positiva com o diâmetro da haste, bem como ocorreu entre dias para início de florescimento com dias para o início da frutificação (Tabela 5).

Tabela 5. Correlações entre 12 descritores morfológicos quantitativos estimadas de acordo com coeficiente de correlação de Pearson e teste t, por meio do programa estatístico Genes (CRUZ, 2001).

	LF	EPF	CPE	PF	NL	AL	LP	CH	DH	DFL	DFR
CF	0,41**	0,35**	0,26**	0,36**	0,20*	0,82	0,10	- 0,10	0,09	- 0,07	- 0,16
LF		0,68**	0,28**	0,90**	0,66**	- 0,01	0,03	- 0,12	0,09	0,02	- 0,04
EPF			- 0,03	0,63**	0,69**	- 0,02	0,02	- 0,25**	- 0,04	- 0,03	- 0,03
CPE				0,22*	- 0,09	0,03	- 0,02	0,04	0,06	- 0,03	0,04
PF					0,64**	0,01	0,03	- 0,10	0,11	0,04	0,01
NL						- 0,02	- 0,05	- 0,22*	0,07	0,11	0,07
AL							0,74**	0,57**	0,64**	- 0,11	0,01
LP								0,45**	0,63**	- 0,34**	- 0,21*
CH									0,39**	- 0,03	0,09
DH										0,05	0,09
DFL											0,85**
DFR											

CF (Comprimento do fruto); LF (Largura do fruto); EPF (Espessura da parede do fruto); CPE (Comprimento do pedúnculo); PF (Peso do fruto); NL (Numero de lóculos); AL (Altura da planta); LP (Largura da planta); CH (Comprimento da haste); DH (Diâmetro da haste); DFL (Dias de florescimento); DFR (Dias de frutificação).

As distâncias genéticas entre os acessos de *Capsicum* com base nos 57 descritores internacionais, 30 descritores mínimos e 12 características quantitativas variam entre 0 a 0,509; 0 a 0,733 e 0 a 2,32, respectivamente, permitindo verificar e quantificar a variabilidade genética entre os acessos. De acordo com a análise dos 57 descritores, não foram observadas diferenças entre os acessos CNPH 4263 e CNPH 4270. Em relação aos 30 descritores mínimos, não foram observadas diferenças entre os acessos CNPH 4263 até CNPH 4273, procedentes de linhagens de pimenta tabasco do programa de melhoramento, bem como os acessos CNPH 4085 e CNPH 4105, procedentes de municípios do estado de Goiás.

As distâncias genéticas calculadas conforme os marcadores microssatélites variam entre 0 e 0,978. Distâncias genéticas nulas foram obtidas apenas entre repetições de plantas do mesmo acesso, mostrando que os marcadores moleculares apresentaram maior poder de resolução e diferenciação entre os acessos, quando comparados com os descritores morfológicos. Distâncias genéticas elevadas foram obtidas para o acesso CNPH 3805, o qual tinha sido classificado como *C. chinense* na caracterização

morfológica. Provavelmente esse acesso é advindo de fecundações cruzadas, resultante da proximidade de plantio entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens*.

As análises de agrupamento realizadas com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando 57, 30 e 12 descritores e de alelos gerados por 24 pares de *primers* para microssatélites são apresentadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As distâncias entre os acessos e a distribuição dos mesmos também podem ser observadas nos gráficos de dispersão, quando estratificados por espécies (Figura 5), por origem (Figura 6) ou por tamanho de fruto (Figura 7).

A análise de agrupamento realizada com base na matriz de distâncias genéticas calculadas a partir de 30 descritores mínimos propostos por SILVA et al. (2013) não permitiu a diferenciação de vários acessos entre os 115 (Figura 2). A maioria desses acessos são linhagens de pimenta tabasco do programa de melhoramento da Embrapa.

Quando realizada com base nos 57 descritores ocorreu uma maior resolução e diferenciação dessas linhagens e demais acessos avaliados. Essa análise permitiu subdividir os 97 acessos classificados como *C. frutescens* em seis grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,68. O número de acessos por grupo variou de 1 (2,1%) a 58 (59,8%). Os acessos CNPH 3821 (proveniente de Salvador, BA) e CNPH 3630 (proveniente dos EUA) apresentaram maiores diferenças em relação aos demais acessos avaliados de *C. frutescens* e formaram o segundo e o sexto grupo com apenas um acesso, respectivamente. No entanto, o terceiro grupo foi formado por 58 acessos.

O acesso CNPH 3821 distinguiu-se morfologicamente dos demais por ser o único que apresentou frutos com formato da ponta afundada e comprimento de placenta entre $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do tamanho do fruto. Os demais acessos dessa espécie apresentaram o formato da ponta de fruto pontiagudo a truncado e comprimento de placenta acima de $\frac{1}{2}$ do tamanho do fruto.

O acesso CNPH 3630 é um tipo de pimenta tabasco que apresentou a menor similaridade em relação aos treze acessos de tabasco. Diversos descritores contribuíram para que o referido acesso formasse um grupo individual: densidade de folha densa; três flores por axila; cor da antera violeta; filamento branco; elevado comprimento, espessura de parede e comprimento do pedúnculo do fruto; ombro do fruto agudo; superfície do fruto lisa; coloração do fruto imaturo verde amarelado e de vermelho escuro quando maduro.

Os treze acessos exclusivamente do tipo pimenta tabasco (CNPH 4263 até 4273, CNPH 3000 e CNPH 3861) constituíram o quarto grupo. Características comuns aos

acessos desse grupo distingiram do acesso CNPH 3630: densidade de folha intermediária; uma flor por axila; cor da antera azul pálida; filamento violeta; comprimento do fruto, espessura de parede e comprimento do pedúnculo do fruto intermediário; ombro do fruto obtuso; superfície do fruto rugosa; pouca persistência do fruto; coloração do fruto imaturo verde amarelado e vermelho quando maduro.

4.3.2 Caracterização molecular

Na caracterização molecular foram agrupados 104 acessos pertencentes a *C. frutescens* (Figura 4), incluindo os 97 de *C. frutescens* mais outros sete classificados na caracterização morfológica como *C. chinense*. As distâncias genéticas calculadas a partir dos marcadores SSR permitiram subdividir os 104 acessos em seis grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,50. O número de acessos por grupo variou 1 (0,94 %) a 61 (57,5%). Observou-se também que nenhum desses agrupamentos relacionou-se com a procedência geográfica dos acessos.

O gráfico de dispersão por espécie (Figura 5D) corrobora com o que foi observado na análise de agrupamento. Fica evidente a formação de um maior grupo de similaridade envolvendo mais de 58 acessos de *C. frutescens*, bem como a presença de fenótipos intermediários que ocupam a mesma região gráfica entre as duas espécies *C. chinense* e *C. frutescens*.

Na análise molecular, as pimentas malaguetinhas com quatro representantes (CNPH 3606B, CNPH 3894, CNPH 4037, CNPH 4353) apresentaram uma elevada similaridade. Esses acessos possuem as seguintes características de pimentas silvestres: frutos eretos, de forma alongada, tamanho pequeno (1 a 2 cm de comprimento e 0,4 cm de largura), peso médio de até 0,2 gramas, coloração vermelho escuro quando maduros, com fácil desprendimento dos cálices (frutos decíduos), favorecendo a remoção e a dispersão eventual das sementes. Foi verificado, também, que esses acessos foram agrupados (grupo 4) juntamente com 14 acessos (CNPH 3000, CNPH 3861, CNPH 4161 e CNPH 4263 até 4273) de pimentas tipo tabasco. Oito descritores apresentaram resultados similares entre os frutos dos acessos dos tipos de pimenta malaguetinha e tabasco: frutos eretos, de formato alongado, persistência entre o fruto e o pedicelo foi baixa, número de lóculos 2, comprimento da placenta acima de ½ do tamanho do fruto, superfície rugosa, pungência elevada e aroma baixo.

Verificou-se correlações positivas e altamente significativas entre as distâncias genéticas calculadas com base em 57 descritores internacionais, 30 descritores mínimos

e 12 características quantitativas e nos marcadores moleculares SSR (Tabela 6). O maior valor de correlação ocorreu entre os 30 descritores mínimos e os 57 descritores morfológicos indicando elevada magnitude e demonstrando que os 30 descritores mínimos podem se aplicados na caracterização morfológica de *C. frutescens*, ao invés de 57. As demais correlações apresentaram magnitude intermediária, mostrando que as análises morfológicas e moleculares, embora estejam correlacionadas, não apresentam exatamente as mesmas informações e os mesmos agrupamentos.

Tabela 6. Correlações entre as distâncias genéticas calculadas para 115 acessos de *Capsicum* com base em 57 descritores internacionais (D57), 30 descritores mínimos (D30), 12 descritores quantitativos (D12) e 24 *loci* SSR (molecular).

	D30	D57	Molecular
D12	0,4898**	0,6005**	0,4638**
D30		0,9155**	0,5797**
D57			0,6604**

** : Significativo a 1% de probabilidade, pelo teste t.

4.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a presença de variabilidade genética intraespecífica de *C. frutescens* do BAG *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. Alguns acessos apresentaram distâncias genéticas altas entre si obtidas tanto por meio de descritores morfológicos quanto por marcadores moleculares SSR, permitindo a formação de seis grupos distintos em cada uma das análises.

Entretanto, em ambas análises houve a formação de grupos que incluíram mais de 58 acessos, demonstrando elevada similaridade genética em mais de 50% dos acessos avaliados.

O acesso CNPH 3821 foi o único que formou um grupo individual tanto na caracterização morfológica quanto na molecular, sendo identificado como o mais discrepante dentre os acessos avaliados de *C. frutescens*.

Nos gráficos de dispersão da análise molecular estratificadas por espécie, origem e tamanho de frutos observa-se uma maior resolução e diferenciação entre os acessos em relação a análise morfológica. A formação de um maior grupo de similaridade fica evidente na análise molecular estratificada por espécie, bem como da relação muito próxima entre os acessos das espécies *C. chinense* e *C. frutescens*.

O dendrograma resultante dos 12 descritores morfológicos quantitativos apresentou menor capacidade de discriminação dos acessos avaliados em relação aos descritores morfológicos (57 e 30 descritores), bem como não apresentou formação dos agrupamentos por espécies. Em relação à contribuição desses descritores para a divergência genética entre os acessos de *C. frutescens* foi observada que as maiores contribuições foram relacionadas aos caracteres altura e largura da planta. Uma possível explicação é que essas características são muito influenciadas pelo ambiente. Essas características também mostraram correlação positiva entre si e com o comprimento e diâmetro da haste, mas a largura da planta foi negativamente correlacionada com os dias para início de florescimento e de frutificação. Resultados similares foram obtidos por RÊGO et al. (2011) no estudo da variabilidade fenotípica de 40 acessos tradicionais de *C. baccatum*. A altura e largura de plantas, altura da primeira bifurcação e o número de frutos por planta foram correlacionadas positivamente entre elas e com o rendimento. A maior correlação ocorreu entre a produção e a altura de planta.

ORTIZ et al. (2010) relatam que descritores qualitativos (cor das sementes, cor e mancha da corola, constrição do cálice, números de flores por nó e cor do filamento) serviram para atribuir aos acessos de *Capsicum* as suas respectivas espécies, enquanto a variabilidade intraespecífica foi melhor avaliada pela análise multivariada quantitativa: relação comprimento/largura do fruto, número de dias para a floração, comprimento das folhas, e comprimento da antera, filamentos e pedicelo.

Os descritores qualitativos multicategóricos permitiram uma melhor diferenciação interespecífica em relação aos descritores quantitativos provavelmente em função do tipo de herança gênica, pois tais descritores são controlados por poucos genes e, portanto, menos afetados pelo ambiente (MONTEIRO et al., 2010).

A coleta de dados multicategóricos é prática, econômica e demanda menor tempo comparado a dados quantitativos e dados moleculares. Porém, cada um tem sua importância singular, sendo preferível que uma coleção de germoplasma seja o mais amplamente estudada para dar maior suporte a pesquisas e ao banco de dados da coleção. A caracterização multicategórica e o estudo da divergência baseado nesses dados são alternativas viáveis para se estudar bancos e coleções de germoplasma que têm poucos recursos humanos e financeiros (SUDRÉ et al., 2006).

Dentre as análises morfológicas, os 57 descritores internacionais apresentaram uma maior capacidade de discriminação, quando foram comparados à aplicação de 30 descritores mínimos de *C. frutescens* propostos por SILVA et al. (2013) e os 12 descritores quantitativos.

Verificou-se também uma correlação alta acima de 0,90, entre as distâncias genéticas calculadas com base nos 30 descritores mínimos e nos 57 descritores internacionais, demonstrando ser apropriada a utilização dos descritores mínimos propostos por SILVA et al. (2013). Entretanto, por meio dos 30 descritores mínimos foram identificadas 10 duplicatas, enquanto com a utilização dos 57 descritores, apenas uma duplicata foi identificada. Dessa forma, o maior número de descritores aplicados na caracterização morfológica aumentou a resolução das similaridades e dissimilaridades entre os acessos.

Considerando os resultados obtidos, pode-se constatar que cerca de 17 descritores morfológicos foram monomórficos, ou seja, mostraram-se invariáveis e incapazes de discriminar os acessos de *C. frutescens*. Estes descritores poderiam ser eliminados nas próximas caracterizações. No entanto, ressalta-se que os descritores relacionados à inflorescência são características muito importantes para distinguir as espécies domesticadas do gênero *Capsicum* como, por exemplo, a constrição anelar do cálice que é uma das principais características morfológicas de distinção entre *C. frutescens* e *C. chinense* (SMITH e HEISER JUNIOR, 1951).

As análises realizadas com marcadores moleculares demonstraram maior capacidade de discriminação em relação aos descritores morfológicos (57, 30 e 12 descritores). O dendrograma resultante desses dados moleculares permitiu um agrupamento claro dos tipos mais populares de *C. frutescens* encontrados no Brasil (pimenta malagueta, malagueta e tabasco).

Os acessos do tipo pimenta malagueta, com frutos de tamanho inferior geralmente são confundidos com resto de colheita ou considerados como decorrência de ataque de viroses. No entanto, no presente trabalho, houve a formação de um subgrupo específico para os acessos de malagueta, constatando-se, assim, a sua determinação genética, ou seja, sua identificação como um morfotipo dentro de *C. frutescens*.

Os 239 alelos gerados a partir dos 24 *loci* SSR foram suficientes para discriminar 104 acessos de *C. frutescens* dos 115 acessos avaliados. Para os *loci* SSR analisados neste trabalho, o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) variou de 0,36 a 0,75 com média geral de 0,57. Dentre os 24 *loci* SSR, 18 (75%) foram polimórficos com PIC superior a 0,5, evidenciando a variabilidade genética entre os acessos de *C. frutescens* analisados e confirmando dados da caracterização morfológica do presente estudo.

A análise de divergência genética entre os acessos de *C. frutescens* foi realizada em uma amostragem com distribuição geográfica ampla de acessos coletados em áreas geográficas de diferentes condições ecológicas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste brasileiras. A diversidade de locais de coleta implica diferentes capacidades adaptativas dos acessos analisados, o que é de extremo interesse para programas de melhoramento genético visando à obtenção de cultivares adaptadas a diferentes regiões ou sistemas agrícolas do país.

No desenvolvimento de novas cultivares, o melhorista deve considerar além da distância entre os acessos e adaptação aos sistemas agrícolas, características morfológicas do grupo de pimentas com o qual está trabalhando e as exigências e preferências de mercado. O mercado de pimenta malagueta no Brasil é destinado tanto para a comercialização *in natura*, quanto processada na forma de conservas ou molhos líquidos (RIBEIRO et al., 2008).

A variabilidade genética intraespecífica de *C. frutescens* encontrada no presente estudo apresenta boa disponibilidade de germoplasma com características morfológicas para desenvolvimento de cultivares destinadas para atender diferentes nichos de mercados.

Características morfológicas foram observadas na variabilidade genética intraespecífica de *C. frutescens* que poderão atender as exigências do mercado, tanto para a comercialização *in natura*, quanto processada na forma de conservas ou molhos líquidos.

Para a comercialização *in natura* são preferidos frutos com maior tamanho, peso e fácil desprendimento dos cálices, para qual destacaram-se no presente estudo o acesso CNPH 3649 (comprimento do fruto=3,5 cm; largura=1 cm; peso fresco=1,3 g), CNPH 3944 (comprimento do fruto=3,7 cm; largura=1,1 cm; peso fresco=1,4 g) e CNPH 4161 (comprimento do fruto=3,2 cm; largura=0,8 cm; peso fresco=1,1g). JARRET et al. (2007) observou variações bem maiores no tamanho e peso dos frutos de *C. frutescens*: o maior comprimento atingiu 8,5 cm (PI 439502) e o peso fresco 4,04 g (GRIF 9315).

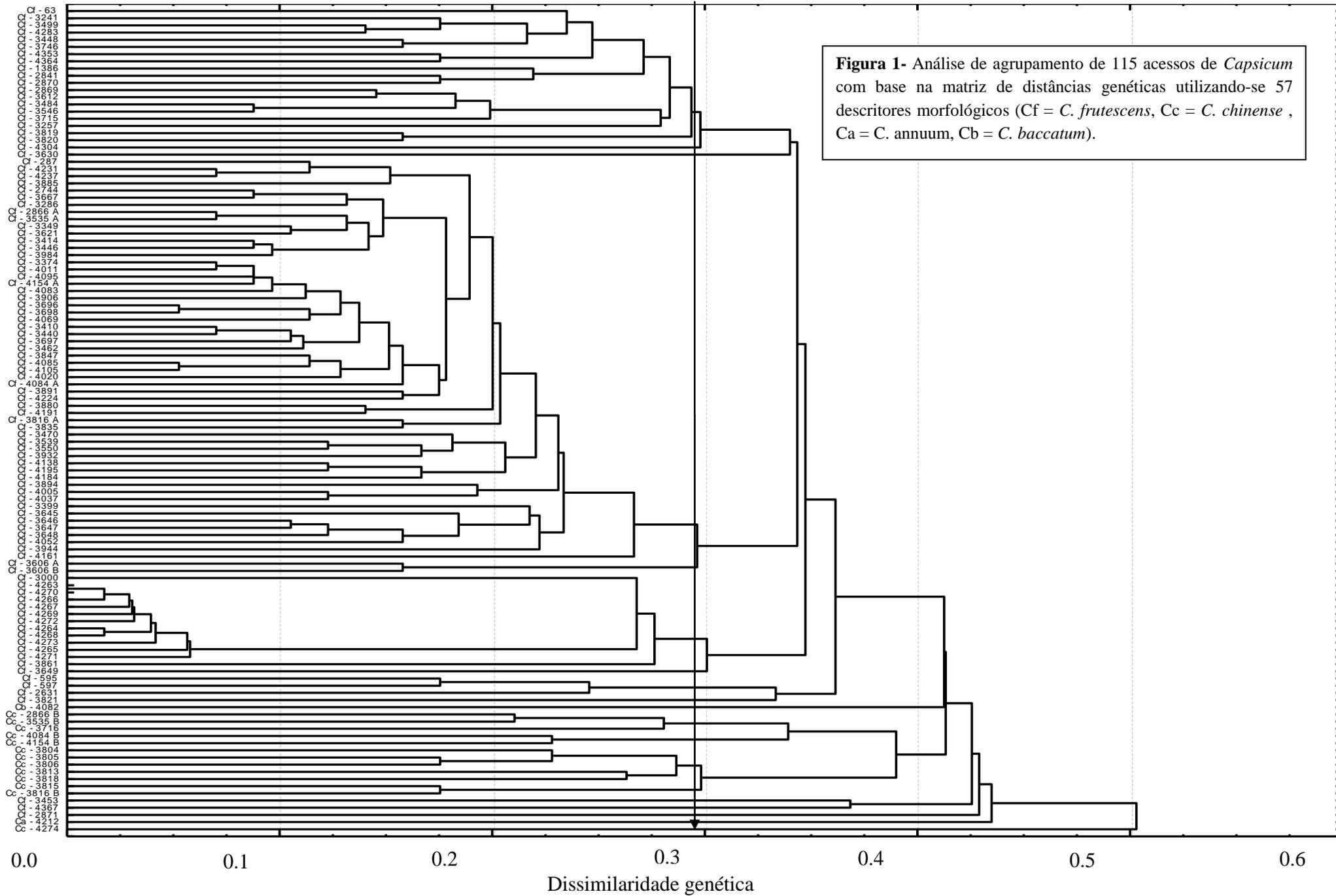
Quando processados em conservas, os frutos da pimenta malagueta são usados inteiros e devem ser adaptados ao envasamento e às características comerciais, ou seja, possuir tamanho pequeno, resistência a rachaduras, livres de manchas, coloração intensa e qualidade organolépticas como sabor, aroma e pungência. Além disso, quando as pimentas são destinadas para a indústria de conservas e molhos, há preferência por frutos que sejam facilmente destacados do cálice (persistência baixa), sem resultar na produção de ferimentos visando evitar o escurecimento dos frutos após o

acondicionamento (PINTO et al., 1999) e operação adicional no galpão de beneficiamento, para retirada do pedúnculo. A presença destas características para a produção de conservas foi verificada nos acessos CNPH 2869, CNPH 3484, CNPH 3546, CNPH 3612, CNPH 3715 e CNPH 3894.

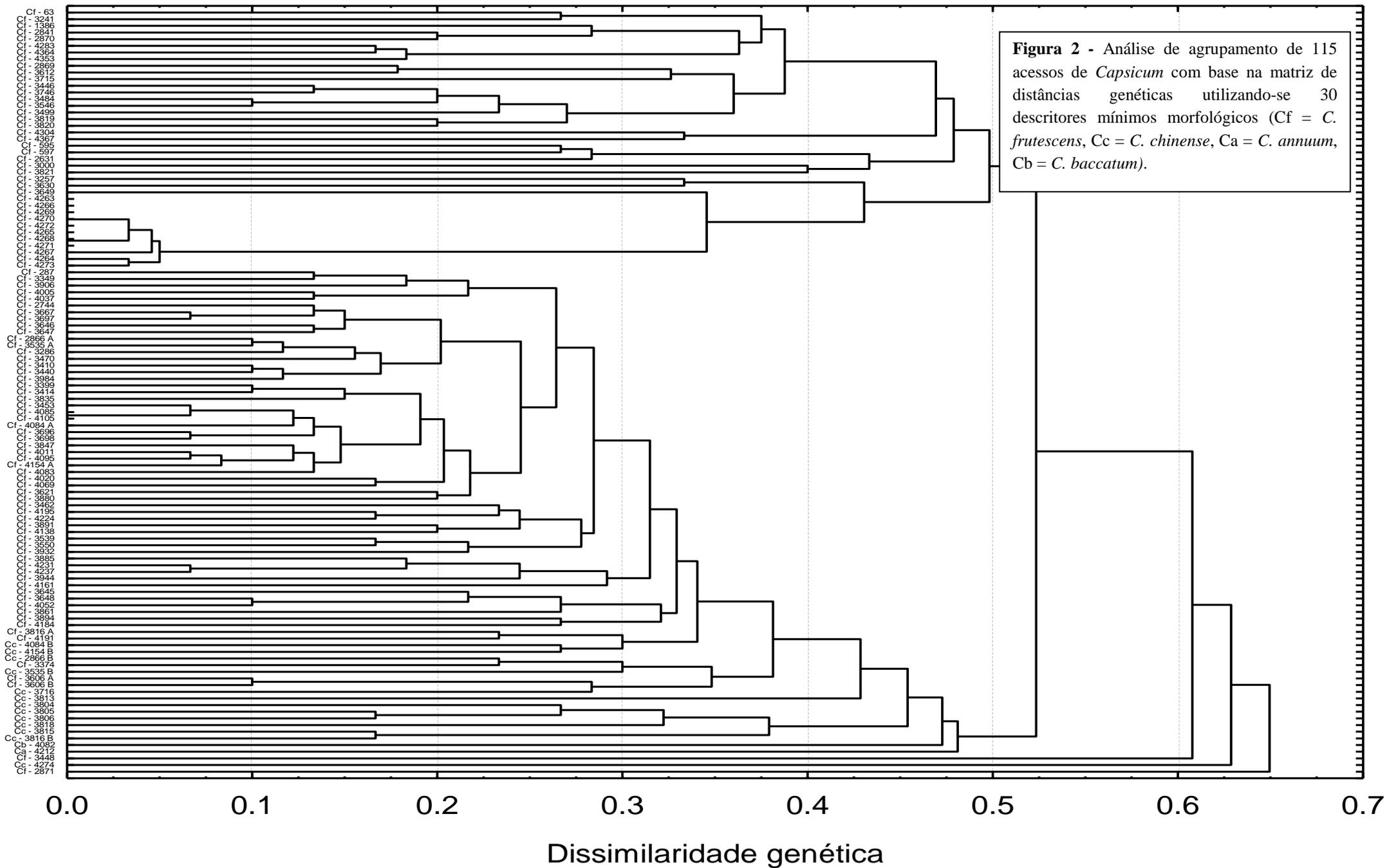
Uma das principais formas de consumo de pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil, e no mundo, é o molho líquido. Geralmente são usadas pimentas de frutos maiores, com polpa carnuda, de coloração vermelha e pungentes. Pimentas do tipo malagueta e tabasco, apesar de possuírem frutos pequenos, são empregadas na fabricação de molhos líquidos, utilizadas sozinhas ou em misturadas (“blend”) com outras pimentas na preparação de molhos mais picantes (RIBEIRO et al., 2008). Os frutos de maior espessura de polpa proporcionam maior quantidade de polpa. Para esse nicho de mercado destacaram-se os acessos CNPH 2631, CNPH 3000, CNPH 3499, CNPH 3630, CNPH 3645, CNPH3646, CNPH 3649, CNPH 3819, CNPH 3820 e CNPH 3944.

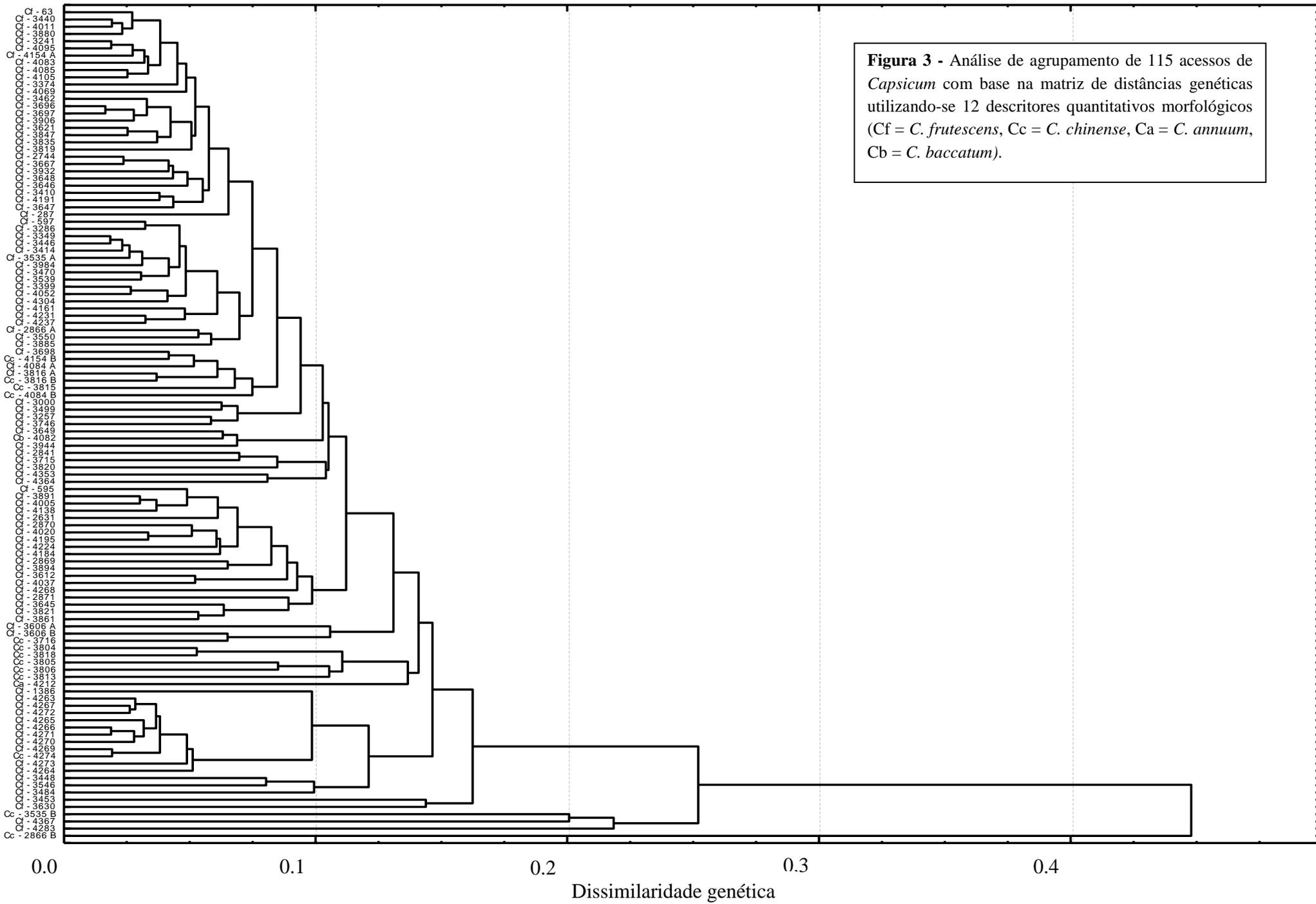
4.5 CONCLUSÃO

A obtenção do conhecimento sobre a caracterização morfológica juntamente com a molecular dos acessos da espécie *C. frutescens* são informações importantes que podem auxiliar o programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa visando o desenvolvimento de novas cultivares de pimenta malagueta. Descritores morfológicos e marcadores moleculares do DNA se mostraram importantes e complementares na geração de informações como na classificação de espécies. Este estudo mostrou que os acessos são divergentes, havendo variabilidade genética para desenvolvimento de cultivares de *C. frutescens* para diversos nichos como: comercialização *in natura* e produção de conservas e molhos.



Dissimilaridade genética





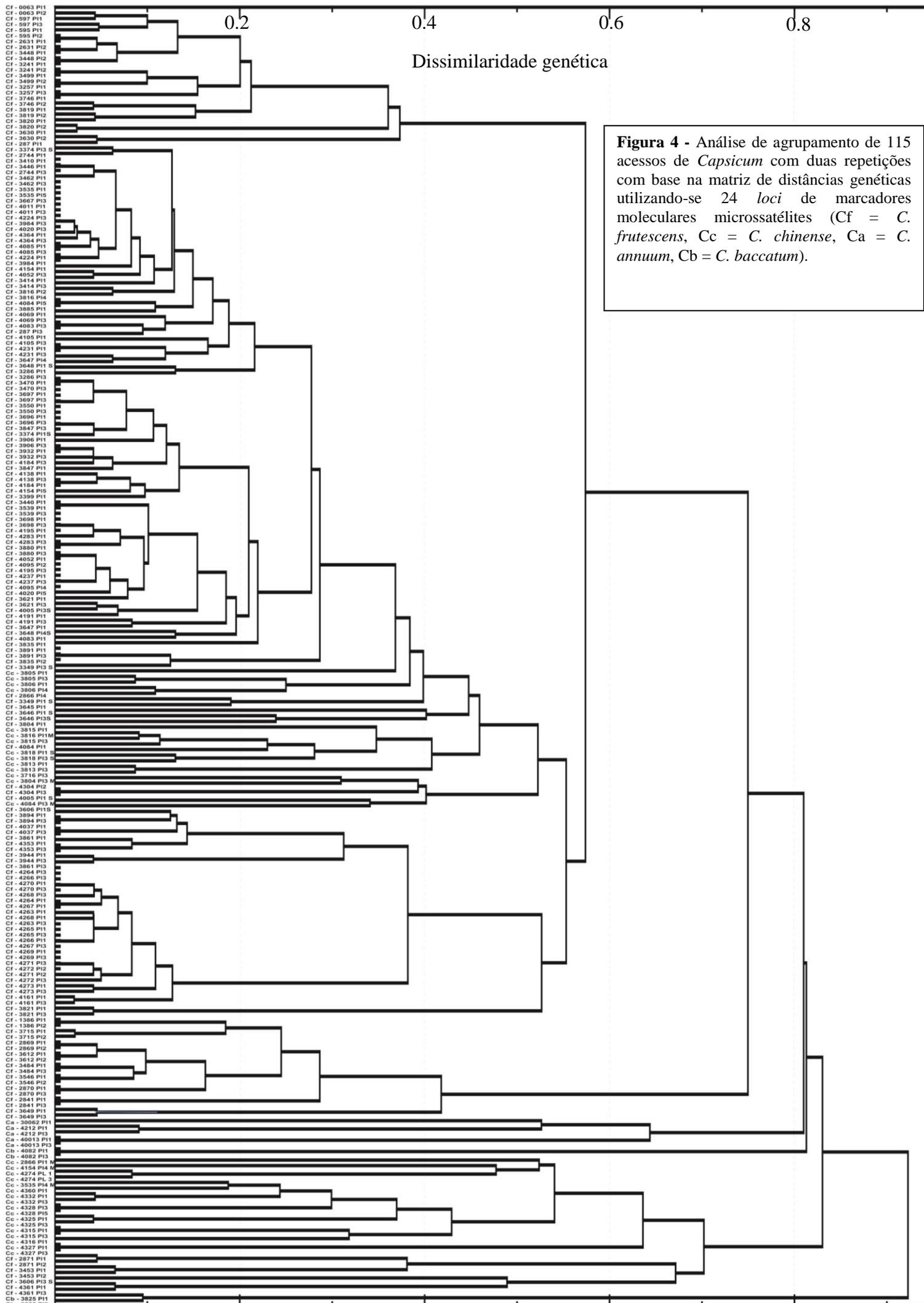


Figura 4 - Análise de agrupamento de 115 acessos de *Capsicum* com duas repetições com base na matriz de distâncias genéticas utilizando-se 24 *loci* de marcadores moleculares microssatélites (Cf = *C. frutescens*, Cc = *C. chinense*, Ca = *C. annuum*, Cb = *C. baccatum*).

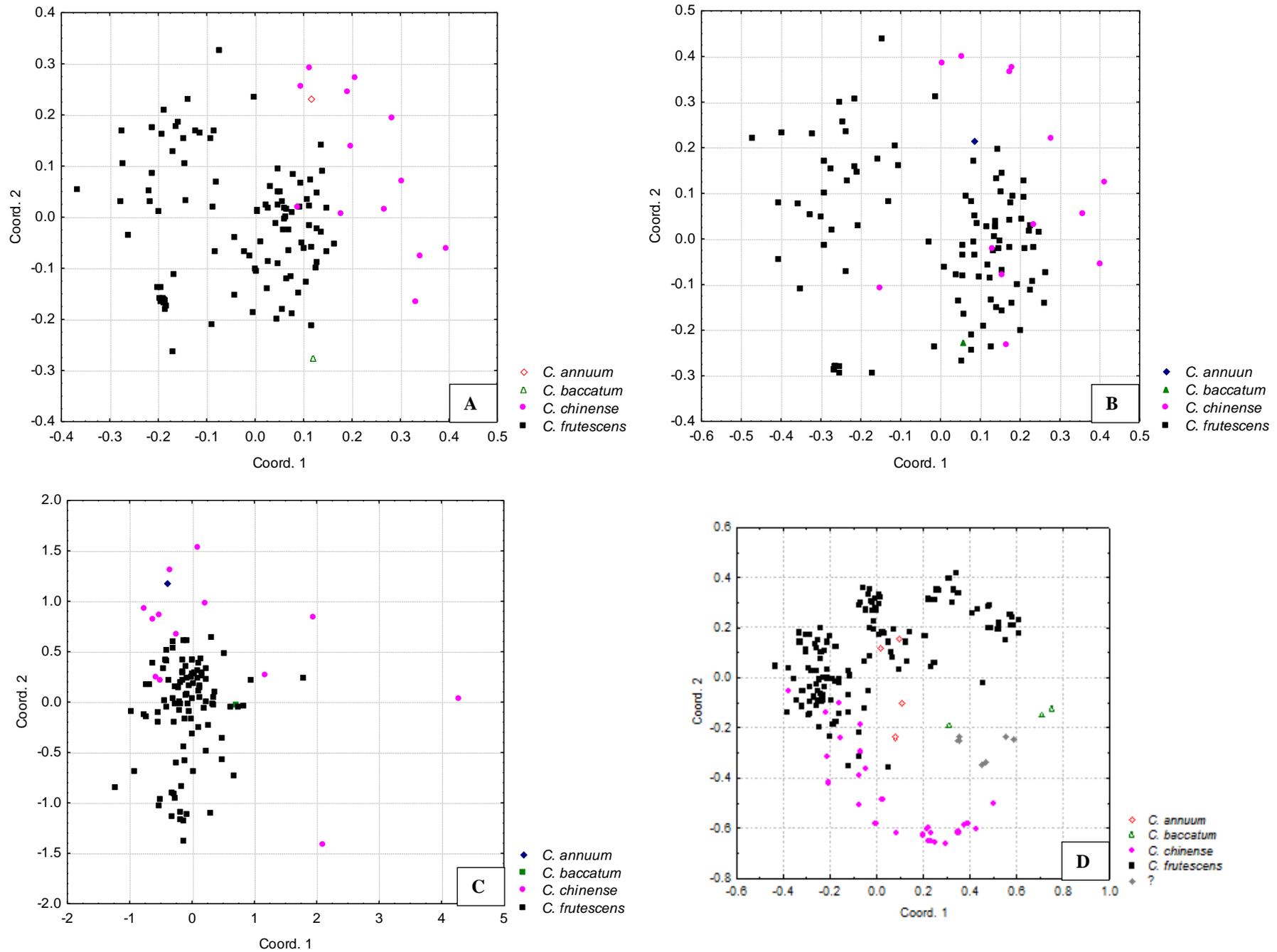


Figura 5. Dispersão gráfica de 115 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 57 descritores morfológicos (A), 30 descritores mínimos morfológicos (B), 12 descritores quantitativos morfológicos (C) e 24 loci de marcadores moleculares microsatélites (D) estratificados por espécies.

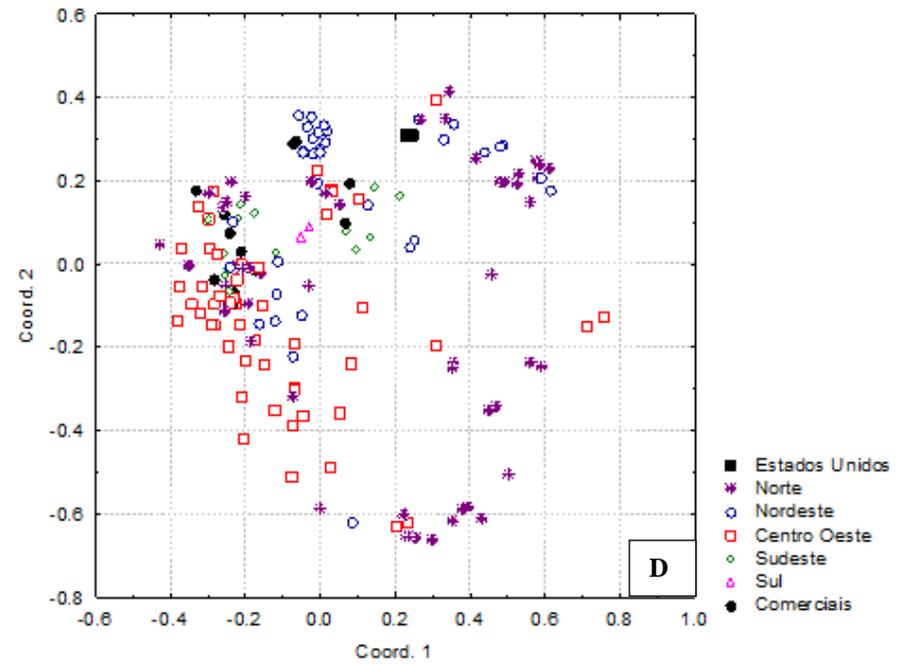
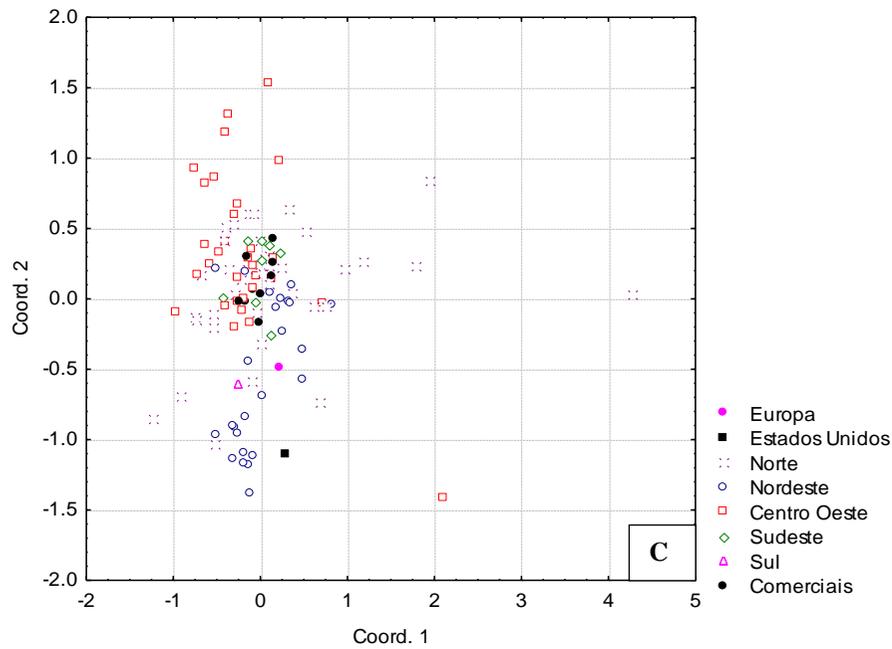
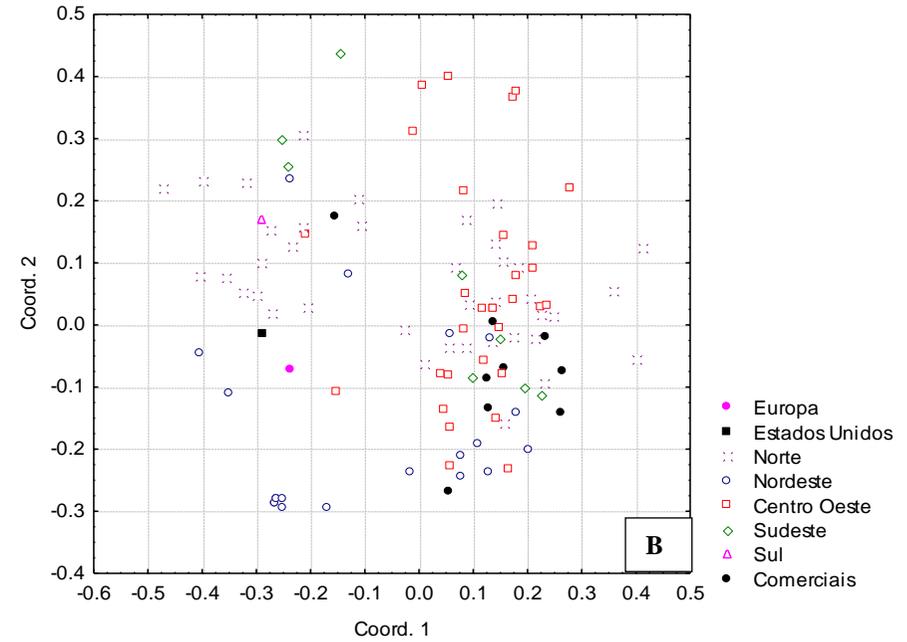
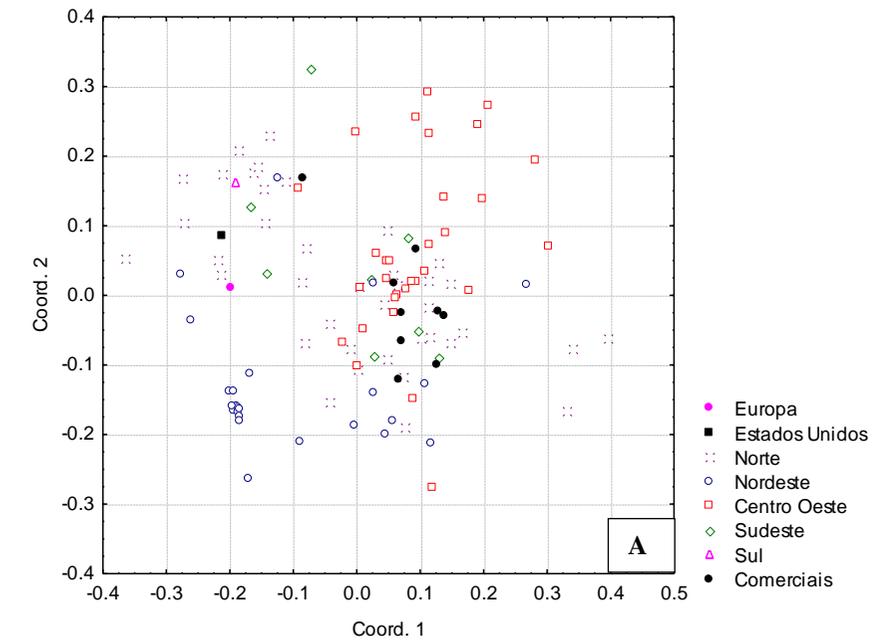


Figura 6. Dispersão gráfica de 115 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se descritores morfológicos (A), 30 descritores mínimos morfológicos (B), 12 descritores quantitativos morfológicos (C) e 24 *loci* de marcadores moleculares microsatélites (D) estratificados por origem.

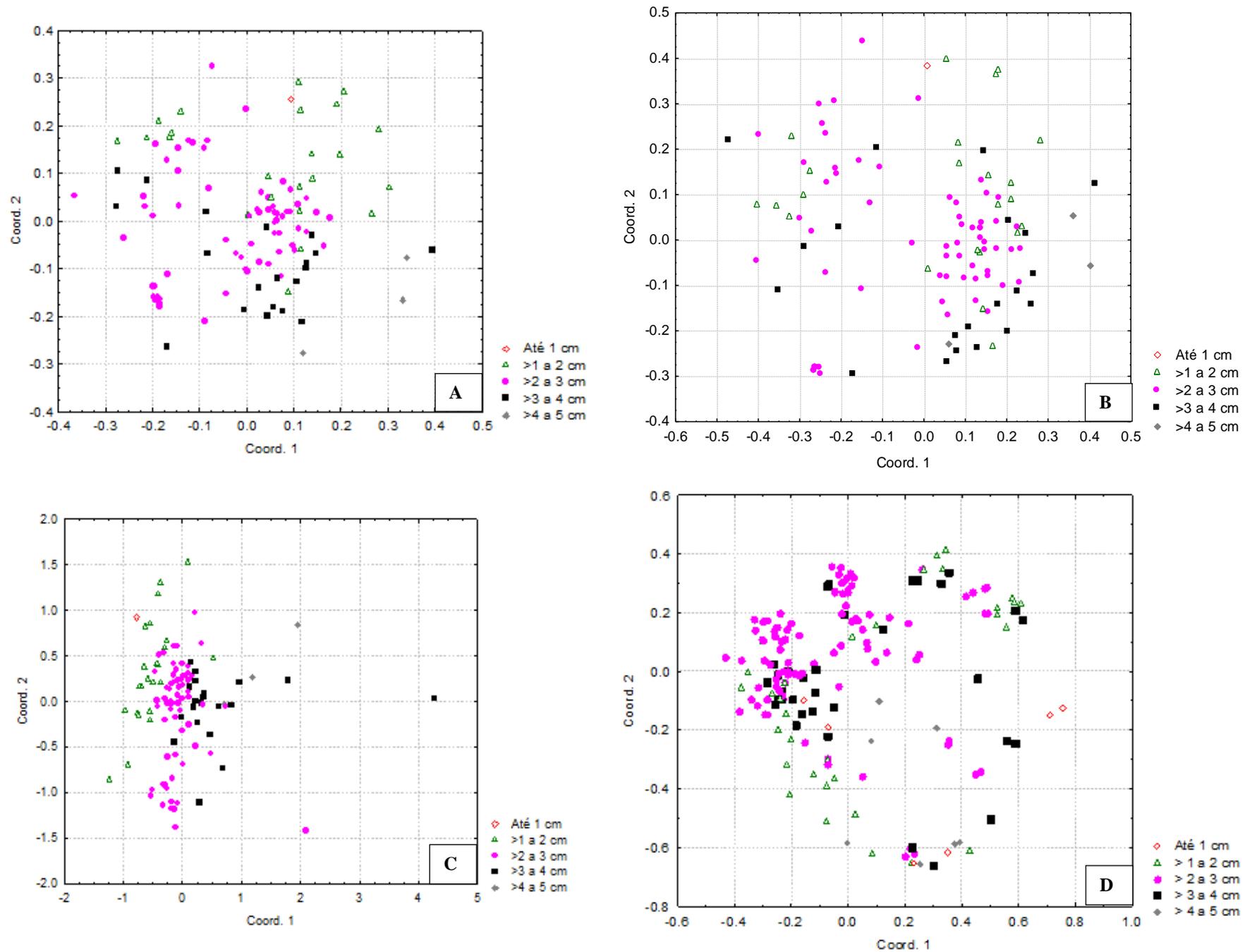


Figura 7. Dispersão gráfica de 115 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 57 descritores morfológicos (A), 30 descritores mínimos morfológicos (B), 12 descritores quantitativos morfológicos (C) e 24 loci de marcadores moleculares microsatélites (D) estratificados por tamanho de fruto.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida**. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

CASTELLEN, M. S.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, E. J.; MONTEIRO FILHO, L. S.; DANTA, J. L. L. Caracterização de acessos do banco ativo de germoplasma de mamão por meio de análise multivariada. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 19, n. 4, p. 299-303, 2007.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG, 2006. 382p.

D'ARCY, W. G.; ESHBAUGH, W. H. New World peppers (*Capsicum* - Solanaceae) north of Colombia: A resume. **Baileya**, v. 19, n. 3, p. 93-105, 1974.

DeWITT, D.; BOSLAND, P. W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 2009. 336p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

JARRET, R. L.; BALDWIN, E.; PERKINS, B.; BUSHWAY, R. GUTHRIE, K. Diversity of fruit quality characteristics in *Capsicum frutescens*. **HortScience**, v. 42, n. 1, p. 16-19, 2007.

- LIU, J. Programa PowerMarker (versão 3.25). Disponível em <http://www.powermarker.net>, 2004.
- MONTEIRO, E. R.; BASTOS, E. M.; LOPES, A. C. A.; GOMES, R. L. F.; NUNES, J. A. R. Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. **Ciência Rural**, v.40, n. 2, p. 288-293, 2010.
- NAGY, I; STÁGEL, A; SASVÁRI, Z; RÖDER, M; GANAL, M. Development, characterization, and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, v. 50, p. 668-688, 2007.
- ORTIZ, R.; DE LA FLOR, F. D.; ALVORADO, G.; CROSSA, J. Classifying vegetable genetic resources - A case study with domesticated *Capsicum* spp. **Scientia horticulturae**, v. 126 186-191, 2010.
- PRASANTH, V. P.; CHANDRA, S.; JAYASHREE, B.; HOISINGTON, D. AlleloBin - A program for allele binning of microsatellite markers based on the the algorithm of Idury and Cardon (1997). **Genome Research**, v.7. p. 1104-1109, 2006.
- PINTO, C. M. F.; SALGADO, L. T.; LIMA, P. C.; PIKANÇO, M.; PAULA JUNIOR, T. J.; MOURA, W. M.; BROMMONSSCHENKEL, S. H. **A cultura da pimenta (*Capsicum* sp.)**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1999. 39p. (Boletim Técnico, 56). 1999.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Org.). ***Capsicum: Pimentas e Pimentões no Brasil***. Brasília, DF: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia/ EMBRAPA Hortaliças, 2000. 133p.
- RÊGO E. R; RÊGO M. M.; MATOS, I. W. F.; BARBOSA, L. A. Morphological and chemical characterization of fruits of *Capsicum* spp. accessions. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 364-371, 2011.
- RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). ***Pimentas Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 200p.
- SAS INSTITUTE INC.. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic diversity. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.
- SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR, C. B. Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L. **American Journal of Botany**, v. 38, p. 362-368, 1951.
- SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR, C.B. Taxonomy of *Capsicum chinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. **Bulletim of the Torrey Botanical Club**. v. 84, n.6, p.413-420. 1957.
- SILVA, W. C. J.; CARVALHO S. I. C.; DUARTE, J. B. Identification of minimum descriptors for characterization of *Capsicum* spp. germplasm. **Horticultura Brasileira**. v. 31: 190-202, 2013.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Publishing, 1980. 633p.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

SUDRÉ, C. P.; CRUZ, C. D.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SILVA, D. J. H.; PEREIRA, T. N. S. Variáveis multicategóricas na determinação da divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 88-93, 2006.

TAM, S. M; LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; SAGE-PALLOIX, A. M.; MHIRI, C.; GRANDBASTIEN, M. A. LTR-retrotransposons Tnt1 and T135 markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, p. 973-989, 2009.

CAPÍTULO 5. COLEÇÃO NUCLEAR DE *Capsicum frutescens* COM BASE EM DESCRITORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

CHAPTER 5. CORE COLLECTION OF *Capsicum frutescens* BASED ON MORPHOLOGIC AND MOLECULAR DESCRIPTORS

RESUMO

A coleção nuclear é um grupo de acessos que retém parte significativa da variabilidade genética existente em uma coleção original visando melhorar a conservação, a acessibilidade e o uso de recursos genéticos pelos programas de melhoramento. Neste trabalho, buscou-se estabelecer uma coleção nuclear de *Capsicum frutescens* a partir de uma coleção ativa de germoplasma de 115 acessos mantida na Embrapa Hortaliças, utilizando um conjunto de informações de 57 caracteres morfológicos e 239 alelos de 24 *loci* de marcadores microssatélites, além da incidência de virose. A seleção dos acessos para a composição da coleção nuclear foi realizada de acordo com a análise da variabilidade genética da coleção ativa utilizando-se análises multivariadas de agrupamentos e dispersão gráfica. Os critérios de seleção dos acessos dentro de cada grupo de similaridade foram distância genética entre os acessos e incidência de virose, contemplando pelo menos um acesso por grupo. A representatividade da variabilidade alélica foi analisada pelos marcadores moleculares microssatélites, calculando-se a porcentagem de alelos da coleção ativa presente em cada grupo de acessos selecionados com base na seleção aleatória e três diferentes estratégias (seleção baseada na variabilidade morfológica, molecular e molecular mais incidência de vírus) para a composição das coleções nucleares. A coleção nuclear foi constituída por 13 acessos, aproximadamente 12,5% da coleção ativa. A melhor estratégia de estabelecimento foi obtida por marcadores moleculares SSR e incidência de viroses, que atingiu a maior representatividade alélica e capturou 77% da variabilidade genética, além de representar satisfatoriamente a diversidade geográfica. Os caracteres morfológicos usados também apresentaram uma representatividade alta da variabilidade genética (73%) e uma correlação significativa (0,66) com a análise molecular. Foi possível o estabelecimento da coleção nuclear de *C. frutescens* utilizando-se marcadores moleculares SSR e características morfológicas, demonstrando-se a importância e as implicações de se utilizarem diferentes grupos de características e estratégias de seleção.

Palavras-chaves: coleção de germoplasma, variabilidade genética, pimenta, microssatélites.

ABSTRACT

Core collection is a group of accessions that retains significant part of the genetic variability of a complete collection and is used to improve conservation, accessibility and use of genetic resources for breeding programs. In this study, we aimed to establish a core collection of *Capsicum frutescens* from an active germplasm collection of 115 accessions maintained at Embrapa Vegetables, using a set of information of 57 morphological traits and 239 alleles of 24 of microsatellite *loci*, as well as incidence of viral diseases. The selection of accessions for composing the core collection was based on the analysis of the genetic variability of the active collection using multivariate analysis of clusters and graphical dispersion. The criteria for selection of accessions within each similarity group were the genetic distance between accessions and the incidence of viruses, at least one accession being selected from each group. The representativeness of the allelic variability was analyzed by microsatellite markers by calculating the percentage of alleles present in each group of accessions selected based on random selection and three different strategies (selection based on variability of morphologic traits, SSR *loci*, and SSR plus incidence of virus) for the composition of the core collections. The core collection consisted of 13 accessions, approximately 12.5 % of the active collection. The best strategy of selection was SSR *loci* plus incidence of viruses, which reached the highest allelic representativity (77%) and satisfactorily represented the geographic diversity. The used morphological traits also showed a high representation of the allelic variability (73%) and a significant correlation with the molecular analysis (0.66). It was possible to establish a core collection of *C. frutescens* using SSR molecular markers and morphological traits demonstrating the importance and implications of using different sets of traits and selection strategies.

Key words: germplasm collection, genetic variability, pepper, SSR markers.

5.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Capsicum frutescens* encontra-se disseminada por todas as regiões brasileiras, sendo principalmente encontrada e amplamente utilizada na região Norte (IBPGR, 1983; SMITH e HEISER JUNIOR, 1957, BARBOSA et al., 2002), bem como apresenta boa representatividade nas regiões Centro-Oeste e Nordeste devido a sua adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005).

Alguns exemplos de utilização da pimenta malagueta na culinária e na medicina destacam a importância da espécie *C. frutescens* na região Amazônica como o uso da damorida (caldo geralmente preparado à base de pimenta malagueta, servido com peixe ou carne de caça, hoje um prato regional), a jiquitaia (pimenta desidratada em pó, às vezes com sal) e os molhos preparados artesanalmente com pimentas inteiras e/ou trituradas acrescidas de uma base líquida (tucupi - manipueira extraída da mandioca, soro-de-leite, vinagre, etc). O uso medicinal pelos índios é muito amplo e os Yanomami da floresta, os Macuxi, Wapichana e Taurepang do lavrado usam a pimenta malagueta para curar oftalmia, febre e até malária (NASCIMENTO FILHO et al., 2007). Diversos pratos típicos regionais do Brasil utilizam a malagueta e outros tipos de pimenta, como por exemplo: acarajé e vatapá na Bahia, pato no tucupi na região Norte, galinhada no Centro-Oeste e feijoada no Rio de Janeiro (REIFSCHNEIDER et al., 2009).

Independentemente da importância no Brasil, há pouca disponibilidade de informação sobre a morfologia e a variabilidade existente em *C. frutescens*, bem como outros caracteres que possam torná-las de grande valor para programas de melhoramento. Segundo JARRET et al. (2007), grande parte das variedades da pimenta tabasco (*C. frutescens*) cultivadas nos Estados Unidos foi resultado da seleção humana dentro de variedades existentes e há poucos dados disponíveis na literatura científica sobre a variabilidade de características agrônômicas ou hortícolas dentro do pool genético dessa espécie.

Acessos coletados em uma ampla área geográfica de diferentes condições ecológicas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil indicam que essas regiões podem ter desempenhado um papel importante na diferenciação genética dessa espécie. Esses acessos estão armazenados no banco ativo de germoplasma de *Capsicum* (BAG) da Embrapa Hortaliças. Para auxiliar o estudo da variabilidade genética contida no BAG e, conseqüentemente, permitir o uso dessa coleção pelos programas de

melhoramento, várias estratégias podem ser adotadas, dentre elas o estabelecimento da coleção nuclear de *C. frutescens*.

A coleção nuclear consiste em um conjunto reduzido de acessos que procura representar a variabilidade genética de uma coleção de germoplasma, com um mínimo de redundância (FRANKEL e BROWN, 1984). Essa estratégia possibilita priorizar e concentrar as atividades de caracterização e avaliação dessa coleção, de modo a formar uma base de informação mais completa sobre esse conjunto de acessos e assim permitir o uso do germoplasma (CORDEIRO e ABADIE, 2007). Dentre as consequências práticas do desenvolvimento de uma coleção nuclear ressaltam-se: potencializar a exploração da diversidade genética da coleção pelos programas de melhoramento genético e servir de base para estudos sobre a própria representatividade da coleção em relação à variabilidade genética da espécie (FERREIRA et al., 2007).

Marcadores microssatélites têm sido utilizados para o estabelecimento de coleção nuclear e mostraram em um estudo sobre a diversidade do trigo, ser uma ferramenta muito efetiva tanto para avaliar grandes coleções de recursos genéticos como para a construção de uma coleção nuclear (BALFOURIER et al., 2007). Em *Capsicum*, a compilação de dados fenotípicos e genotípicos (genotipagem com 28 marcadores SSR) permitiu o estabelecimento de uma coleção nuclear de 332 acessos de *C. annum*, capturando 97 % da diversidade genética e fenotípica para estudos de associação genética (NICOLAI et al., 2013).

A coleção nuclear pode ser estabelecida visando representar a diversidade genética, cultural, de uso, ecológica ou geográfica, bem como para caracteres de importância agrônômica como resistência a doenças e pragas. As viroses contam entre as doenças mais importantes e complexas para as espécies do gênero *Capsicum*, principalmente para a pimenta malagueta (*C. frutescens*), podendo afetar a produtividade e resultar em perdas significativas na produção. A severidade de sintomas, assim como também as perdas, são mais pronunciadas quando a planta é infectada no estágio de mudas ou no caso de ocorrência de infecção mista, quando mais de uma espécie de vírus infecta a mesma planta. A intensidade dos sintomas em plantas afetadas depende da espécie de pimenta e do nível de resistência da variedade, idade da planta na época da infecção, nível de virulência da estirpe do vírus, ocorrência de mais de um vírus infectando a planta, condições ambientais e nutrição da planta. Diversos vírus infectam pimenteiros, sendo os mais importantes os potyvírus, os tospovírus, o tobamovírus e o cucumovírus (INOUE-NAGATA et al., 2002; PERNEZNY et al.,

2003). Híbridos e linhagens de *C. frutescens* do programa de melhoramento da Embrapa oriundos do BAG apresentaram incidência a vírus (LIMA et al., 2011).

Neste trabalho, buscou-se estabelecer uma coleção nuclear de *C. frutescens* a partir de uma coleção ativa de 115 acessos, empregando informações da caracterização morfológica com 57 descritores, da incidência de viroses e da caracterização molecular utilizando 239 alelos de 24 *loci* de marcadores SSR.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material genético

Cento e quinze acessos identificados como *C. frutescens* no BAG de *Capsicum* mantido na Embrapa Hortaliças (Tabela 1) foram avaliados para as características morfológicas, incluindo a incidência de viroses, além da caracterização utilizando marcadores moleculares microssatélites.

5.2.2 Caracterização morfológica e molecular

A caracterização morfológica dos 115 acessos foi feita utilizando 57 descritores internacionais recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995) avaliados em cinco plantas de cada acesso. Na avaliação dos caracteres relacionados aos frutos, com exceção de peso, para o qual foram considerados 10 frutos/planta/acesso, os demais descritores foram avaliados em 5 frutos /planta / acesso.

As espécies foram classificadas por meio de uma chave para identificação de espécies e variedades domesticadas e semidomesticadas do gênero *Capsicum* de ocorrência no Brasil (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

A incidência de virose nos acessos de *Capsicum* foi avaliada em campo e em telado por LIMA et al. (2010, 2011), por meio de sintomas visuais típicos de infecção viral, pela presença de insetos vetores nas áreas infectadas e por meio de teste sorológico DAS-ELISA. As plantas foram avaliadas para a presença de tospovírus (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV; *Groundnut ringspot virus* – GRSV, *Tomato chlorotic spot virus* – TCSV), potyvírus (*Potato virus Y* – PVY; *Pepper yellow mosaic virus* – PepYMV), tobamovírus (*Pepper mild mottle virus*– PMMoV) e cucumovírus (*Cucumber mosaic virus* – CMV).

O critério de seleção entre os acessos para a incidência de viroses foi o de menor ocorrência de mais de um tipo desses vírus infectando as plantas de cada acesso.

Tabela 1. Acessos de *Capsicum* do banco ativo de germoplasma de *Capsicum*, mantido na Embrapa Hortaliças, avaliados com base em características morfológicas e moleculares e respectivos grupos de similaridade genética obtidos nas análises de agrupamento.

	Nº CNPH	ORIGEM	AGRUPAMENTOS E ESPÉCIES IDENTIFICADAS MORFOLOGICAMENTE		AGRUPAMENTOS E ESPÉCIES IDENTIFICADAS MOLECULARMENTE	
1	63	Minas Gerais	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
2	287	Goiás	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
3	595	Sete Lagoas, MG	<i>C. frutescens</i>	G5	<i>C. frutescens</i>	G1
4	597	Anápolis, GO	<i>C. frutescens</i>	G5	<i>C. frutescens</i>	G1
5	1386	Arapiraca, AL	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
6	2631	Paracatu, MG	<i>C. frutescens</i>	G5	<i>C. frutescens</i>	G1
7	2744	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
8	2841	Brasiléia, AC	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
9	2866 A ²	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
10	2866 B ²	Guajará Mirim, RO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G7
11	2869	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
12	2870	Guajará Mirim, RO	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
13	2871	Porto Velho, RO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G7
14	3000	Europa	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
15	3241	Brasília, DF	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
16	3257	São Luís, MA	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
17	3286	Castanhal, PA	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
18	3349	Lagoa Santa, MG	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
19	3374 ¹	Ceasa, DF	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
20	3399	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
21	3410	Formosa, MG	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
22	3414	Petrópolis, RJ	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
23	3440	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
24	3446	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
25	3448	Manaus, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
26	3453	Manaus, AM	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G7
27	3462	Irlanduba, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
28	3470	Irlanduba, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
28	3484	Pres. Figueiredo, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
30	3499	Manacapuru, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
31	3535 A ²	Rio Preto da Eva, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
32	3535 B ²	Rio Preto da Eva, AM	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G7
33	3539	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
34	3546	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
35	3550	Itacoatiara, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
36	3606 A ²	Urucará, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G4
37	3606 B ²	Urucará, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. chinense</i>	G7
38	3612	Silves, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
39	3621	Montes Claros, MG	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
40	3630	EUA	<i>C. frutescens</i>	G2	<i>C. frutescens</i>	G1
41	3645	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
42	3646 ¹	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
43	3647	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
44	3648	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
45	3649	Teresina, PI	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G6
46	3667	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
47	3696	Goiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
48	3697	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
49	3698	Piracanjuba, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
50	3715	Boa Vista, RO	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G6
51	3716 ³	Boa Vista, RO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G3
52	3746	-	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
53	3804 ³	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2

TABELA 1. Continuação...

54	3805 ³	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2
55	3806 ³	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2
56	3813 ³	Caldas Novas, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2
57	3815 ³	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2
58	3816 A ²	Piracanjuba, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
59	3816 B ²	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G2
60	3818 ³	Piracanjuba, GO	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. frutescens</i>	G2
61	3819	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
62	3820	Salvador, BA	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G1
63	3821	Salvador, BA	<i>C. frutescens</i>	G6	<i>C. frutescens</i>	G5
64	3835	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
65	3847	Barretos, SP	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
66	3861	Chá Grande, PE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
67	3880	Nova Estrela, RO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
68	3885	Ji-Paraná, RO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
69	3891	Rolim de Moura, RO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
70	3894	Ouro Preto do Oeste, RO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G4
71	3906	Campo Grande, MT	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
72	3932	Manaus, AM	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
73	3944	Natal, RN	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G4
74	3984	Farroupilha, RS	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
75	4005 ¹	Araguatins, TO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2, G3
76	4011	Petrolina de Goiás, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
77	4020	Belo Horizonte, MG	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
78	4037	Guaraí, TO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G4
79	4052	São Luís, MA	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
80	4069	Ceasa, DF	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
81	4082	Abadiânia, GO	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	G7	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	G7
82	4083	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G2
83	4084A ²	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
84	4084B ²	Abadiânia, GO	<i>C. chinense</i>	G3	<i>C. chinense</i>	G3
85	4085	Abadiânia, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
86	4095	Porto Alegre, RS	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
87	4105	Petrolina de Goiás, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
88	4138	Belém, PA	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
89	4154 A ²	Belo Horizonte, MG	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
90	4154 B ²	Belo Horizonte, MG	<i>C. chinense</i>	G3	<i>C. chinense</i>	G7
91	4161	São Paulo, SP	<i>C. frutescens</i>		<i>C. frutescens</i>	
92	4184	Bujari, AC	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
93	4191	Rio Branco, Acre	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
94	4195	Rio Branco, Acre	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
95	4212	Brasília, DF	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	G7	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	G7
96	4224	Rianópolis, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
97	4231	Ceres, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
98	4237	Rialma, GO	<i>C. frutescens</i>	G3	<i>C. frutescens</i>	G2
99	4263	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
100	4264	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
101	4265	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
102	4266	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
103	4267	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
104	4268	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
105	4269	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
106	4270	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
107	4271	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
108	4272	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
109	4273	Fortaleza, CE	<i>C. frutescens</i>	G4	<i>C. frutescens</i>	G4
110	4274	Itapuranga, GO	<i>C. chinense</i>	G4	<i>C. chinense</i>	G7
111	4283	São Gabriel da Cachoeira, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G2
112	4304	São Gabriel da Cachoeira, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G3
113	4353	Marituba, PA	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G4

TABELA 1. Continuação...

114	4364	Cucuí, AM	<i>C. frutescens</i>	G1	<i>C. frutescens</i>	G2
115	4367	Cucuí, AM	<i>C. chinense</i>	G7	<i>C. chinense</i>	G7

¹Acessos segregantes . ²Acessos com mistura de espécies. ³Acesso com diferentes identificações de espécies.

Vinte e quatro pares de *primers* que geraram marcadores com maior resolução e polimorfismo foram utilizados na caracterização molecular dos acessos de *C. frutescens*: CA 19, CA 20, CA 26, CA 27, CA 29, CA 41, CA 49, CA 52, CA 56, CA 62, CA 79, CA 88, CA 96, CA 131, CA 159, CA 167, CA 172, CA 174, CA 178, EPMS 331, EPMS 376, EPMS 386, EPMS 417.

Amostras de folíolos de duas plantas de cada um dos 115 acessos estudados foram coletadas individualmente e utilizadas para a extração do DNA, realizada pelo método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998). A concentração de DNA de cada tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com padrões de DNA Lambda de diferentes concentrações. Cada amostra foi diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

Reações de amplificação de 230 amostras de DNA utilizando 24 pares de *primers* SSR foram realizadas conforme descritas no capítulo 4, bem como o preparo das amostras para genotipagem no sequenciador modelo ABI 3730.

Os dados da caracterização morfológica, que compreenderam as 57 características qualitativas e quantitativas categóricas, foram utilizados para estimar a distância genética entre os acessos utilizando a análise de correspondência simples. As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2006), conforme a seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo: DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j ;
NLC = Número de Locos Coincidentes; NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente) para encontros (0 1) e (1 0).

As matrizes de dissimilaridade genética entre os 115 acessos com base nos 57 descritores multicategóricos, bem como nos marcadores moleculares foram utilizadas para realizar a análise de agrupamento por meio de dendrograma utilizando o método do UPGMA (*Unweighted pair-group method arithmetic average*) como critério de

agrupamento. Realizou-se também a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

5.2.3 Composição da coleção nuclear

O método de seleção dos acessos para a composição da coleção nuclear é a estratégia de escolha dependente da diversidade genética (RAAMSDONK e WIJNKER, 2000). A porcentagem da redução da coleção ativa foi realizada com base nos estudos de variabilidade genética utilizando análises de agrupamentos. Os grupos de similaridade foram estabelecidos utilizando os descritores morfológicos e os marcadores moleculares microssatélites. Os critérios de seleção dentro de cada grupo foram a distância genética entre os acessos e a incidência de virose, contemplando pelo menos um acesso por grupo. Quatro composições de coleção nuclear foram propostas empregando a seleção aleatória (controle) e três estratégias: 1. seleção com base na representatividade dos grupos de similaridade definidos pelos descritores morfológicos; 2. seleção com base na representatividade dos grupos de similaridade definidos pelos marcadores moleculares SSR; 3. seleção com base na representatividade dos grupos de similaridade definidos pelos marcadores moleculares SSR e incidência de viroses.

A representatividade da variabilidade alélica foi analisada pelos marcadores moleculares microssatélites, calculando-se a porcentagem de alelos da coleção ativa presente em cada grupo de acessos selecionados com base no controle e nas diferentes estratégias propostas para a composição das coleções nucleares. Foi também estabelecida uma coleção nuclear tendo como referência a representatividade dos grupos definidos pelos marcadores moleculares SSR e a incidência de viroses contemplando 100% da variabilidade alélica.

5.3 RESULTADOS

Os 115 acessos avaliados por meio da chave para identificação de espécies resultaram em 97 acessos de *C. frutescens*, 16 acessos de *C. chinense*, 1 acesso de *C. baccatum* var. *pendulum* e 1 acesso de *C. annuum* var. *glabriusculum*.

A análise de agrupamento realizada de acordo com a matriz de distâncias genéticas calculadas a partir dos 57 descritores morfológicos (Figura 1) permitiu subdividir os 97 acessos classificados como *C. frutescens* em seis grupos de

similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,68. Na caracterização molecular foram agrupados 104 acessos pertencentes a *C. frutescens* (Figura 2), incluindo os 97 de *C. frutescens* mais outros sete classificados como *C. chinense*. As distâncias genéticas calculadas a partir de marcadores SSR permitiu subdividir os 104 acessos também em seis grupos de similaridade genética a uma distância genética relativa de 0,50.

O grupo 1 foi composto por 12 acessos, dos quais 11 são tipicamente pimenta malagueta e um pimenta tabasco. As principais características distintas desse grupo em relação aos demais são: florescimento e frutificação precoce, com início 30 e 60 dias após o transplante, respectivamente; fruto com ombro agudo e persistência intermediária, ou seja, facilidade média de desprendimento do fruto maduro.

O grupo 2 foi constituído por 61 acessos, a maioria pertencente ao tipo pimenta malagueta, diferindo dos demais grupos por apresentar plantas com o menor comprimento (45 a 65 cm), largura (120 a 160 cm), comprimento da haste (15 a 30 cm) e diâmetro da haste (1 a 2 cm), além de formar um subgrupo de acessos com presença da constrição anelar do cálice e morfologicamente identificados como *C. chinense*.

O grupo 3 foi formado por cinco acessos, sendo três classificados morfologicamente como *C. chinense* e dois *C. frutescens*. Nesse grupo, ocorreu de forma predominante o florescimento e frutificação tardio, com início 90 e 120 dias após o transplante, respectivamente; frutos com menor comprimento (1 a 2 cm), maior largura (5 a 8 cm), maior espessura da parede (4 a 5 mm) e ombro truncado; além da presença da constrição anelar do cálice nos acessos classificados como *C. chinense*.

O grupo 4 foi constituído por 18 acessos formando dois subgrupos, um dos quais com 4 acessos tipicamente de pimenta malagueta e o outro com 14 acessos de pimenta tabasco. Esse grupo se distinguiu dos demais por apresentar plantas com o maior comprimento (acima de 85 cm), largura (acima de 160 cm), comprimento da haste (acima de 50 cm) e largura da haste (acima de 3 cm); margem do cálice da flor intermediária; persistência baixa, ou seja, alta facilidade de desprendimento do fruto maduro e cor do fruto imaturo verde amarelado presente nos acessos tipo tabasco.

O grupo 5 foi composto por apenas um acesso (CNP 3821), apesar de possuir características semelhantes às malaguetas, foi o único que apresentou fruto com forma da ponta afundada, secção transversal intermediária, comprimento da placenta entre $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ e o maior comprimento do pedúnculo (acima de 3 cm).

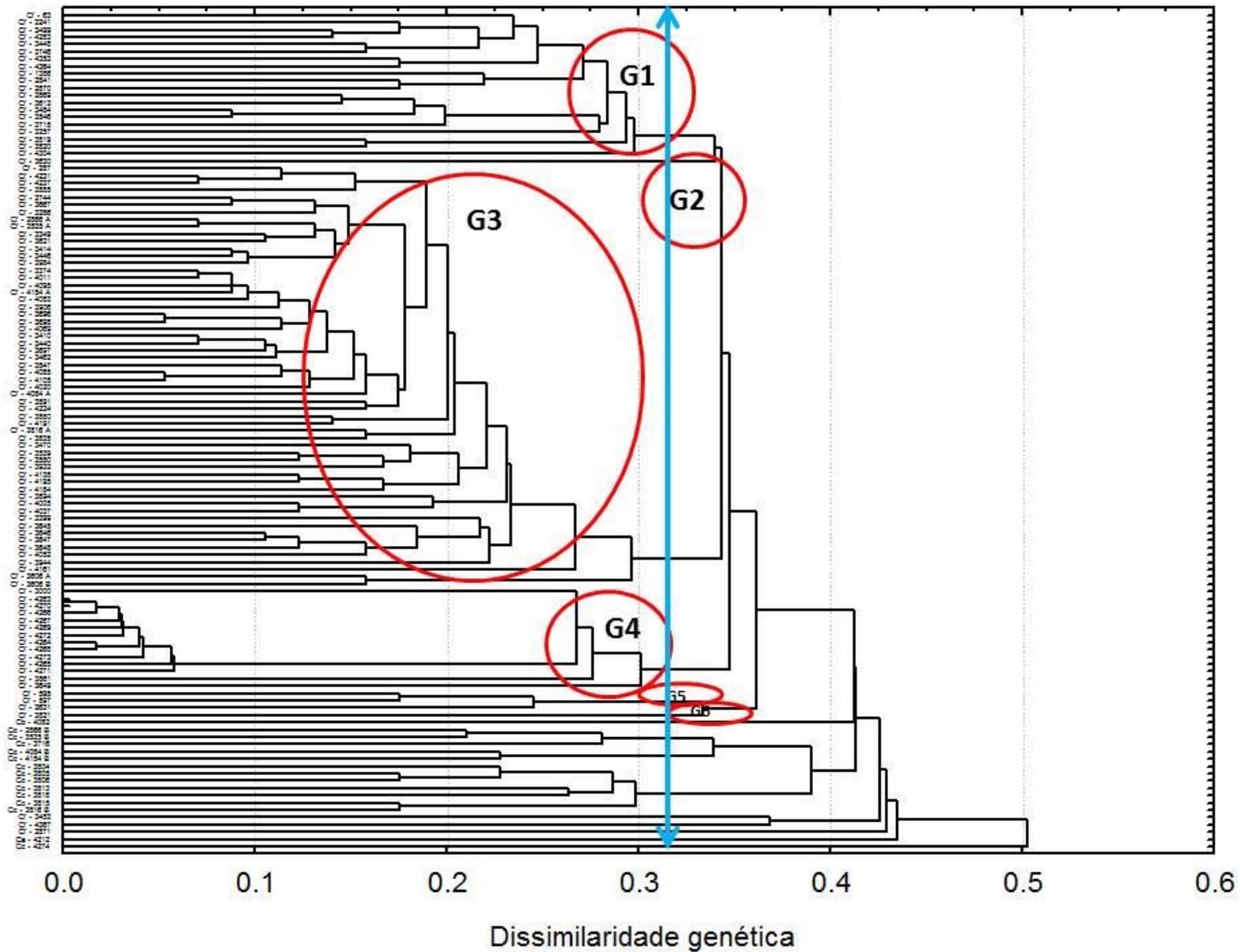


Figura 1. Análise de agrupamento de 115 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas calculadas utilizando-se 57 descritores morfológicos.

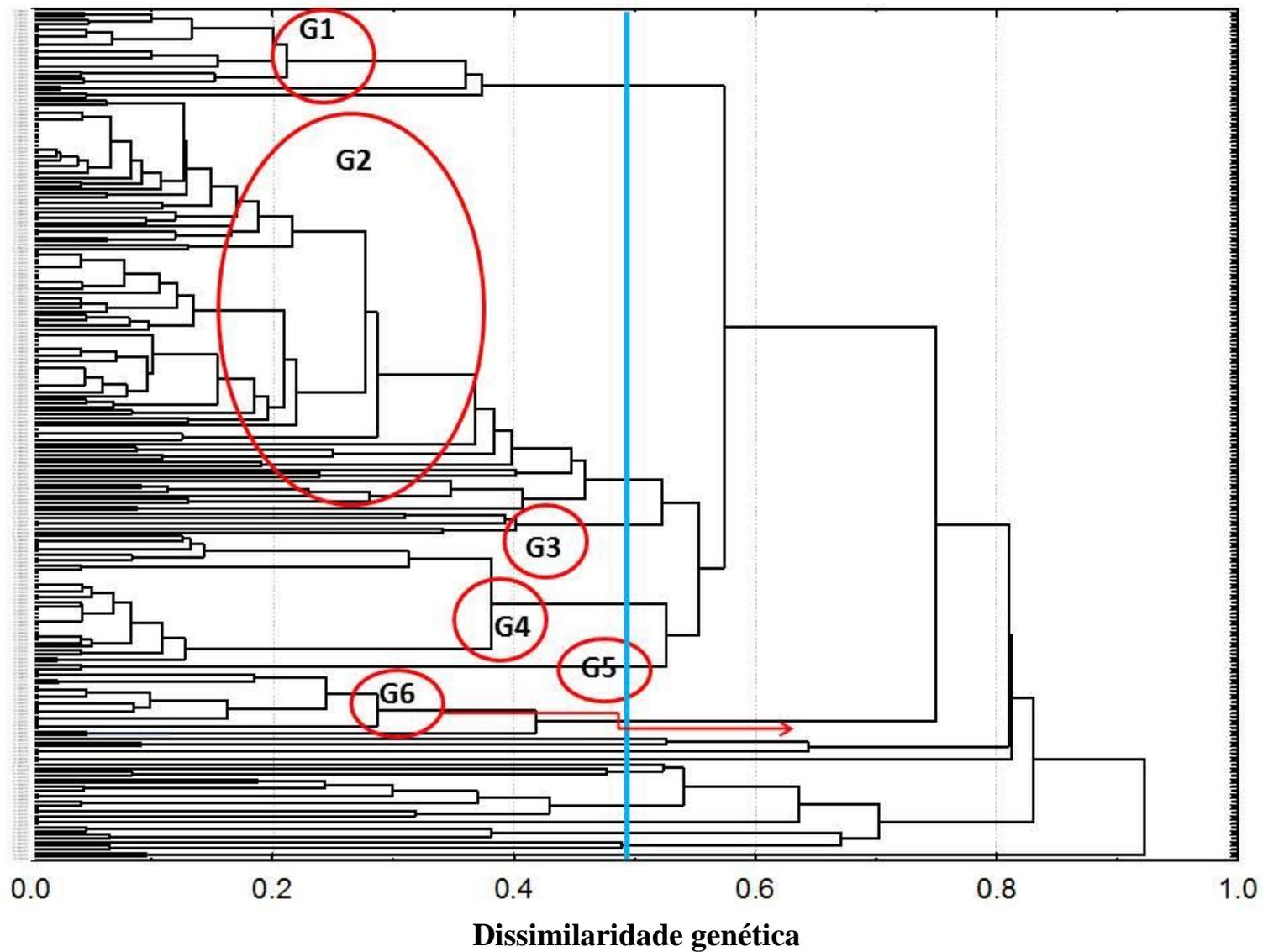


Figura 2. Análise de agrupamento de 115 acessos de *Capsicum* com base na matriz de distâncias genéticas obtidas a partir de 239 alelos de 24 *loci* de marcadores microssatélites.

O grupo 6 foi constituído por 9 acessos do tipo pimenta malagueta, que apresentou plantas com hábito de crescimento ereto e frutos com persistência baixa, ou seja, com facilidade alta de desprendimento do fruto maduro.

As coleções nucleares de *C. frutescens* foram constituídas por 13 acessos (12,5%) da coleção ativa. Os 13 acessos selecionados em cada estratégia, bem como a representatividade alélica de cada coleção nuclear em relação à coleção ativa são apresentadas na Tabela 2.

A representatividade alélica das coleções nucleares variou de 29,3% (seleção aleatória) a 77% (seleção com base em marcadores moleculares e virose). A representatividade da coleção nuclear estabelecida com base nos 57 descritores morfológicos (73%) e da estabelecida com base nos marcadores moleculares SSR (75,8%) foi semelhante. A correlação positiva de 0,66 entre as distâncias genéticas calculadas de acordo com os descritores morfológicos e os marcadores moleculares explica este resultado. A análise morfológica com base em 57 descritores foi muito completa, equivalendo-se a análise molecular. A boa representatividade da variabilidade genética das coleções nucleares estabelecidas no trabalho também pode ser verificada nos gráficos de dispersão (Figuras 3 e 4).

Certamente, a redução do número de descritores morfológicos na caracterização dos acessos e também a redução do número de acessos poderiam levar a uma menor representatividade da variabilidade alélica da coleção ativa.

A coleção nuclear estabelecida de acordo com os marcadores moleculares e a incidência de viroses atingiu a maior representatividade de 77% da variabilidade genética da coleção ativa. Os 13 acessos selecionados de *C. frutescens* nessa coleção representaram as três regiões de coletas: a região Norte (53,8%), Nordeste (30,8%) e a Centro-Oeste (15,4%). Todas as regiões foram representadas indicando que a técnica de amostragem foi adequada, além da maior porcentagem obtida na região Norte, que é considerada a área de maior diversidade e onde a pimenta malagueta é muito consumida pelas comunidades indígenas locais, sendo encontradas até mesmo em populações silvestres da espécie. Além disso, os acessos selecionados foram bem distribuídos no gráfico de dispersão (Figura 3b), representando boa parte da variabilidade genética dos acessos da coleção ativa.

A obtenção de 100% da representatividade alélica foi atingida com a inclusão de oito acessos (Tabela 2). Entretanto, essa máxima variabilidade alélica somente foi possível com a inclusão de três acessos segregantes para características de formato e tamanho de frutos, dois acessos com mistura de espécies, bem como de três acessos

Tabela 2. Coleções nucleares de *Capsicum frutescens* estabelecidas com base na seleção aleatória e em três estratégias de seleção e respectivas representatividades alélicas em relação à coleção ativa e a representada com 100% da variabilidade alélica.

Estratégias de Seleção	Aleatória	Morfológica	Molecular	Molecular + Vírus	Molecular + Vírus
Acessos selecionados	CNPH 287	CNPH 63	CNPH 63	CNPH 597	CNPH 597
	CNPH 2744	CNPH 287	CNPH 287	CNPH 3470	CNPH 3470
	CNPH 3286	CNPH 575	CNPH 1386	CNPH 3484	CNPH 3484
	CNPH 3399	CNPH 3446	CNPH 2841	CNPH 3698	CNPH 3698
	CNPH 3440	CNPH 3550	CNPH 3286	CNPH 3715	CNPH 3715
	CNPH 3462	CNPH 3630	CNPH 3399	CNPH 3820	CNPH 3820
	CNPH 3470	CNPH 3645	CNPH 3630	CNPH 3821	CNPH 3821
	CNPH 3539	CNPH 3649	CNPH 3716	CNPH 3861	CNPH 3861
	CNPH 3697	CNPH 3821	CNPH 3835	CNPH 3885	CNPH 3885
	CNPH 3932	CNPH 3944	CNPH 3894	CNPH 3891	CNPH 3891
	CNPH 4020	CNPH 4020	CNPH 4037	CNPH 3894	CNPH 3894
	CNPH 4283	CNPH 4263	CNPH 4161	CNPH 3944	CNPH 3944
	CNPH 4364	CNPH 4304	CNPH 4264	CNPH 4304	CNPH 4304
	-	-	-	-	CNPH 3374 ¹
	-	-	-	-	CNPH 3606 ²
	-	-	-	-	CNPH 3646 ¹
	-	-	-	-	CNPH 4005 ¹
	-	-	-	-	CNPH 4084 ²
	-	-	-	-	CNPH 3716 ³
	-	-	-	-	CNPH 3805 ³
-	-	-	-	CNPH 3813 ³	
Repres. Alélica (%)	29,3	73	75,8	77	100

¹ Acessos segregantes

² Acessos com mistura de espécies

³ Acessos identificados na caracterização morfológica como *C. chinense* e na molecular como *C. frutescens*.

identificados na caracterização morfológica como *C. chinense* e na molecular como *C. frutescens*. Nos dados de passaportes desses três acessos constavam que eram advindos de prováveis fecundações cruzadas, resultantes da proximidade de plantio entre as espécies *C. chinense* e *C. frutescens*.

A escolha dos acessos de *C. frutescens* para a coleção nuclear com menor incidência de vírus foi realizada com base nos resultados da avaliação de 31 acessos no campo e 71 acessos no telado, totalizando 543 amostras coletadas e analisadas em teste sorológico para incidência de sete vírus (TSWV, GRSV, TCSV, PVY, PepYMV, PMMoV, CMV), não tendo sido realizadas inoculações artificiais. A presença de um ou mais dos vírus foi detectada em 70 de 341 amostras analisadas e os vírus detectados

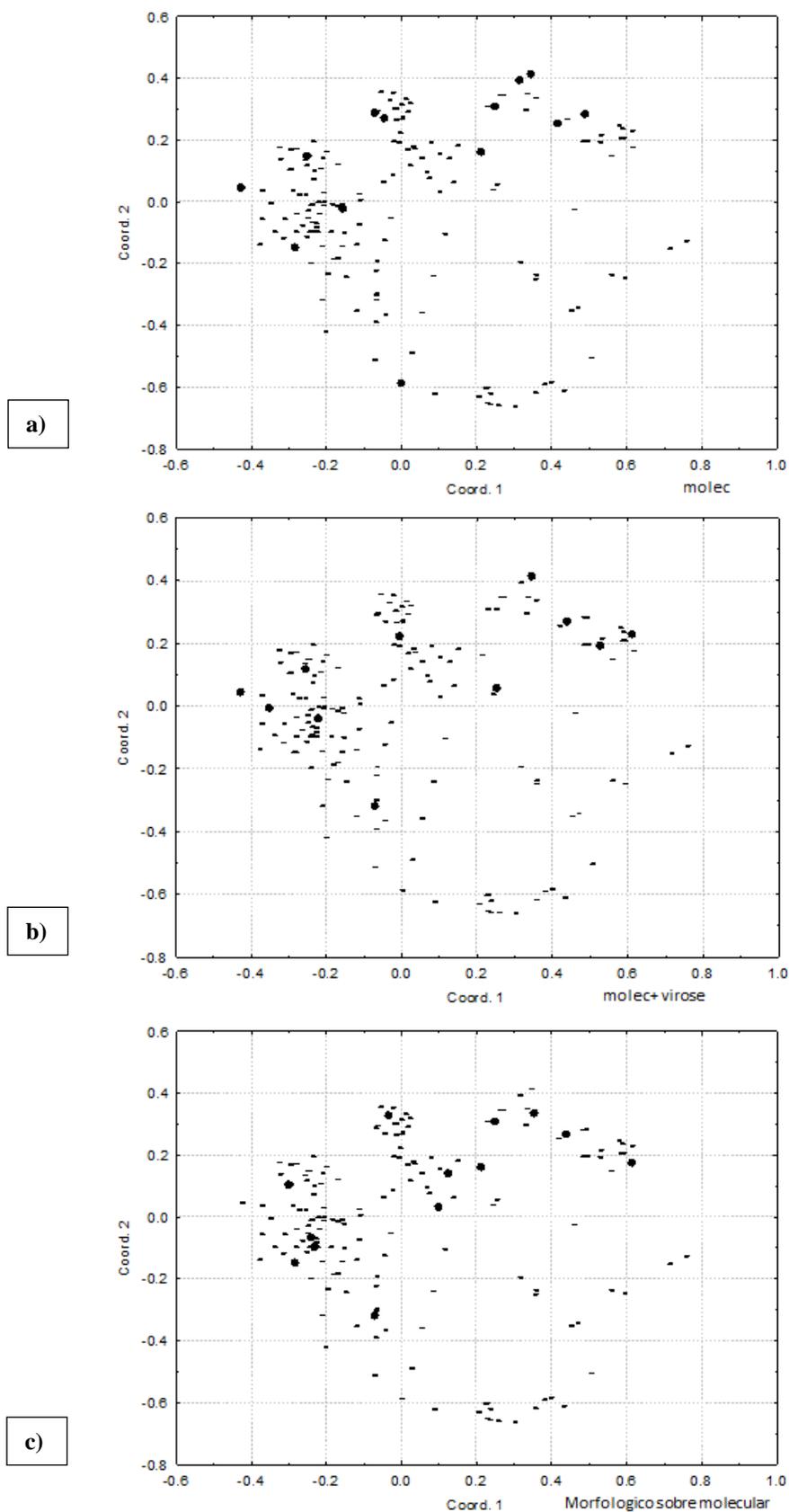


Figura 3. Dispersão gráfica de 104 acessos de *Capsicum frutescens* com base na matriz de distâncias genéticas estimadas utilizando 239 alelos de 24 *loci* de marcadores moleculares microssatélites (SSR). Os 13 acessos em destaque foram selecionados com base na representatividade dos grupos de similaridade definidos: a) pelos marcadores SSR; b) pelos marcadores SSR e incidência de virose e c) pelos descritores morfológicos.

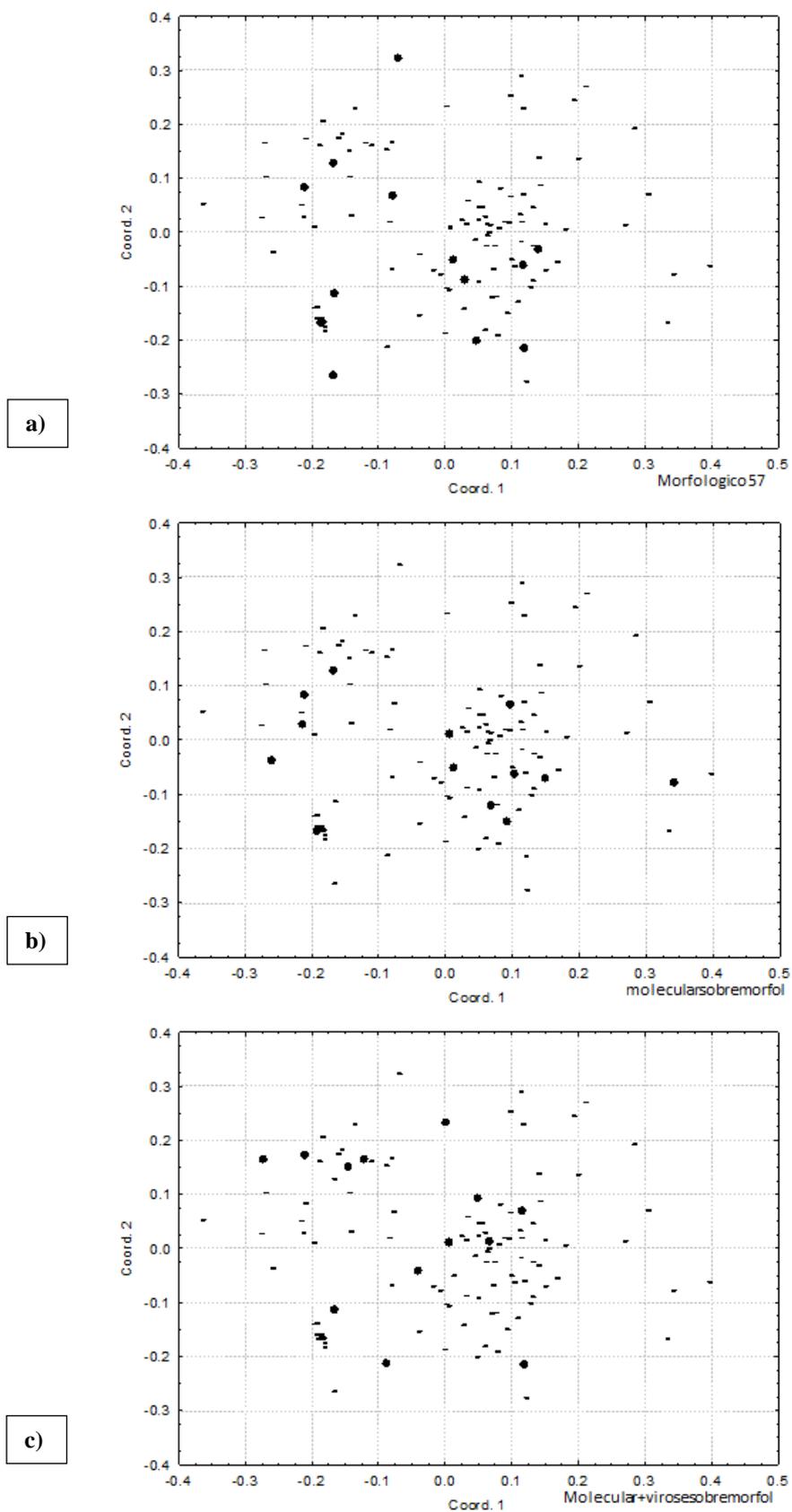


Figura 4. Dispersão gráfica de 97 acessos de *Capsicum frutescens* com base na matriz de distâncias genéticas estimadas utilizando 57 descritores morfológicos. Os 13 acessos em destaque foram selecionados com base na representatividade dos grupos de similaridade definidos: a) pelos descritores morfológicos; b) pelos marcadores SSR e c) pelos marcadores SSR e incidência de virose.

com maior frequência de incidência foram: PMMoV (39%) PepYMV (19,4%), TSWV (18,8%), GRSV (17%) e PVY (14,7%). TCSV e CMV não foram encontrados nas plantas desses acessos. Em telado, a presença de um ou mais dos vírus foi detectada em 159 de 202 amostras analisadas e os vírus detectados com maior frequência foram: TCSV (33,2%), PepYMV (32,7%), PMMoV (29,2%), seguido de TSWV (13,9%). CMV e PVY não foram detectados.

4 DISCUSSÃO

Os acessos de *C. frutescens* avaliados nesse estudo coletados na região Amazônica, provavelmente sofreram intenso processo de seleção/domesticação por parte dos indígenas amazônicos com o consequente desenvolvimento de inúmeras raças locais, plenamente adaptadas às condições ecológicas da região.

A análise de divergência genética entre acessos de *C. frutescens* foi realizada com a maior amostragem possível, obtida por meio de coletas em uma ampla área geográfica de diferentes condições ecológicas nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste brasileiras, relevantes para os programas de melhoramento dessa espécie. Esta coleta em diferentes regiões ofereceu subsídios para conduzir a seleção de acessos para a composição da coleção nuclear levando em conta também à diversidade geográfica. Assim, procurou-se assegurar uma distribuição geográfica proporcional ao número de coletas em cada uma das unidades da Federação, que ocorreu em maior proporção na região Norte, ou seja, área territorial localizada na Bacia Amazônica onde essa espécie apresenta maior diversidade e há ocorrência de populações selvagens.

Os acessos selecionados na coleção nuclear apresentaram uma distribuição espacial semelhante àquela da coleção ativa, além de uma elevada representatividade em relação a espécie, principalmente para os tipos mais populares de *C. frutescens* encontrados no Brasil, pimenta malagueta, malaguetinha e tabasco.

A coleção nuclear proposta no presente estudo mais promissora para o programa de melhoramento genético é a com base nos marcadores moleculares e incidência de virose, por apresentar a maior representatividade da variabilidade genética, o que permite maximizar as possibilidades gênicas, aumentando as probabilidades de sucesso no desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes regiões e ecossistemas, bem como de baixa incidência de viroses.

Os 13 acessos da coleção nuclear selecionados de acordo com marcadores moleculares e incidência de viroses (Figura 4A) apresentaram alta representatividade

alélica (77%) e ocuparam praticamente toda a dispersão gráfica, representando boa parte da variabilidade genética da coleção ativa. Dentre os acessos selecionados, quatro (CNPH 597, CNPH 3470, CNPH 3484 e CNPH 3698) não apresentaram incidência de vírus. Para os demais acessos selecionados foi detectada a incidência de um (TCSV: CNPH 3885, CNPH 3891, CNPH 3894 ou TSWV: CNPH 3944) ou mais de um vírus avaliado. A ocorrência natural do vírus PMMoV foi verificada em 68% das 543 amostras coletas em campo ou telado, provavelmente, veiculado pela semente e/ou disseminado entre plantas no campo devido aos tratos culturais, sugerindo que a dispersão desse vírus é muito expressiva em *C. frutescens*.

A inclusão de oito acessos a essa coleção nuclear mais promissora (constituída por 13 acessos) permitiu a obtenção de 100% da representatividade alélica (Tabela 2). Entretanto, essa máxima variabilidade alélica somente foi possível com a adição de acessos segregantes, com mistura de espécies e identificados na caracterização morfológica como *C. chinense* e na molecular como *C. frutescens*.

No estudo da caracterização morfológica, os acessos CNPH 3716, CNPH 3804, CNPH 3805, CNPH 3806, CNPH 3813, CNPH 3815 e CNPH 3818 foram inicialmente classificados como *C. chinense*. No entanto, quando realizada a caracterização molecular, os referidos acessos foram classificados como *C. frutescens* e alocados na análise de agrupamento no grupo 2, apresentando-se como os mais divergentes dentro desse grupo. De fato, nos dados de passaportes desses acessos constavam que eram advindos de prováveis fecundações cruzadas, resultantes da proximidade de plantio entre as duas espécies. Os dados obtidos sugerem que esses acessos sejam resultados de hibridizações interespecífica e não da variação intraespecífica.

As pimentas produzem flores perfeitas (hermafroditas) e se reproduzem geralmente por autofecundação, devido a morfologia de suas flores. No entanto, a taxa de polinização cruzada natural pode variar de 2 a 90%, dependendo da cultivar, do local, da época, das condições climáticas, da população de insetos, etc (TANKSLEY, 1984). Segundo BARAL e BOSLAND (2004), acessos de *Capsicum* com fenótipos intermediários podem ser explicados devido a hibridação introgressiva, ou seja, genes de uma espécie movem para outra através do processo de hibridação interespecífica seguida de retrocruzamentos sucessivos a um dos pais.

O estabelecimento da coleção nuclear de *C. frutescens* realizada em nível de espécie foi uma estratégia adotada com vistas a facilitar a utilização desse germoplasma pelos melhoristas e preservar a diversidade genética intraespecífica. Coleções nucleares de espécies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum* e *C. chinense*) também foram

formadas para a coleção mantida pela Unidade de Conservação de Recursos Genéticos de Plantas do Sul, Griffin, GA, Estados Unidos (ZEWDie et al., 2004). Segundo os autores, a estratificação em espécie antes de implementar o processo de agrupamentos foi estrategicamente importante, porque os genes ou alelos encontrados em diferentes espécies de *Capsicum* podem diferir. Além disso, a hibridação interespecífica é difícil e laboriosa para transferir características entre as espécies de *Capsicum*.

Existe muita discussão sobre quais são os descritores adequados para serem usados no desenvolvimento de uma coleção nuclear – morfológicos, genéticos, moleculares, ecogeográficos. Os 97 acessos de *C. frutescens* avaliados nesse trabalho apresentaram alta variabilidade para várias características morfológicas como tamanho, peso, persistência, incidência de virose. Presumivelmente, muita desta diversidade foi capturada pelos acessos selecionados para a coleção nuclear com base nos descritores morfológicos e que podem ser utilizados eficazmente pelo programa de melhoramento. É importante ressaltar que os caracteres morfológicos usados foram relevantes na composição de coleção nuclear de *C. frutescens*, pois apresentaram uma representatividade da variabilidade genética de 73%. Além disso, a correlação entre a análise molecular e a morfológica, realizadas neste estudo, foi relativamente elevada e altamente significativa.

Os marcadores moleculares SSR detectaram altos níveis de variabilidade entre os acessos e foram úteis na seleção de acessos para a coleção nuclear e para o esclarecimento das relações genéticas entre eles. O número de agrupamentos utilizando descritores morfológicos e marcadores moleculares foram semelhantes, mas apresentaram certas diferenças nas subdivisões dos acessos demonstrando a importância e complementaridade de diferentes análises para estimativas da diversidade genética e composição de coleções nucleares.

Os dados do presente estudo confirmam a confiabilidade das informações obtidas em ambos os métodos independentemente, e demonstram também, a importância de se relacionar as variantes alélicas associadas às variações fenotípicas.

A constituição da coleção nuclear não deve ser considerada como permanente, em vez disso, deve ser dinâmica como a avaliação de novos acessos e informações adicionais quando disponíveis. Espera-se que a coleção nuclear proposta para *C. frutescens* incremente o uso dos recursos genéticos e a eficiência do programa de melhoramento de *C. frutescens* realizado na Embrapa e assim contribua para o desenvolvimento de novas cultivares de *C. frutescens* para atender a demanda da sociedade.

5.5 CONCLUSÃO

Foi possível o estabelecimento de coleções nucleares com base no conjunto de caracteres utilizando-se marcadores moleculares SSR e caracterização morfológica, além da incidência a virose. Com 12% dos acessos da coleção ativa foi obtida a representatividade da variabilidade genética de 77% em *C. frutescens*, favorecendo o estabelecimento daquela que deverá ser a primeira coleção nuclear de *Capsicum* para o programa de melhoramento realizado na Embrapa.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALFOURIER, F.; ROUSSEL, V.; STRELCHENKO, P.; EXBRAYAT-VINSON, F.; SOURDILLE, P.; BOUTET, G.; KOENIG, J.; RAVEL, C.; MITROFANOVA, O.; BECKERT, M.; CHARME, G. A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p.1265-1275, 2007.

BARAL, J. B.; BOSLAND, P. W. Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, p. 826-832, 2004.

BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F.; NASCIMENTO FILHO, H, R.; MADURO, C. B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia Brasileira. I. Espécies domesticadas. **Acta Amazon**, v. 32, p. 177-192, 2002.

BIANCHETTI, L. B.; CARVALHO, S. I. C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões de gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. (Ed.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. 2005. p. 355-385.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. Botânica e recursos genéticos. In: RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 39-54.

CORDEIRO, C. M. T.; ABADIE, T. Coleções Nucleares. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 575-604.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG, 2006. 382p.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FERREIRA, M. E.; MORETZSOHN, M. C.; BUSO, G. S. C. Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 377-420.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D. Plant genetic resources today: a critical reappraisal. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J. T. (Ed.) **Crop genetic resources: conservation and evolution**. London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 249-257.

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

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for Capsicum (Capsicum spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

INOUE-NAGATA, AK, FONSECA, MEN; RESENDE, RO; BOITEUX, LS; MONTE, DC; DUSI, AN; ÁVILA, AC; VAN DER VLUGT, RAA. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper *Capsicum annuum*. **Archives of Virology**, v.147, p.849-85, 2002.

JARRET, R. L.; BALDWIN, E.; PERKINS, B.; BUSHWAY, R. GUTHRIE, K. Diversity of fruit quality characteristics in *Capsicum frutescens*. **HortScience**, v. 42, n. 1, p. 16-19, 2007.

LIMA, M. F.; ULHOA, A. B ; INOUE-NAGATA, A. K. ; SOUZA, K. R. R. ; F. J. B. REIFSCHNEIDER, F. J. B. Virus Incidence in Domesticated and Semi-Domesticated Field-Grown Hot Peppers (*Capsicum*). In: 28th International Horticultural Congress, 2010, Lisboa. **Science and Horticulture for People**. Lisboa : ISHS, 2010. v. I. p. 273.

LIMA, M. F.; ULHO, A. A. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa: Avaliação de híbridos e linhagens avançadas de pimenta malagueta a viroses em campo. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 44. **Anais....** Bento Gonçalves: SBF, 2011. CD-Rom

NASCIMENTO FILHO, H. R.; BARBOSA, R. I.; LUZ, F. J. F. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. II. Hábitos e formas de uso. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 561-568, 2007.

NICOLAI, M.; CANTET, M.; LEFEBVRE, V. ; SAGE-PALLOIX, A. M.; PALLOIX, M. Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, p. 2375-2390, 2013.

PERNEZNY, K; ROBERTS, PD; MURPHY, JF; Goldberg, NP. (Ed.) **Compendium of pepper diseases**. APS Press. St. Paul. 63p, 2003.

RAAMSDONK , L. W. D.; WIJNKER, J. The development of a new approach for establishing a core collection using multivariate analyses with tulip as case. **Genetic Resources and crop Evolution** , v. 47, p. 403-416, 2000.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENZ, G. P.; RIBEIRO, C. S. C. Brazilian *Capsicums*: Early History and Future Prospects. **Chronica Horticulturae**, v. 49, n. 3, p. 20-21, 2009.

SAS INSTITUTE INC.. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Carolina, Cary. 1989.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

SMITH, P. G.; HEISER JUNIOR, C.B. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 84, n. 6, p. 413-420, 1957.

TANKSLEY, S. D. High rates of cross-pollination in chile pepper. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 580-582, 1984.

ZEWDIE, Y.; TONG, N.; BOSLAND, P. Establishing a core collection of *Capsicum* using a cluster analysis with enlightened selection of accessions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 51, p. 147-151, 2004.

**CAPÍTULO 6. VARIABILIDADE GENÉTICA DA COLEÇÃO NUCLEAR E DA
POPULAÇÃO BASE DO MELHORAMENTO GENÉTICO DE *Capsicum*
frutescens, UTILIZANDO DESCRITORES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES**

**CHAPTER 6. GENETIC VARIABILITY OF A CORE COLLECTION AND A
BASE BREEDING POPULATION OF *Capsicum frutescens* USING
MORPHOLOGIC AND MOLECULAR DESCRIPTORS**

RESUMO

Características morfológicas e moleculares foram utilizadas para avaliar e comparar a variabilidade genética de uma coleção ativa (104 acessos), de uma coleção nuclear (13 acessos) e de uma população base de melhoramento genético (6 acessos) de *Capsicum frutescens*. Os acessos foram caracterizados por meio de 57 descritores internacionais recomendados para *Capsicum* e 239 alelos de 24 *loci* de microssatélites. Distâncias genéticas entre os acessos foram obtidas com base nos descritores e nos marcadores moleculares. As matrizes de distâncias genéticas entre os acessos foram utilizadas para realizar a dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais. A representatividade da variabilidade genética foi analisada calculando-se a porcentagem de classes e de alelos da coleção ativa presentes na coleção nuclear e na população base de melhoramento. Verificou-se maior variabilidade genética entre os acessos da coleção nuclear em relação à população base, tanto na caracterização morfológica quanto na molecular. Os descritores polimórficos que evidenciaram maior variabilidade foram os que apresentaram mais de quatro classes distintas: comprimento da planta, comprimento da haste, dias até o início do florescimento, dias até o início da frutificação, cor do fruto maduro e peso do fruto. A representatividade da variabilidade genética da coleção ativa com base na análise molecular (% de alelos) foi de 35% e 77% na população base e na coleção nuclear, respectivamente. Com base na caracterização morfológica por meio dos descritores categóricos (% de classes fenotípicas), a representatividade foi de 63% e 81% na população base e na coleção nuclear, respectivamente. Os acessos da coleção nuclear ficaram consideravelmente dispersos, ocupando praticamente toda a dispersão gráfica. Os resultados demonstram, dessa forma, que os acessos da coleção nuclear podem aumentar a base genética dos programas de melhoramento genético de *C. frutescens*, maximizando as possibilidades de combinações gênicas desejáveis.

Palavras-chaves: melhoramento genético, coleção de germoplasma, polimorfismo, microssatélites, caracterização.

ABSTRACT

Morphological and molecular characteristics were used to evaluate and to compare the genetic variability in a full collection (104 accessions), core collection (13 accessions) and a base breeding population (6 accessions) of *Capsicum frutescens*. The accessions were characterized using 57 international descriptors recommended for *Capsicum* and 239 alleles from 24 microsatellite *loci*. Genetic distances among accessions were obtained based on descriptors and molecular markers characterization. The genetic distances among accessions were used to perform graphic dispersion based on multidimensional scaling using main coordinates. The representativeness of the genetic variability was analyzed by calculating the percentage of phenotypic classes and alleles of the active collection present in the core collection and base breeding population. A higher genetic variability among accessions was found in the core collection, both in the morphological and molecular characterization. The polymorphic descriptors that showed greater variability were those with more than four distinct classes: plant length, stem length, days until the beginning of flowering, days to onset of fruiting, mature fruit color and fruit weight. The representativeness of genetic variability in the molecular analysis (% of alleles) was 35 % and 77 % in the base breeding population and in the core collection, respectively and in the morphological analysis (% of phenotypic classes) was 63 % and 81% in the base breeding population and in the core collection, respectively. The core collection accessions were considerably dispersed, occupying almost the entire graphic dispersion. The results show that core collection accessions can increase the genetic base of *C. frutescens* breeding programs, maximizing the chances of desirable gene combinations.

Key words: breeding, germplasm collection, polymorphism, SSR markers, characterization.

6.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos agricultores brasileiros que cultiva a pimenta malagueta realiza a própria seleção de frutos, utilizando as sementes para os próximos cultivos. Geralmente, são sementes de qualidade inferior, apresentam baixa germinação, podem carrear patógenos e resultar em menor uniformidade de emergência das plântulas e produtividade. Além disso, as cultivares de pimenta malagueta encontradas no mercado brasileiro não são homogêneas e apresentam grandes variações na morfologia e na produtividade e, em muitos casos, não são identificadas corretamente, ou seja, não pertencem a *C. frutescens*. Existe uma demanda crescente por parte de produtores brasileiros por novas cultivares, principalmente por pimentas do tipo malagueta (RIBEIRO et al., 2008).

O desenvolvimento de novas cultivares de pimenta malagueta e híbridos com características agrônômicas e industriais de interesse, com vistas a aumentar a produtividade, qualidade e conseqüentemente a competitividade do agronegócio de *Capsicum* no Brasil, depende da variabilidade genética disponível na espécie de *C. frutescens*.

A conservação e a caracterização do BAG de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças têm sido estratégias importantes para o programa de melhoramento genético para a disponibilização de germoplasma com variabilidade, adaptabilidade, produtividade e características exigidas pelo mercado, visando a obtenção de indivíduos superiores que combinam características desejáveis para os diferentes segmentos da cadeia produtiva (RIBEIRO et al., 2008; REIFSCHNEIDER et al., 2013).

A caracterização e a avaliação dos acessos conservados em um BAG é a etapa básica e fundamental para o programa de melhoramento genético que possibilita o uso e o conhecimento do germoplasma disponível, permitindo a identificação dos acessos redundantes e o estabelecimento de coleções nucleares (VALLS, 2007). Os resultados desses estudos podem ser utilizados para verificar a necessidade ou não de introduzir novos materiais na coleção e selecionar os de interesse para o melhoramento genético (ENGLES e VISSER, 2003).

O programa de melhoramento de *Capsicum* realizado na Embrapa é direcionado para o desenvolvimento de linhagens, cultivares e híbridos com resistência múltipla a doenças e melhor qualidade de fruto. Recentemente, esforços estão sendo concentrados para o desenvolvimento de cultivares de pimentas tipo malagueta (ULHOA, 2009),

habanero (SOUZA et al., 2010), jalapeño amarelo (ULHOA, 2013) e biquinho laranja (HEINRICH, 2013).

Nesse sentido, foi estabelecida uma população base de *C. frutescens* visando sua conservação e garantia da disponibilidade de suficiente variabilidade genética, para posterior utilização no desenvolvimento de novas cultivares de pimenta malagueta. Com o intuito de selecionar materiais promissores de pimenta malagueta para a formação da população base, 32 acessos de *C. frutescens* provenientes do BAG foram caracterizados morfológicamente e avaliados quanto a características fabris em condições de campo e em casa de vegetação da Embrapa Hortaliças. Os critérios para seleção de genótipos com potencial agrônômico foram: precocidade (≤ 80 dias), coloração dos frutos (vermelho/vermelho-escuro), peso do fruto ($\geq 0,8$ g) e menor incidência de viroses. Com base nos resultados obtidos, seis acessos foram pré-selecionados (CNPH 2744, CNPH 3257, CNPH 3448, CNPH 3462, CNPH 3746 e CNPH 3835) (ULHOA et al., 2009).

Os acessos considerados superiores foram utilizados em cruzamentos dialélicos. As sementes F1 e F2 obtidas foram utilizadas para compor a população base, que vem sendo utilizada nos programas de melhoramento nos últimos anos, a qual foi registrada como CNPH 20470 (ULHOA et al., 2011).

Neste trabalho, objetivou-se comparar a variabilidade genética de uma coleção nuclear com a da população base de pimenta malagueta do programa de melhoramento, utilizando marcadores microsatélites e características morfológicas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Dezenove acessos de *C. frutescens* foram utilizados nesse estudo (Tabela 2), dos quais 6 participaram da síntese da população base e 13 do estabelecimento da coleção nuclear. A coleção ativa de 104 acessos também foi analisada para os cálculos de representatividade alélica e de classes fenotípicas.

A caracterização morfológica dos 19 acessos de *C. frutescens* foi feita utilizando-se 57 descritores internacionais recomendados para *Capsicum* (IPGRI, 1995) (Tabela 1).

A caracterização molecular foi realizada utilizando 24 pares de *primers* de microsatélites: CA 19, CA 20, CA 26, CA 27, CA 29, CA 41, CA 49, CA 52, CA 56, CA 62, CA 79, CA 88, CA 96, CA 131, CA 159, CA 167, CA 172, CA 174, CA 178, EPMS 331, EPMS 376, EPMS 386, EPMS 417.

Tabela 1. Descritores morfológicos e agronômicos aplicados na caracterização da coleção de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa

Descritor	valor	Descritor	valor	Descritor	valor	Descritor	valor	Descritor	valor	Descritor	valor		
1.Procedência		>125 -150	4	19.Nº de flores/axila		claro	6	pendente e intermediária	11	>2 a 3	3	intermediário	5
Ásia	1	acima de 150	5	uma	1	25.Cor do filamento		pendente e ereto	13	acima de 3	4	persistente	7
África	2	10.Comp. haste (cm)		duas	2	branco	1	intermediário e ereto	15	39.Espessura da parede		48.Comp. da placenta	
Europa	3	até 15	1	três ou mais	3	amarelo	2	33.Cor fruto maduro		Do fruto (mm)		até ¼	1
EUA e Canadá	4	>15 a 30	2	muitas c/ entre-nó curto	4	verde	3	branco	1	até 0,3.....	1	de ¼ a ½	2
México	5	>30 a 50	3	uma e duas	5	azul	4	amarelo limão	2	>0,3 a 0,5	2	acima de ½	3
América Central	6	acima de 50	4	uma, duas e três	6	violeta claro	5	amarelo laranja pálido	3	>0,5 a 0,8	3	49.Pungência	
Am. do Sul (exc. Brasil)	7	11.Diâm. haste (cm)		duas e três	7	violeta	6	amarelo laranja	4	>0,8 a 1	4	doce	1
Brasil (Norte)	8	até 1	1	duas, três e quatro	8	azul violeta	7	laranja pálido	5	>1 a 1,3	5	picante baixo	2
Brasil (Nordeste)	9	>1 a 2	2	20.Pose da flor		26.Posição do estigma		laranja	6	acima de 1,3	6	picante médio	3
Brasil (Centro-Oeste)	10	>2 a 3	3	pendente	3	inserto	3	vermelho claro	7	40.Ombro do fruto		picante alto	4
Brasil (Sudeste)	11	acima de 3	4	intermediária	5	mesmo nível	5	vermelho	8	agudo	1	50.Aroma	
Brasil (Sul)	12	acima de 3	4	ereta	7	exercerto	7	vermelho escuro	9	obtusos	2	baixo	1
2.Espécie		12.Densid. ramificação		todas	9	mesmo nível e exercerto	9	violeta	10	truncado	3	médio	2
<i>C. annuum</i>	1	esparsa	3	intermediária e ereta	11	inserto e mesmo nível	11	marrom	11	cordato	4	alto	3
<i>C. baccatum</i>	2	densa	7	pendente e intermediária	13	inserto e exercerto	13	preto	12	lobato	5	51.Cor da semente	
<i>C. chinense</i>	3	13.Brotação abaixo da primeira bifurcação		21.Cor da corola		27.Pigmento do cálice		amarelo	13	41.Pescoço na base do fruto		amarelo	1
<i>C. frutescens</i>	4	ausente	1	branco	1	ausente	0	amarelo pálido	14	ausente	0	marrom	2
3.Cor da haste		esparsa	3	amarelo claro	2	presente	1	34.Formato do fruto		presente	1	preto	3
verde	1	intermediária	5	amarelo	3	28.Margem do cálice		alongado	1	42.Formato da ponta do fruto		outros	4
verde c/ estrias violetas	2	densa	7	amarelo esverdeado	4	inteiro	1	arredondado	2	pontigado	1	52.Superfície da semente	
violeta	3	4.Antocianina nodal		violeta c/ base branca	5	intermediário	2	triangular	3	truncado (“blunt”)	2	lisa	1
4.Antocianina nodal		verde	1	branco c/ base violeta	6	dentado	3	campanulada	4	afundado	3	rugosa	2
verde	1	14.Densidade de folha		branco c/ margem violeta.....	7	29.Constrição anelar no cálice		retangular	5	afundado c/ ponta	4	corrugada	3
violeta claro	3	esparsa	3	violeta	8	ausente	0	35.Comprimento do fruto (cm)		43.Apêndice na ponta do fruto		53.Número sementes por fruto	
violeta	5	intermediária	5	branco esverdeado	9	presente	1	até 1	1	ausente	0	menor de 20	1
violeta escuro	7	densa	7	branco c/ mancha	10	30.Dias até início da frutificação		>1 a 2	2	presente	1	20 a 50	2
5.Formato da haste		15.Cor da folha		purpura	11	até 107	1	>2 a 3	3	44.Secção transversal		acima de 50	3
cilíndrica	1	amarelo	1	branco esverdeado c/ mancha purpura	11	107 a 115	2	>3 a 4	4	levemente corrugado	3	54.Segregação	
angulada	2	vede claro	2	22.Cor mancha da corola		115 a 122	3	>5 a 6	5	intermediário	5	ausência de segregação	0
alado	3	verde	3	branco	1	acima de 122	4	acima de 6	6	corrugado	7	frutos c/ formatos diferentes	1
6.Pubescência da haste		verde escuro	4	amarelo	2	31.Cor fruto imaturo		36.Largura do fruto (cm)		45.Número de lóculos		plantas c/ e sem entre-nós	2
esparsa	3	violeta-claro	5	verde amarelado	3	branco	1	até 0,5	1	um	1	curtos	2
intermediária	5	violeta	6	verde	4	amarelo.....	2	>0,5 a 0,7	2	dois	2	frutos c/ cor es diferentes	3
densa	7	mesclado	7	violeta	5	verde	3	>0,7 a 0,9	3	três	3	fruto e planta c/ e sem	4
7.Altura da planta (cm)		verde c/ antocianina	8	23.Forma da corola		laranja	4	>0,9 a 1,5	4	quatro	4	flores c/ cores diferentes	5
Até 50	1	16.Forma da folha		rotada	1	violeta	5	acima de 1,5	5	cinco	5	frutos c/ posições diferentes	6
> 50 - 100	2	deltóide	1	campanulada	2	violeta escuro	6	37.Peso do fruto (g)		46.Superfície do fruto		55.Mistura varietal	
> 100 - 125.....	3	ovalada	2	intermediária	3	amarelo esverdeado	7	até 0,3.....	1	liso	1	ausente	0
> 125 - 150	4	lanceolada	3	intermediária	3	verde amarelado	8	>0,3 a 0,5	2	semi-rugoso	2	presente	1
acima de 150	5	17.Pubescência folha		24.Cor da antera		branco amarelado	9	>0,7 a 0,9	3	rugoso	3	56.Macho esterilidade	
8.Hábito crescimento		esparsa	3	branco	1	marrom	10	>0,9 a 1,2	5	liso c/ estrias	4	ausente	0
prostrado	3	intermediária	5	amarelo	2	32.Posição do fruto		acima de 1,5	6	47.Persistência entre fruto/ pedicelo		presente	1
intermediário	5	densa	7	azul pálido	3	pendente	3	até 1,5	1	pouco persistente	3	57.Mancha antocianina no fruto	
ereto	7	18.Dias até início do florescimento		azul	4	intermediário	5	>1,5 a 2	2	57.Mancha antocianina no fruto		ausente	0
9.Largura planta (cm)		Até 100.....	1	violeta	5	ereta	7			presente	1	presente	1
até 50	1	100 a 107.....	2	amarelo c/ mancha azul	9	todas	9						
>50 - 100	2	107 a 115.....	3										
>100 - 125.....	3	acima de 115.....	4										

Amostras de folíolos de duas plantas de cada um dos acessos estudados foram coletadas individualmente e utilizadas para a extração do DNA, realizada pelo método CTAB 2%, com modificações (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998). A concentração de DNA de cada tubo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1% comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra corada com brometo de etídio com padrões de DNA Lambda de diferentes concentrações. Cada amostra foi diluída para a concentração de 3,0 ng/μl.

As reações de amplificação de DNA utilizando-se os 24 pares de *primers* SSR foram realizadas conforme descritas no capítulo 4, bem como o preparo das amostras para genotipagem no sequenciador modelo ABI 3730.

As distâncias genéticas obtidas a partir dos marcadores microssatélites foram calculadas com auxílio do Programa Genes (CRUZ, 2006), baseando-se na seguinte fórmula:

$DG_{ij} = 1 - (NLC/NTL)$ sendo: DG_{ij} = Distância genética entre os acessos i e j ; NLC = Número de Locos Coincidentes; NTL = Número Total de locos.

O NLC é o somatório das coincidências alélicas de cada loco analisado, sendo que cada coincidência pode assumir o valor 1 (dois alelos coincidentes); 0,5 (um alelo coincidente) e 0 (nenhum alelo coincidente) para encontros (0 1) e (1 0).

As distâncias genéticas entre os acessos da coleção ativa, coleção nuclear e população base do melhoramento foram utilizadas para as análises de dispersão gráfica baseada em escalas multidimensionais por meio das coordenadas principais, com auxílio dos Programas SAS (SAS INSTITUTE INC., 1989) e Statistica (STATSOFT INC., 1999).

A representatividade da variabilidade genética da coleção ativa na coleção nuclear e na população base do melhoramento foi calculada com base na análise dos descritores morfológicos categóricos e com base na análise molecular. O cálculo foi baseado na porcentagem de classes fenotípicas e de alelos da coleção ativa presente nos acessos da coleção nuclear e da população base do melhoramento.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação dos descritores morfológicos aplicados aos acessos da coleção nuclear e da população base são apresentados na Tabela 2.

Os descritores da haste (cor e pubescência), da folha (forma e pubescência), da flor (posição, cor da corola, cor mancha da corola, pigmentação do cálice, macho

Tabela 2. Valores dos descritores morfológicos aplicados na caracterização da coleção de germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças.

Registro (CNPH)	Coleção Nuclear													População Base					
	597	3470	3484	3698	3715	3820	3821	3861	3885	3891	3894	3944	4304	2744	3257	3448	3462	3746	3835
1.Procedência	10	8	8	10	8	9	9	9	8	8	8	9	8	8	9	8	8	12	13
2.Espécie	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3.Cor da haste	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4.Antocianina nodal	3	1	1	3	1	1	1	1	3	1	1	1	7	1	1	1	1	1	3
5.Forma da haste	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1
6.Pubescência da haste	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
7.Altura da planta	3	3	5	3	3	3	4	4	2	2	4	3	4	3	5	5	3	5	3
8.Habito de crescimento	5	5	7	5	7	7	7	5	5	5	5	5	7	5	7	5	5	5	5
9.Largura da planta	3	4	5	3	4	4	3	3	4	3	3	4	4	3	5	5	4	5	4
10.Comprimento da haste	3	2	5	2	3	4	3	3	3	4	4	2	1	2	3	5	2	3	2
11.Diâmetro da haste	2	3	2	2	3	2	3	3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	3
12.Densidade de ramificação	7	5	5	7	5	5	5	7	7	7	7	7	5	7	5	5	7	5	7
13.Brotação	7	5	7	7	5	7	7	5	7	7	7	7	7	5	5	7	7	7	7
14.Densidade de Folha	5	5	5	7	5	5	5	7	7	7	7	7	5	7	5	5	7	5	7
15.Cor da Folha	3	4	3	4	3	3	4	4	4	4	3	4	4	4	3	4	4	3	4
16.Forma da Folha	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
17.Pubescência da Folha	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
18.Dias até início florescimento	3	4	1	1	1	1	4	5	2	4	5	2	2	2	1	1	1	1	1
19.N° de flores/axila	5	2	6	2	6	6	6	2	2	2	2	2	6	6	2	6	2	6	6
20.Posição da flor	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
21.Cor da corola	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
22.Cor mancha da corola	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
23.Forma da corola	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2
24.Cor da antera	4	3	3	3	5	3	3	3	3	3	3	3	5	3	5	3	3	3	3
25.Cor do filamento	5	5	1	5	6	1	6	6	5	5	5	5	5	5	6	1	5	1	5
26.Posição do estigma	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	5	7	7	7	7
27.Pigmentação do cálice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28.Margem do cálice	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1

Tabela 2. Continuação ...

29.Constrição anelar do cálice	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.Dias até início da frutificação	4	4	5	1	5	4	4	5	2	4	5	2	2	2	1	1	1	1	1
31.Cor fruto imaturo	3	3	3	3	3	3	3	8	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
32.Posição do fruto	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
33.Cor fruto maduro	7	9	8	9	7	7	9	8	9	6	9	9	9	8	9	9	9	9	8
34.Formato do fruto	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35.Comprimento do Fruto	3	3	2	2	2	3	3	3	2	3	2	4	3	3	4	3	3	3	3
36.Largura do fruto	2	3	1	2	1	3	4	2	2	2	1	4	2	2	2	2	3	2	2
37.Peso do fruto	3	3	1	2	1	3	4	4	2	3	1	5	2	3	2	5	2	3	2
38.Comprimento do pedúnculo	3	3	3	3	4	4	4	4	4	3	3	4	4	3	3	3	3	3	3
39.Espessura da parede do fruto	3	3	2	3	2	4	3	2	2	2	2	4	3	3	2	3	3	2	2
40. Ombro do fruto	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	1	2
41.Pescoço na base do fruto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42. Forma da ponta do fruto	2	1	1	2	1	2	3	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2
43.Apêndice na ponta do fruto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44.Secção transversal	5	3	3	3	3	3	5	3	3	3	3	5	3	3	3	3	3	3	3
45.Número de lóculos	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
46.Superfície do fruto	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	2
47.Persistência entre fruto/pedicelo	5	7	3	7	3	7	7	5	7	7	3	7	5	7	7	7	7	5	7
48.Comprimento da placenta	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
49.Pungência	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4
50.Aroma	3	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1
51.Cor da semente	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52.Superfície da semente	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53.Nº sementes por fruto	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
54.Segregação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55.Mistura varietal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56.Macho esterilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57.Mancha antocianina no fruto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

esterilidade e constrição anelar do cálice), do fruto (posição, forma, pescoço, apêndice da ponta, número de lóculos e mancha da antocianina), da semente (cor e superfície), da segregação e da mistura varietal foram monomórficos, tanto para os acessos da coleção nuclear, quanto para a população base. Assim, dos 57 descritores aplicados, 37 evidenciaram polimorfismo.

A maior variabilidade foi observada nos acessos da coleção nuclear verificada por meio dos seguintes descritores: comprimento da planta, comprimento da haste, dias até o início do florescimento, dias até o início da frutificação, cor do fruto maduro e peso do fruto. Cada um desses descritores evidenciou mais de quatro classes fenotípicas distintas.

O grande número de classes verificado para os seis descritores na avaliação dos 13 acessos da coleção nuclear é um indicativo da condição favorável à realização de melhoramento para os caracteres avaliados. Quanto mais divergentes forem os genitores, maior a possibilidade de recombinação de alelos distintos, acarretando em maior amplitude de classes e combinações gênicas.

No estudo da caracterização de 56 acessos da coleção de *Capsicum* spp. da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), com base em 11 descritores foram identificados acessos com potencial de utilização como genitores em cruzamentos para obtenção de progênes com alta heterose (SUDRÉ et al., 2005) Além da distância, os referidos autores enfatizam que é necessário saber se o acesso escolhido possui características desejadas. Desta maneira, destacam a importância de se fazer a caracterização morfoagronômica, com dados qualitativos e quantitativos.

A coleção nuclear de *C. frutescens* constituída por 13 acessos e a população base, formada por 6 acessos, bem como a representatividade das classes fenotípicas categóricas e de alelos em relação à coleção ativa são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Representatividade alélica e fenotípica da coleção nuclear (molecular + vírus) e da população base de melhoria de *C. frutescens*.

	Coleção Nuclear	População Base
	CNPH 597	CNPH 2744
	CNPH 3470	CNPH 3257
	CNPH 3484	CNPH 3448
	CNPH 3698	CNPH 3462
	CNPH 3715	CNPH 3746
	CNPH 3820	CNPH 3835
	CNPH 3821	-
	CNPH 3861	-
	CNPH 3885	-
	CNPH 3891	-
	CNPH 3894	-
	CNPH 3944	-
	CNPH 4304	-
Repres. Alélica (%)	77	35
Repres. Classes Fenotípicas (%)	81	63

A representatividade alélica na população base foi de 35% e na coleção nuclear de 77%. Essa diferença de representatividade da variabilidade também pode ser verificada nos gráficos de dispersão (Figura 1). Os acessos selecionados para composição da coleção nuclear apresentaram-se bem distribuídos no gráfico de dispersão, ocupando praticamente toda a dispersão gráfica e dessa forma representando boa parte da variabilidade genética da coleção ativa. Por outro lado, os seis acessos que constituíram a população base ficaram muito próximos entre si, demonstrando que são pouco representativos (35 %) em relação à variabilidade alélica disponível na coleção ativa. As distâncias genéticas entre os acessos da coleção nuclear estimadas com base nos marcadores moleculares variaram de 0,0217 a 0,9348 e entre os acessos da população base de 0,0417 a 0,6087

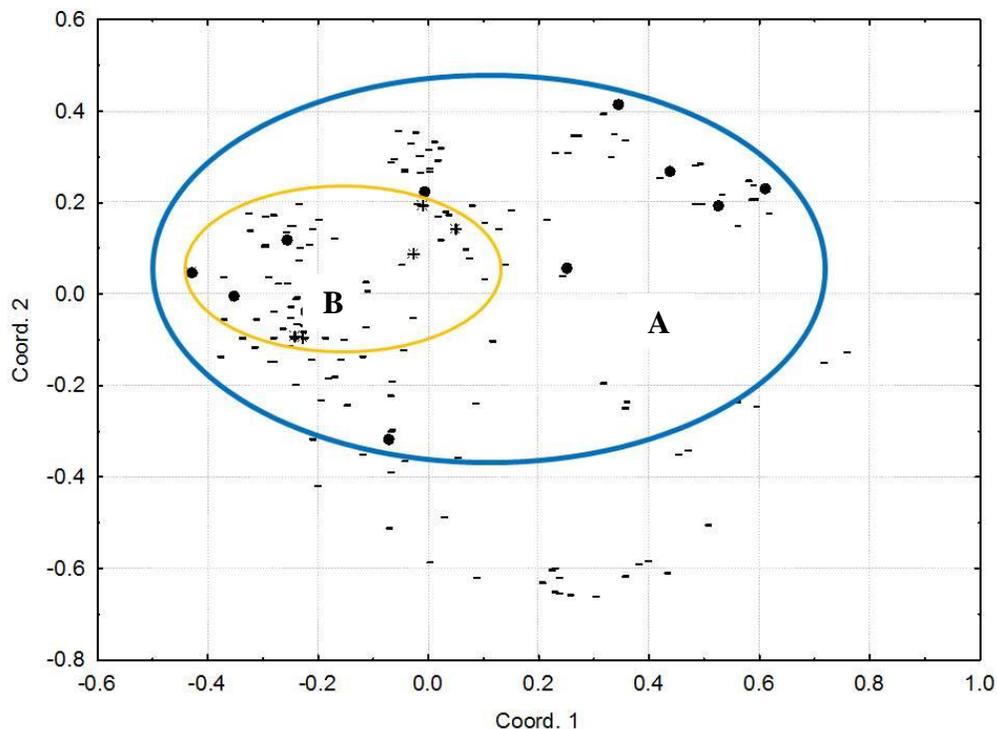


Figura 1. Dispersão gráfica de 104 acessos de *Capsicum frutescens* com base na matriz de distâncias genéticas estimadas utilizando 239 alelos de 24 *loci* microssatélites (SSR). (●) 13 acessos selecionados para composição da coleção nuclear (A) e (*) seis acessos que constituem a população base do programa de melhoramento (B).

A representatividade da variabilidade genética com base nos descritores morfológicos (% de classes fenotípicas) foi de 63% e 81% na população base do melhoramento e na coleção nuclear, respectivamente. Esta menor amplitude de representatividade se deve ao fato de acessos caracterizados pelos descritores morfológicos apresentarem menores distâncias genéticas entre si em relação às distâncias obtidas com os marcadores SSR. As distâncias genéticas entre os acessos da coleção nuclear estimadas com base nos descritores morfológicos variaram de 0,158 a 0,438 e entre os acessos da população base de 0,158 a 0,404.

A utilização de acessos próximos geneticamente não é recomendada para o planejamento de cruzamentos de um programa de melhoramento. Nesse sentido, com base nos resultados obtidos, verifica-se que os acessos da coleção nuclear apresentaram maiores distâncias genéticas entre si, o que possibilitaria uma ampliação da base genética do programa de melhoramento. Esta ampliação da base genética poderia também ser obtida utilizando os acessos da coleção ativa, entretanto, a utilização de um menor número de

acessos da coleção nuclear permite a redução do número de potenciais genitores e de cruzamentos, bem como dos custos de mão de obra necessária para a realização de cruzamentos e demais etapas.

A identificação de combinações parentais que produzem híbridos de rendimento superior é uma etapa importante para o sucesso do programa de melhoramento. Genitores com capacidade de combinação alta e distâncias genéticas altas entre si apresentam maior probabilidade de produção de híbridos com melhor desempenho agrônômico (COX e MURPHY, 1990; DIERS et al., 1996).

Em estudo realizado para quantificar a diversidade genética baseada em características morfológicas e marcadores AFLP entre sete linhagens parentais de *Capsicum annuum* e avaliar a relação entre a distância genética e o desempenho de híbridos derivados mostrou que a maioria dos híbridos superaram os genitores para a produção de frutos, precocidade e altura da planta. Medidas de distância baseadas em características morfológica e em AFLP foram eficientes para alocar genótipos de pimenta em grupos heteróticos (GELETA et al., 2004).

Marcadores moleculares RAPD mostraram-se de grande utilidade para a composição de amostras nucleares de *Stylosanthes guianensis* com a obtenção de altas taxas de representatividade da variabilidade genética da coleção original, o que é de extrema importância para a seleção de genitores para estabelecimento de um programa de melhoramento genético, assim como para seleção de acessos para programas de conservação e caracterização de recursos genéticos (FALEIRO et al., 2004).

No presente estudo, a maior representatividade da variabilidade genética da coleção ativa, assim como as maiores distâncias genéticas entre acessos da coleção nuclear de *C. frutescens*, permite maximizar as possibilidades de combinações gênicas, aumentando as chances de sucesso no desenvolvimento de novas cultivares adaptadas a diferentes regiões e ecossistemas. A utilização de apenas 13 acessos selecionados na coleção nuclear tem o potencial de reduzir o número de cruzamentos com aproveitamento otimizado da variabilidade genética disponível.

6.4 CONCLUSÃO

Verificou-se maior variabilidade genética entre os acessos da coleção nuclear em relação à população base do programa de melhoramento. A maior amplitude de classes dos descritores morfológicos e a maior representatividade da variabilidade alélica observada nos acessos da coleção nuclear acarretam na maior possibilidade de obtenção de combinações gênicas pelo melhoramento, assim como evidencia o potencial de utilização dos acessos como genitores em cruzamentos para obtenção de progênes com maior heterose e desempenho agrônomo.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COX T. S.; MURPHY, J. P. The effect of parental divergence on F2 heterosis in winter wheat crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, v.79, p. 169 -171, 1990.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa, MG, 2006. 382p.

DIERS, B. W., McVETTY, P. B. E.; OSBORN, T. C. Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Crop Science**, v. 36, p. 79-83, 1996.

ENGLES, J. M. M.; VISSER, B. Genebank management.procedures In: ENGLES, J. M. M; VISSER, B. (Ed.). **A guide to effective management of germoplasm collections**. Rome: IPGRI, 2003. p. 60-79. (IPGRI Handbooks for Genebanks , 6).

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; RAMOS, A. K. B. R. Seleção de Seleção de genitores de *Stylosanthes guianensis* utilizando a diversidade ganética analisada com base em características morfológicas, agrônômicas e moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA , 41. 2004. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, SBZ, 2004, 6 p. 1 CD-ROOM.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

GELETA, L. F.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. D. Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. **Plant Breeding**, v. 123, p. 467-473, 2004.

HEINRICH, A. G. **Melhoramento genético de pimenta biquinho salmão (*capsicum chinense jacq.*): avanço de gerações e caracterização química e morfológica**. 2013. 53 p. Monografia de Graduação em Agronomia - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

INTERNATIONAL PLANT GENETIC RESOURCES INSTITUTE. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Rome: IPGRI, 1995. 49p.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.). **Pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 200p.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. ; RIBEIRO, C. S. C. ; CARVALHO, S. I. C. Development of new *Capsicum* cultivars at Embrapa (Brazil). In: **XV Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, 2013**. Turim, Itália. Breakthroughs in the Genetics and Breeding of capsicum and Eggplant. Turim: Eucarpia, p. 71-77, 2013.

SAS INSTITUTE INC.. **SAS/STAT user's guide. Version 6, 4 ed.** SAS Institute, North Caroline, Cary. 1989.

SOUZA, K. R. R.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; AMARO, G. B.; ULHO, A. B. Programa de melhoramento de *Capsicum* na Embrapa: Caracterização morfológica e agrônômica de pimentas do grupo Habanero. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 2010., Salvador. **Resumos...** Brasília: Embrapa, 2010.

STATSOFT INC. **Statistica for Windows [Computer program manual]** Tulsa, OK. StatSoft Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999.

SUDRÉ, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; KARASAWA, M.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 22-27, 2005.

ULHOA, A. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. ; LIMA, M. F.; AMARO, G. B. ; SOUZA, K. R. R. . Programa de Melhoramento de *Capsicum* na Embrapa: caracterização preliminar morfológica e agrônômica de pimenta do grupo malagueta. In: Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 5. Guarapari, ES, 2009. **Anais...** Guarapari:CBMP, Documentos n.11, 2009.

ULHOA, A. B.; NASS, L. L.; SOUZA, K. R. R. ; FERREIRA, M. G.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Programa de melhoramento de *Capsicum* na Embrapa: obtenção de população base de malagueta (*Capsicum frutescens*). In: Reunião anual da SBPC, 63^a. Goiânia, 2011, **Anais...** Goiânia: Reunião Anual da SBPC, 2011.

ULHOA, A. B. **Caracterização morfoagronômica e molecular de linhagens de pimenta do tipo jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*)**. 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2013.

VALLS, J. F. M. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 281-305.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a existência de exemplares com características silvestres pertencentes às espécies *Capsicum frutescens* e *C. chinense* coletados na Bacia Amazônica brasileira e esses resultados poderão subsidiar estudos evolutivos do gênero, análises mais detalhadas de diversidade genética e esclarecimento das relações filogenéticas entre essas duas espécies de *Capsicum*.

Conjuntos de *primers* microssatélites desenvolvidos para *C. annuum* foram transferíveis e polimórficos para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense* e poderão ser de grande valia para estudos da variabilidade genética, identificação de duplicatas, estudo da filogenia e seleção assistida por marcadores, entre outras aplicações.

As espécies *C. chinense* e *C. frutescens* apresentam similaridades e características compartilhadas com sobreposição de caracteres morfológicos, bem como indicativos de hibridização natural de acessos coletados na região Amazônica, considerada área de maior diversidade da espécie *C. chinense* e de ocorrência de populações silvestres de *C. frutescens*. No entanto, os acessos dessas espécies foram distintos pela análise com base em marcadores microssatélites. Recomenda-se um estudo envolvendo uma amostragem maior de acessos coletados nessa região, para confirmação da classificação dessas duas espécies como entidades distintas.

Embora a variabilidade morfológica de formas, tamanhos e cores de frutos de *C. frutescens* seja inferior à verificada em outras espécies domesticadas do gênero, os acessos que compõem a coleção ativa de germoplasma de *C. frutescens* da Embrapa Hortaliças apresentam variabilidade genética para desenvolvimento de cultivares para diversos nichos como: comercialização *in natura* e produção de conservas e molhos. O estabelecimento da coleção nuclear com 13 acessos de *C. frutescens* representando 77% da variabilidade genética da coleção ativa possibilita uma ampliação da base genética do programa de melhoramento.

Os marcadores SSR demonstraram maior capacidade de discriminação em relação aos descritores morfológicos. A análise molecular permitiu um agrupamento claro dos tipos mais populares de *C. frutescens* encontrados no Brasil (pimenta malagueta, malagueta e tabasco). No entanto, foi observada a importância da realização da caracterização morfológica dos acessos para atender às exigências do mercado nos diferentes nichos.

Assim, a associação de análises morfológicas e moleculares, como realizada no presente trabalho, é sugerida para a caracterização completa e detalhada de bancos de germoplasma visando o melhoramento de plantas.