



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RAFAELLA CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR  
DE ACESSOS DE *CAPSICUM BACCATUM* L.**

---

Londrina  
2017



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná

**Embrapa** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

Rafaella Cardoso

**Caracterização morfológica e molecular de  
acessos de *Capsicum baccatum* L.**

---

Londrina

2017

RAFAELLA CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR  
DE ACESSOS DE *CAPSICUM BACCATUM* L.**

Defesa de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Co-Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C268 Cardoso, Rafaella.  
Caracterização morfológica e molecular de acessos de *Capsicum baccatum* L. / Rafaella Cardoso. - Londrina, 2017.  
69 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.  
Coorientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. *Capsicum baccatum* L - Tese. 2. Pimentas - Genética - Tese. 3. Descritores morfoagronômicos - Tese. 4. Agricultura - Genética molecular - Tese. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Gonçalves, Leandro Simões Azeredo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 574

RAFAELLA CARDOSO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE  
ACESSOS DE *CAPSICUM BACCATUM* L.**

Defesa de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Claudete de  
Fátima Ruas  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Maria Paula Barion Alves  
Nunes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas  
Faculdade de Apucarana - FAP

Londrina, março de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e serenidade para enfrentar os obstáculos a fim de concluir este desafio.

Aos professores, Dr<sup>a</sup> Claudete de Fátima Ruas e Dr. Paulo Maurício Ruas, por terem me recebido no laboratório de braços abertos, em especial, a professora Claudete pela orientação e por todos os ensinamentos e dedicação durante a execução deste projeto.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Leandro Gonçalves, pela orientação, ensinamentos e ajuda com as análises deste projeto.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela oportunidade da realização do curso de Mestrado e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

Às pesquisadoras Rosana Rodrigues (UENF) e Rosa Barbieri (Embrapa Clima Temperado), pela doação do material que foi utilizado em nossa pesquisa. À minha família, em especial meus pais, Jefferson e Christine, que sempre me incentivaram, me deram suporte e apoio e nunca mediram esforços para realizar meus sonhos.

Aos colegas e amigos do laboratório, Lucas, Alana, Bruna, Daniele, Jessica, Luana, Michely, Nataiane, Sara, Patrícia, Renata, Natália e Gabriela, pela amizade, brincadeiras e bons momentos vividos dentro e fora do laboratório. Ao Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas, pelos ensinamentos e auxílio nas análises estatísticas.

Às novas amigas de Londrina e às antigas, Geovana, Thiago, Luiz, Ana Luisa, Ana Clara, Eloisa, Gabriel e Sandy, que me ajudaram diretamente e indiretamente na execução deste trabalho, me apoiando e me dando forças para seguir até o fim.

Muito obrigada!

CARDOSO, Rafaella. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de *Capsicum baccatum* L.** 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

*Capsicum baccatum* L., tendo o seu centro de origem na Bolívia e no sul do Peru, é considerada uma das principais pimentas da América do Sul. No Brasil, essa espécie é amplamente produzida por agricultores familiares, sendo os tipos cambuci e dedo-de-moça os mais cultivados. Essa espécie de pimenta é geralmente consumida *in natura* ou processadas na forma de pós ou extratos. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 79 acessos de *C. baccatum*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, por meio de descritores morfoagronômicos do fruto e de marcadores moleculares de AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphisms*). O uso de quinze descritores, sendo onze qualitativos e quatro quantitativos, empregados para a caracterização morfológica, identificou uma ampla variabilidade fenotípica entre os acessos de *C. baccatum* avaliados. A análise dos dados, usando o método de Ward-MLM, resultou na formação de dois grupos, sendo o formato e o comprimento do fruto, essenciais para esta separação. Para a análise molecular, o DNA dos acessos foi amplificado usando seis combinações de *primers* seletivos de AFLP marcados com fluorescência. A análise dos produtos amplificados por AFLP identificou um total de 1200 bandas, das quais 1122 (93,5%) foram polimórficas. O dendrograma gerado por do coeficiente de distância genética de Jaccard, a partir do método de agrupamento UPGMA, identificou a formação de dois grupos, sendo possível a separação da variedade silvestre *C. baccatum* var. *praetermissum* das demais. Estes resultados corroboram com a análise de coordenada principal (PCoA) e com a análise Bayesiana de agrupamentos. Não houve relação entre distância genética e origem geográfica dos acessos, provavelmente, devido à intensa troca de frutos e sementes entre agricultores. Os descritores morfoagronômicos, usados concomitantemente com os marcadores AFLP, se mostraram eficientes para detectar altos níveis de variabilidade genética entre acessos mantidos na coleção de germoplasma analisada. Esses resultados podem ser utilizados como uma fonte adicional de informações para auxiliar na condução de programas de melhoramento genético de *C. baccatum*.

**Palavras-Chave:** AFLP. Descritores morfoagronômicos. Pimentas. Variabilidade genética.

CARDOSO, Rafaella. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de *Capsicum baccatum* L.** 2017. 69 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

*Capsicum baccatum* L., with its center of origin in Bolivia and southern Peru, is one of the most regular pepper species cultivate in South America. In Brazil, this specie is widely used by family farmers, which the most common grown varieties are cambuci and dedo-de-moça. This pepper species is consumed either fresh or processed into powders or extracts. The purpose of this work was the characterization of 79 accessions of *C. baccatum*, obtained from different regions of Brazil, using fruit morphoagronomical descriptors and AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphisms) molecular markers. The use of 14 descriptors, comprising 11 qualitatives and four quantitatives, allowed the identification of high phenotypic variability among the accesses of *C. baccatum*. Data analysis applied using the Ward-MLM method identified two main groups that were mostly based on form and length of the fruits. Molecular data were acquired using six fluorescence-labeled AFLP primer combinations, used for DNA amplification on all accessions. Analysis of the AFLP products identified 1200 markers, of which 1122 (93.5%) were polymorphic. UPGMA clustering, by Jaccard's genetic distance coefficient, revealed associations of accesses into two groups, with the wild variety *C. baccatum* var. *praetermissum* isolated from all others. These results were in agreement with PCoA and Bayesian analysis of clusters. There was absence of relation between genetic distance and geographic origin of the accesses, possibly due to the constant exchange of fruits and seeds among farmers from different regions. The concomitant use of morphoagronomic and AFLP molecular data revealed high genetic variability among accesses maintained in this germoplasm collection. The results can be used as additional source of information to guide programs of genetic improvement of *C. baccatum*.

**Key words:** AFLP. Chilli peppers. Genetic variability. Morphoagronomic descriptors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Morfologia da flor de <i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i> . Foto: Rafaella Cardoso. ....	18
<b>Figura 2</b> - Distribuição geográfica dos 79 acessos de <i>C. baccatum</i> , pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) nas diferentes regiões do Brasil e um representante do Peru.....	34
<b>Figura 3</b> - Gráfico da função logaritmica de probabilidade (Log-Likelihood), mostrando o número ótimo de grupos para 79 acessos de <i>C. baccatum</i> , caracterizados por meio de descritores morfoagronômicos. ....	42
<b>Figura 4</b> - Dispersão gráfica das duas primeiras variáveis canônicas para os dois grupos formados pela análise Ward-MLM para variáveis quantitativas entre 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	46
<b>Figura 5</b> - Frequência da distribuição de dissimilaridade, com base nos marcadores AFLP entre 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	48
<b>Figura 6</b> - Dendrograma com base no agrupamento UPGMA de 79 acessos de <i>C. baccatum</i> por meio da distância de Jaccard para os dados moleculares de AFLP. ....	49
<b>Figura 7</b> - Análise da Coordenada principal (PCoA) de 79 acessos de <i>C. baccatum</i> , conforme distância genética de Jaccard, explicando 53,58% da variabilidade. ....	50
<b>Figura 8</b> - Agrupamentos (K=3) formados segundo a análise bayesiana para os 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . As três cores representam os três diferentes grupos. O percentual estimado de participação de cada acesso em um grupo é demonstrado no eixo y.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Identificação dos 79 acessos de <i>C. baccatum</i> pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina, seu banco de germoplasma de origem e sua procedência geográfica. ....	34
<b>Tabela 2</b> -	Descritores qualitativos utilizados para avaliar os 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	37
<b>Tabela 3</b> -	Descritores quantitativos utilizados para avaliar os 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	37
<b>Tabela 4</b> -	Número de grupos formados pelo método de Ward-MLM, com base na função logarítmica da probabilidade (Log-Likelihood) e seu incremento.....	42
<b>Tabela 5</b> -	Associação dos 79 acessos de <i>C. baccatum</i> em dois grupos, conforme o método de Ward-MLM.....	43
<b>Tabela 6</b> -	Variáveis qualitativas e número de genótipos por grupo em cada um dos dois grupos (G1 e G2), formados pelo método de Ward-MLM, para 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	44
<b>Tabela 7</b> -	Médias das variáveis quantitativas para cada um dos dois grupos (G1 e G2) formados pelo método Ward-MLM e as duas variáveis canônicas em 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	46
<b>Tabela 8</b> -	Combinações de primers seletivos de AFLP utilizados, número de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo por primer obtido em 79 acessos de <i>C. baccatum</i> . ....	47

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	Origem e morfologia do Gênero <i>Capsicum</i> .....	14
2.2	Importância econômica e medicinal de <i>Capsicum</i> .....	16
2.3	<i>Capsicum baccatum</i> .....	18
2.4	Caracterização de bancos de Germoplasma e melhoramento genético .....	20
2.5	Caracterização Morfológica .....	22
2.6	Caracterização molecular .....	24
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
3.1	Geral.....	28
3.2	Específicos .....	28
<b>4.</b>	<b>ARTIGO</b> .....	29
	RESUMO .....	30
	INTRODUÇÃO.....	32
	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
	Material Vegetal.....	33
	Caracterização morfológica .....	38
	Análise estatística dos dados morfológicos .....	38
	Caracterização molecular .....	38
	Extração de DNA e reações de AFLP .....	38
	Análises estatísticas dos dados moleculares .....	40
	RESULTADOS .....	41
	Caracterização morfológica .....	41
	Caracterização molecular .....	47
	DISCUSSÃO .....	51
	Caracterização morfológica .....	51
	Caracterização molecular .....	53

CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* L. é um importante membro da família das Solanáceas. Originário de zonas tropicais úmidas da América Central e do Sul, é um dos primeiros gêneros a ser cultivado e utilizado na culinária pelos povos nativos dessas regiões. O gênero compreende mais de 200 variedades de pimentas e pimentões, as quais possuem uma variação morfológica, principalmente em relação a cor, tamanho e formato do fruto (GOVINDARAJAN, 1986; MENICHINI, 2009). No Brasil, o cultivo das espécies de *Capsicum* vem crescendo nos últimos anos, sendo os pequenos agricultores responsáveis por grande parte da produção desta hortaliça. Além disso, as pimentas possuem importantes compostos medicinais, auxiliando no combate de muitas enfermidades (BARBOSA et al, 2002; SUDRÉ et al, 2010).

O gênero *Capsicum* tem cerca de 35 espécies descritas das quais, cinco espécies incluindo, *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* e *C. baccatum*, são consideradas domesticadas (DEWITT e BOSLAND, 2006). Dentre estas espécies, *C. baccatum* destaca-se por ser amplamente cultivada no Brasil, sendo seus principais representantes a pimenta “Cumari”, “Dedo-de-moça” e “Cambuci” (REIFSCHNEIDER, 2000). Devido à grande importância do gênero, é fundamental, estudos que visem o conhecimento da variabilidade genética, tanto para a sua conservação, tendo em vista o crescente e constante processo de degradação ambiental, quanto para a aplicação em programas de melhoramento genético. Neste contexto, a caracterização de bancos de germoplasma, responsáveis por conservar diferentes genótipos, alcança elevada importância, visto que estas coleções podem ter uso potencial para aplicação nesses programas. A caracterização de um banco de germoplasma tem, portanto, como principais objetivos, identificar a variabilidade genética contida na coleção, testar a identidade dos acessos, bem como evitar o acúmulo de erros nas coleções (GILBERT et al, 1999; CARVALHO et al, 2009).

Dentre as ferramentas utilizadas para acessar as informações contidas em um banco de germoplasma, merecem destaque: a utilização de caracteres morfológicos para a distinção de genótipos, com descritores próprios pré-

estabelecidos para a espécie e a caracterização genética, obtida a partir de marcadores moleculares (GONÇALVES et al, 2008). Dentre os marcadores moleculares disponíveis destaca-se o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o qual, devido à alta taxa de polimorfismo gerada e boa reprodutibilidade, vem sendo amplamente utilizado em estudos com o gênero *Capsicum* (FALEIRO, 2008; ALBRECHT et al, 2012; BABA et al, 2015; CHHAPEKAR et al, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo, realizar a caracterização morfológica e molecular de acessos de *C. baccatum*, obtidos de coleções de germoplasma, contendo amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Origem e morfologia do Gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum* L., pertencente à família Solanaceae, tribo Solaneae, subtribo Solaneneae possui cerca de 35 espécies e engloba os pimentões e as pimentas, sendo esta última, conhecida mundialmente pela sua ardência e sabor característico. O nome do gênero varia do grego: Kapsó (picar) e Kapsakes (cápsulas) (NUEZ et al, 1996; BASU e DE, 2003). Estudos com o gênero *Capsicum* revelaram que sua origem é proveniente da América Central e América do Sul (DJIAN-CAPORALINO et al, 2007). Segundo Hunziker (2001), quatro possíveis centros de diversificação do gênero foram estabelecidos: (1) Sul dos Estados Unidos e México até o oeste da América do Sul; (2) Noroeste do Brasil e costa oeste da Venezuela; (3) Costa leste do Brasil e (4) Região central da Bolívia e do Paraguai até o norte e região central da Argentina.

O Brasil abriga o maior número de espécies do gênero, sendo um importante centro de diversidade, visto que possui tanto espécies domesticadas, quanto semi-domesticadas e silvestres (BARBOZA e BIANCHETTI, 2005). Relata-se que as espécies de *Capsicum* são utilizadas para consumo desde muito antes da domesticação de grãos, como o milho e o feijão, fazendo parte da culinária humana desde aproximadamente 7500 anos e que a sua domesticação se deu a cerca de 6100 anos atrás (MACNEISH, 1964; BASU e DE, 2003; BARBOZA e BIANCHETTI, 2005).

As espécies de *Capsicum* se caracterizam como arbustos perenes e raramente, porte herbáceo. A coloração do fruto maduro é geralmente vermelha, porém, existem muitas variações, como amarelo, laranja, roxo ou preto. O formato do fruto varia de acordo com a espécie, podendo ser alongado, arredondado, triangular, cônico, quadrado e campanulado (IPGRI, 1995). A classificação das espécies é feita de acordo com o grau de relação com os humanos, podendo ser classificadas como sendo: a) espécies silvestres, como *C. lanceolatum*, que se caracterizam por sua capacidade de crescer fora, e raramente invadir, ambientes antropizados; b) espécies semi-domesticadas, as quais são cultivadas pelo homem, mas são independentes

para sobreviver; c) espécies domesticadas, as quais perderam a habilidade de se reproduzir sem a intervenção humana (DEWITT e BOSLAND, 2006).

O gênero é largamente cultivado em regiões temperadas e tropicais e seu hábito de crescimento varia de acordo com a espécie e seu genótipo, podendo ser prostrado, intermediário ou ereto (BEDUHN, 2010). Existem cinco espécies de *Capsicum* reconhecidas como sendo domesticadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* e *C. baccatum* (DEWITT e BOSLAND, 2006). Estas espécies são preferencialmente autógamas, porém existe uma taxa de alogamia que pode variar de 0 a 83%, por isso, muitas vezes são caracterizadas por ter um sistema de reprodução intermediário. As possíveis causas para explicar essas variações são: alterações morfológicas na flor, ação de insetos polinizadores e temperatura (TANKSLEY, 1984; SACCARDO, 1992). Em espécies domesticadas, geralmente o estigma se encontra no mesmo nível das antera, aumentando a possibilidade de autofecundação (CASALI e COUTO, 1984). A maioria das espécies do gênero são diploides e apresentam dois números básicos cromossômicos:  $x = 12$  e  $x = 13$  (POZZOBON et al, 2006).

As cinco espécies domesticadas podem ser diferenciadas por características morfológicas do fruto e principalmente, das flores. As espécies *C. baccatum* e *C. pubescens* podem ser facilmente diferenciadas de acordo com a cor das corolas, sendo que a primeira apresenta corola branca e anteras amarelas, enquanto a segunda mostra tanto corola quanto anteras na cor púrpura. Para as outras três espécies (*C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) o processo de diferenciação se torna um pouco mais complicado, sendo que estas são diferenciadas pelo número de flores por nós e pela constrição do caule (GUERRA, 2001; MOREIRA et al, 2006).

A espécie *C. frutescens* é popularmente conhecida como Malagueta, sendo a pimenta “tabasco” a cultivar mais conhecida e apreciada da espécie (YAMAMOTO e NAWATA, 2005; DEWITT e BOSLAND, 2006). Já a espécie *C. pubescens*, popularmente conhecida como Rocoto, teve origem na Bolívia e especula-se que foi a primeira a ser domesticada a cerca de 6000 anos, (DEWITT e BOSLAND, 2006). *Capsicum annuum* inclui variedades populares de pimentões e pimentas doces, sendo a espécie mais cultivada no Brasil e no mundo, incluindo várias variedades (CARVALHO et al, 2006). A espécie *C.*

*chinense* tem como principais representantes a pimenta-de-cheiro, pimenta-de-bode e muricie, que tem como principal característica a sua forte pungência (REIFSCHNEIDER, 2000). A quinta espécie, *C. baccatum*, que tem como principais representantes a pimenta Dedo-de-moça e Cambuci, possui uma elevada importância econômica e medicinal e é amplamente cultivada no Brasil (DJIAN-CAPRALINO et al, 2007).

## **2.2 Importância econômica e medicinal de *Capsicum***

O gênero *Capsicum* é caracterizado por apresentar um elevado grau de pungência, produzida por um conjunto de substâncias denominadas capsaicinóides (PINEDA et al, 2007). Este grupo químico possui mais de 10 compostos conhecidos, entre esses destacam-se a Capsaicina e a Dihidrocapsaicina produzidas na placenta dos frutos. Estudos realizados demonstraram que o teor de pungência dos frutos está relacionado com fatores genéticos e ambientais (BOSLAND, 1993; PINEDA et al, 2007). Esta característica de ardência faz com que as pimentas sejam amplamente apreciadas na culinária, onde geralmente são utilizadas como condimento nos mais variados pratos e estão tipicamente presentes na gastronomia de vários países latino-americanos, como Peru e México. Os frutos podem ser consumidos *in natura* ou das mais diversas maneiras, como conservas, páprica, frutos desidratados e molhos líquidos (TOFANELLI et al, 2003; MOREIRA et al, 2006).

Devido a sua ampla apreciação, o gênero *Capsicum* apresenta importância econômica, sendo que a maior produção de pimenta está concentrada no continente Asiático. Segundo dados do Faostat (2014), a China e a Índia são os maiores produtores, cultivando anualmente cerca de 1,5 milhões de hectares. No Brasil, os pimentões e pimentas são cultivados do Rio Grande do Sul até Roraima, sendo Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul os principais estados produtores (RUFINO e PENTEADO, 2006). De acordo com Domenico et al (2012), grande parte da produção e comercialização de pimentas se deve a atividade de pequenos produtores, sendo escassas as informações sobre as estatísticas de produção dessa hortaliça. Segundo os dados da ABCSEM (2009), em 2009 estima-se que a

área de pimentas cultivadas no Brasil era de aproximadamente 1880,37 ha. O cultivo de *Capsicum* também possui importância social, visto que a colheita dos frutos requer elevada mão-de-obra (MOREIRA et al, 2006).

Algumas espécies de *Capsicum* apresentam características como, porte anão e diferentes cores dos frutos no processo de maturação, que favorecem seu uso comercial como plantas ornamentais, contribuindo assim com mais uma importante fonte de renda para os agricultores familiares (CARVALHO et al, 2003). Além disso, as espécies do gênero apresentam propriedades medicinais. Acredita-se que o gênero começou a ser utilizado pelos antigos indígenas, incluindo o grupo dos Maias em práticas medicinais a milhares de anos. Dentre essas práticas, incluíam-se a utilização de pimentas para o tratamento de resfriados e dores de garganta, casos de queimaduras e no tratamento de problemas respiratórios como asma e tosse (CICHEWICZ e THORPE, 1996; DE, 2003).

Devido à presença dos capsaicinóides, carotenoides, flavonoides e ácido ascórbico, as pimentas apresentam propriedades farmacológicas, além de serem fonte de antioxidantes naturais (REIFSCHNEIDER, 2000). Estudos revelaram que a capsaicina possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. Além disso, vários estudos relatam que compostos antioxidantes podem contribuir para a prevenção de alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, AVC, aterosclerose e até mesmo reduzir o risco de doenças degenerativas. Ainda, o ácido ascórbico presente nas pimentas é relatado como sendo um importante antioxidante, atuando na prevenção do escorbuto e mutações de DNA induzidas por estresse oxidativo (MCCARTHY e MCCARTY, 1992; BLOCK e LANGSETH,1994; STEINMETZ e POTTER, 1996; HASLER, 1998; LATHAM, 2002; LUTSENKO et al, 2002). A capsaicina ainda é relatada como sendo uma substância capaz de aliviar as dores causadas pela quimio e radioterapia (BERGER et al, 1996).

As pimentas também apresentam propriedades termogênicas, as quais aumentam o gasto energético e diminuem a gordura corporal, sendo, portanto, úteis em dietas e novas terapias contra a obesidade (SAITO e YONESHIRO, 2013). Além disso, os frutos contêm altos níveis de vitamina C, A, B, E e K, sendo, portanto, bastante nutritivos (DJIAN-CAPORALINO et al, 2007).

### 2.3 *Capsicum baccatum*

A espécie *C. baccatum* foi primeiramente descrita por Linnaeus (1753) e é popularmente conhecida como Aji (ESHBAUGH, 1970; DE, 2003). Sua distribuição ocorre desde o Sul do Brasil até a Bolívia, Equador, Peru e Chile (DE, 2003). Acredita-se que *C. baccatum* tem seu centro de origem na Bolívia e o Sul do Peru, sendo primeiramente domesticada no Peru, a cerca de 4500 anos atrás (HUNZIKER, 1950; ESHBAUGH 1970; D'ARCY e ESHBAUGH, 1974). Outros estudos forneceram dados moleculares que apontaram a espécie silvestre *C. chacoense*, nativa de regiões do Paraguai e Argentina, como sendo o progenitor de *C. baccatum* (WALSH e HOOT, 2001).

Morfologicamente, *C. baccatum* se caracteriza pelo porte arbustivo, com altura entre 1m e 1,5m. A corola é branca e apresenta um par de manchas amareladas ou esverdeadas na base das pétalas (Figura 1). As anteras também têm coloração amarela. Os frutos, que podem ser de várias cores e formas, geralmente são pendentes, persistentes, grandes, com cerca de 1-1,5cm de diâmetro e de 8 a 10 cm de comprimento, possuem pungência suave e semente da cor palha (CARVALHO et al, 2006; MOREIRA et al, 2006).



**Figura 1** - Morfologia da flor de *C. baccatum* var. *pendulum*. Foto: Rafaella Cardoso.

A espécie é dividida em dois grandes grupos, o primeiro caracterizado pela variedade silvestre *C. baccatum* var. *baccatum*, que antigamente era

chamada de *C. microcarpum* e o segundo pela a variedade domesticada *C. baccatum* var. *pendulum* (ESHBAUGH, 1970; DE, 2003). O primeiro grupo é popularmente chamado de “Arivivi”, sendo caracterizado pelo porte pequeno e ereto, com frutos decíduos e vermelhos. As flores desta variedade são brancas, com manchas esverdeadas, semelhantes às da variedade *C. baccatum* var. *pendulum*. Além disso, *C. baccatum* var. *baccatum* possui distribuição geográfica nas regiões da Argentina, Bolívia, Paraguai, Peru e Sul do Brasil (D’ARCY e ESHBAUGH, 1974; CARVALHO et al, 2006). *Capsicum baccatum* var. *pendulum* é a variedade mais comum, sendo amplamente cultivada e distribuída em toda região Oeste da América do Sul e introduzida no Hawaii, Costa Rica, Índia e Estados Unidos. Essa variedade apresenta uma enorme diversidade nas formas, cores e tamanho dos frutos. Essas plantas têm hábito ereto, sendo geralmente altas, com aspecto de árvores. O período de crescimento é de cerca de 120 dias. Os principais representantes desta variedade são: “Aji Amarillo” (frutos maduros são alaranjados), “Aji ayuello”, “Aji Limon”, “Cambuci” e “Dedo-de-Moça” (ESHBAUGH, 1970; DE, 2003).

Evidências arqueológicas sugerem que a variedade *C. baccatum* var. *pendulum* derivara da *C. baccatum* var. *baccatum* (ESHBAUGH, 1976; PICKERSGILL et al, 1979; MCLEOD et al, 1983). Mais tarde, estudos moleculares com marcadores AFLP (ALBRECHT et al, 2012), corroboraram essa informação, demonstrando que a diversidade genética encontrada na variedade *C. baccatum* var. *baccatum* é maior do que a encontrada na variedade *C. baccatum* var. *pendulum*, sendo a primeira, mais antiga.

Além das duas variedades citadas, existem outras duas com representação menor: *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. baccatum* var. *umbilicatum*. A primeira, é uma variação silvestre, provavelmente derivada de populações isoladas de *C. baccatum* var. *baccatum* com distribuição restrita ao Sul do Brasil. *C. baccatum* var. *praetermissum* difere das variedades *C. baccatum* var. *baccatum* e *C. baccatum* var. *pendulum* pela presença de flores que possuem uma faixa violeta na margem das pétalas. É popularmente conhecida como “Pimenta Cumari” e seus frutos são esféricos, pequenos, com cerca de 6 mm de diâmetro e coloração vermelha (HUNZIKER, 1971; MCLEOD et al, 1983; DE, 2003; CARVALHO et al, 2006). A descoberta da variedade *C. baccatum* var. *umbilicatum* é muito recente e ainda existem controvérsias entre

os taxonomistas sobre a sua classificação. Essa variedade apresenta aspecto herbáceo e forma do fruto peculiar, porém, seu progenitor ainda é desconhecido (ALBRECHT et al, 2012).

*Capsicum baccatum* possui uma enorme importância econômica, sendo a espécie mais cultivada na América do Sul. Seu uso é muito popular na culinária, sendo geralmente consumida a fresco ou em forma de páprica (DEWITT e BOSLAND, 1996). Além disso, sua importância econômica aumenta, tendo em vista a sua utilização como planta ornamental, tornando-se assim, uma alternativa rentável para os agricultores (BOSLAND, 1993).

Além da importância econômica *C. baccatum* possui uma elevada importância medicinal. Dentre as principais substâncias produzidas pela pimenta dedo-de-moça estão o betacaroteno, licopeno, piperina, capsaicinóides, carotenoides, ácido ascórbico e vitaminas A, B, C e E (BONTEMPO, 2007). Estudos realizados por Spiller et al (2008) e Zimmer et al (2012) com a variedade *C. baccatum* var. *pendulum* identificaram uma alta atividade antioxidante e anti-inflamatória, provavelmente induzida pela capsaicina.

Diante da importância econômica, social e medicinal do gênero *Capsicum*, são essenciais, estudos que visem a conservação de sua diversidade, bem como sua aplicação em programas de melhoramento genético. Entre esses estudos, destaca-se a caracterização de bancos de germoplasma.

#### **2.4 Caracterização de bancos de Germoplasma e melhoramento genético**

A utilização de recursos genéticos é considerada como parte essencial da biodiversidade, promovendo o desenvolvimento sustentável da agricultura e a produção de alimentos (REIFSCHNEIDER, 2000). Além disso, esses recursos representam a matéria prima para a criação de novas variedades, que podem ser mais produtivas, resistentes a pragas, herbicidas, doenças e melhor adaptadas às regiões de cultivo. Dessa maneira, os recursos genéticos representam fonte de variabilidade que pode ser explorada em programas de melhoramento genético (REIFSCHNEIDER, 2000; ALMEIDA et al, 2005).

Manter a variabilidade genética é de extrema importância para a sustentabilidade da agricultura. Uma das estratégias utilizada é a conservação *ex situ* que possibilita manter e explorar componentes da diversidade biológica fora do seu habitat natural (ENGELMANN e ENGELS, 2002; FALEIRO, 2008).

A variabilidade genética é, geralmente, mantida por meio de estruturas denominadas bancos de germoplasma, que representam a base física do acervo genético, caracterizado pelo conjunto de genótipos de uma espécie. Esses repositórios geralmente contêm centenas, ou em alguns casos, milhares de amostras ou acessos, representando variedades comerciais, populações, variedades tradicionais e silvestres. O objetivo principal de um banco de germoplasma é, em primeiro lugar, conservar os genótipos de uma espécie, frente aos constantes processos de degradação ambiental. Além disso, as amostras contidas em bancos de germoplasma provêm de diferentes origens geográficas, sendo atrativos aos melhoristas, pois fornecem uma gama de informações que podem ser utilizadas com objetivo de gerar novas cultivares com características de interesse. Sendo assim, a conservação *ex situ* é de extrema importância para programas de melhoramento genético de plantas (NASS et al, 2001; BESPALHOK et al, 2007; FERREIRA, 2008).

A coleta e manutenção de pimentas do gênero *Capsicum* são de grande importância, pois permitem ampliar o conhecimento sobre o seu potencial de adaptação e resistência (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005). No Brasil diversas instituições como, a Embrapa Hortaliças, Embrapa Clima Temperado e Universidade Estadual do Norte Fluminense *Darcy Ribeiro* (UENF) mantêm bancos de germoplasma para o gênero *Capsicum*.

A grande diversidade encontrada no gênero tem despertado cada vez maior interesse de melhoristas. Vários estudos, visando o melhoramento genético do gênero, vêm sendo realizados em diversas instituições, com o objetivo de buscar acessos mais produtivos, sendo importante a seleção dos genótipos que apresentem equilíbrio entre qualidade e quantidade, de maneira a atender a demanda comercial. Um exemplo é visto nos estudos realizados pela Embrapa Clima Temperado, que visam o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à doenças e valores nutricionais mais atraentes (CARVALHO et al, 2002; EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2007; RIBEIRO et al, 2008; RÉGO et al, 2011).

Entretanto, a medida que os bancos vão aumentando o número de acessos em suas coleções, é levantada a dúvida referente à sua qualidade, no que diz respeito a representatividade que essa coleção está tendo da variabilidade genética. Muitas vezes, as amostras de um banco de germoplasma são coletadas e depositadas sem muito conhecimento acerca dos acessos individuais. Além disso, com o tempo, existe probabilidade de acúmulo de erros dentro desses bancos, muitas vezes devido ao seu mau uso ou armazenamento inadequado, resultando em uma perda de viabilidade. Isto pode levar, por exemplo, a duplicação de amostras ou a erosão genética e, conseqüentemente, perda de genes importantes para a espécie (FORD-LLOYD e JACKSON, 1991; GILBERT et al, 1999; FERREIRA, 2008; CARVALHO et al, 2009). Esses erros podem reduzir o valor das coleções e são difíceis de serem detectados. Se faz necessário, portanto, estudos que visem a caracterização de bancos de germoplasma, testando a identidade e variabilidade genética de indivíduos de determinado banco. (GILBERT et al, 1999; RODRIGUEZ et al, 1999; FERREIRA, 2008).

A caracterização de bancos de germoplasma consiste na observação, mensuração e avaliação de traços capazes de descrever e distinguir acessos presentes nessas coleções. Em geral, são consideradas características morfológicas (ALMEIDA, 2005; FERREIRA, 2008). Existem diferentes níveis de caracterização de acessos e estes deverão ser escolhidos de acordo com o objetivo de estudo a ser realizado, levando em consideração, também, a disponibilidade de recursos financeiros. Segundo Gonçalves et al (2008), os bancos de germoplasma podem ser caracterizados de acordo com descritores morfológicos, características agrônômicas e marcadores moleculares. Um dos procedimentos mais empregado para a caracterização são as listas de descritores morfológicos (FERREIRA, 2008).

## **2.5 Caracterização Morfológica**

A caracterização morfológica é a técnica mais antiga a ser utilizada para análise de acessos de um banco de germoplasma. Trata-se de um processo simples, de fácil aplicação e apresenta um custo baixo, quando comparado a

outras técnicas. A caracterização morfológica consiste na utilização de uma lista de descritores, a fim de prover maiores informações sobre o germoplasma conservado. Os descritores morfológicos são desenvolvidos por especialistas da espécie e devem ser confiáveis. Geralmente são caracteres altamente herdáveis que podem ser observados de maneira eficaz, a partir da identificação visual e são expressos de maneira homogênea em todos os ambientes (RAMOS et al, 1999; FERREIRA, 2008; RODRIGUES et al, 2010; ADENIJI et al, 2013).

Para estimar a taxa de variabilidade genética, a partir de descritores morfológicos, geralmente são realizadas análises multivariadas, como análises por métodos de agrupamento e variáveis canônicas. Normalmente, os dados qualitativos são de natureza binária, ou seja, ausência (0) ou presença (1) de determinada característica (SUDRÉ et al, 2005; INCE et al, 2009). Para a caracterização de pimentas do gênero *Capsicum* utilizam-se os descritores estabelecidos pelo IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) em 1995. Diversos trabalhos de caracterização no gênero vêm sendo desenvolvidos a partir desse descritor, como por exemplo, o trabalho realizado por Geleta et al (2005), onde foram analisadas 20 características morfoagronômicas em *C. annuum* e foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos. Sudré et al (2005) avaliaram 56 acessos de *Capsicum*, provenientes do banco de germoplasma da UENF, por meio de 11 descritores quantitativos, identificando diferenças significativas entre todos os acessos avaliados. A análise de 71 acessos de *C. chinense*, por meio de descritores de características qualitativas e quantitativas, demonstrou que alguns descritores são essenciais para a diferenciação de acessos (BABA et al, 2015). Esses estudos elucidam a importância da utilização de descritores morfológicos para a caracterização de acessos no gênero *Capsicum*.

Apesar de ser uma importante ferramenta, o uso de descritores morfológicos apresenta algumas limitações. Dentre elas está, o polimorfismo limitado, que diminui o sucesso de diferenciação de acessos, não permitindo, muitas vezes, a distinção de genótipos aparentados. Para compensar essa limitação, um maior número de descritores tem que ser utilizados. Além disso, existe uma potencial influência do ambiente no fenótipo, aumentando a chance

de falsos positivos. Ainda, os descritores morfológicos, algumas vezes, apresentam poucas aplicações práticas em programas de melhoramento genético, visto que as características analisadas podem ter pouco interesse no âmbito da agricultura (FERREIRA, 2008).

Para contornar essas limitações, a caracterização de bancos de germoplasma tem sido realizada com sucesso por meio de ferramentas que tem como base as técnicas moleculares. Estudos realizados por Islam et al (2011) e Potokina et al (2012) evidenciam que os marcadores morfológicos, quando utilizados concomitantemente com marcadores moleculares, podem ser uma excelente ferramenta para a distinção de genótipos.

## **2.6 Caracterização molecular**

Os marcadores moleculares são características do DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILACH, 1998), além de possuírem vantagens em relação aos morfológicos, visto que não são influenciados por fatores ambientais (BRAMMER, 2000). Os marcadores moleculares identificam polimorfismo genético diretamente ao nível do DNA, possibilitando a avaliação da variabilidade genética presente entre e dentro de acessos, viabilizando a caracterização genética de genótipos de maneira simples e rápida (BERED et al, 1997). Além disso, o uso desses marcadores permite a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos e possibilidade de detecção de polimorfismos em qualquer tecido ou estado de desenvolvimento da planta. As desvantagens se devem ao elevado custo de algumas técnicas moleculares (FEDERIZZI, 1998; FALEIRO, 2008).

Os marcadores podem ser classificados em dois grupos principais, de acordo com a técnica utilizada: hibridização ou amplificação de DNA. Um dos primeiros grupos de marcadores moleculares desenvolvidos foram os RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste em uma técnica de hibridização, detectando variações em sequências de DNA de 4 a 8 pares de bases, a partir do uso de enzimas de restrição. Sua principal limitação decorre do uso intensivo da mão-de-obra, do alto custo e tempo necessários para

análise (MILACH, 1998). Outro marcador que tem como base a hibridização inclui os chamados Minisatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), cuja técnica é similar a de RFLP, diferindo apenas no tipo de sonda utilizada (FALEIRO, 2008).

A partir do início da década de 90, com o advento das técnicas moleculares que tem por base a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), houve aumento significativo no uso de métodos moleculares para a obtenção de dados em estudos visando o melhoramento genético. O sucesso obtido com o uso de métodos moleculares deve-se a maior robustez, rapidez e eficiência na obtenção de dados (BERED et al, 1997; FALEIRO, 2008). Assim, as técnicas moleculares que fazem uso da PCR têm sido amplamente aplicadas nos últimos anos. Dentre as vantagens de seu uso se destacam a simplicidade e o menor custo, que possibilitam a sua implementação em pequenos laboratórios (MILACH, 1998; BRAMMER, 2000). As principais técnicas moleculares que fazem uso da PCR para amplificação de sequências específicas de DNA são: RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Os marcadores RAPD são conhecidos por detectar polimorfismo de modo simples e rápido. É uma técnica de custo reduzido que requer pequeno número de etapas e tempo para obtenção de resultados, porém apresenta problemas com repetibilidade, sendo, portanto, considerado pouco eficiente em análise genética (FALEIRO, 2008). Esse marcador pode ser convertido em marcadores SCAR (*Sequence characterized amplified region*), os quais geralmente estão associados a características de interesse. Os marcadores ISSR consistem em uma técnica simples, rápida e de grande repetibilidade, além disso, tal como no RAPD, não é necessário o conhecimento prévio da sequência de DNA da espécie para o desenvolvimento de *primers*, no entanto, assim como o RAPD trata-se de um marcador de caráter dominante (ZIETJIEWICZ et al, 2002; FALEIRO, 2008).

Outra técnica de ampla aceitação em pesquisas genéticas é aquele obtido pela técnica de o SSR ou microssatélite, que consistem de unidades de repetição do genoma. Esses marcadores são sequências curtas, com cerca de 2 a 5pb, repetidas em *tandem* e são obtidos com uso de *primers* que

flanqueiam as regiões de microssatélites. Os microssatélites apresentam como principal vantagem o caráter codominante, sendo capazes de identificar um alto grau de polimorfismo e possuem elevada reprodutibilidade. As regiões de SSR são amplamente distribuídas em genomas de eucariotos e a aplicação da técnica possibilita identificar um único loco, geralmente multialélico, com enorme conteúdo informativo, tornando-se, portanto, uma boa opção para a caracterização genética de populações e de coleções de uma espécie. A desvantagem da técnica está na obtenção dos *primers* utilizados na PCR, quando estes não estão disponíveis na literatura, sendo necessária a construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones e teste de *primers*, tornando-se assim, uma técnica de custo elevado (MILACH, 1998; SALLA et al, 2002; BUSO et al, 2003; FALEIRO, 2008; DUTECH et al, 2007; KUMAR et al, 2009).

Outro tipo de marcador que tem como base a PCR é o AFLP, um método que pode ser aplicado tanto em procaríotos como em eucariotos, sendo capaz de gerar fragmentos de DNA que se encontram distribuídos por todo o genoma. A técnica de AFLP combina os princípios de RFLP e RAPD e são obtidos por meio de quatro etapas principais, sendo elas: clivagem do DNA com enzimas de restrição (*EcoRI*) e (*MseI*); ligação de adaptadores específicos; amplificação pré-seletiva e seletiva via PCR, por meio da utilização de *primers* específicos, e separação dos fragmentos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (VOS et al, 1995; MILACH, 1998) ou em sistema automatizado. Apesar do caráter dominante e de um custo inicial elevado, os marcadores AFLP possuem as seguintes vantagens: não há necessidade de conhecimento prévio do genoma para o desenvolvimento dos *primers* usados na PCR, possui alta reprodutibilidade e possibilita identificar um alto grau de polimorfismo, sendo, portanto, considerado altamente eficiente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998; BRAMMER, 2000; FALEIRO et al, 2001).

A técnica de AFLP já vem sendo utilizada com sucesso em estudos com o gênero *Capsicum*. Baba et al (2015) utilizaram AFLP para estudos de acessos de *C. chinense* obtidos de diferentes regiões do Brasil, demonstrando a eficiência desses marcadores para a caracterização de acessos provenientes de bancos de germoplasma e em prover informações úteis aos programas de

melhoramento genético. Outros trabalhos, utilizando o marcador AFLP, como o de Geleta et al (2005) e Toquica et al (2003) também visaram a caracterização de bancos de germoplasma com espécies do gênero, evidenciando a eficácia da utilização desse marcador em estudos com *Capsicum*. Estudos de taxonomia e diversidade genética com espécies domesticadas de *Capsicum* realizado por Ibiza et al (2012), confirmou que os marcadores AFLP também possuem uma enorme importância em estudos filogenéticos, sendo possível compreender onde se deu a origem e a diferenciação do gênero. Ainda, outros trabalhos foram realizados utilizando a técnica de AFLP no gênero, despontando também, sua aplicação em estudos de conservação, como para a espécie *C. annuum* (KOCHIEVA e RYZHOVA, 2003; LANTERI et al, 2003).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Caracterização de acessos de *C. baccatum* provenientes de diferentes regiões do Brasil, obtidas de coleções de germoplasma, por meio de descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares AFLP.

#### **3.2 Específicos**

- Aplicar a técnica de AFLP para acessar a diversidade das coleções e determinar a variabilidade genética entre acessos de *C. baccatum*.
- Utilizar descritores morfoagronômicos para determinar a variabilidade genética entre acessos de *C. baccatum*.
- Indicar genótipos potenciais para serem aplicados em programas de melhoramento genético.

#### 4. ARTIGO

### Caracterização morfológica e molecular de acessos de *Capsicum baccatum* L.

\* Este artigo será submetido a uma revista a ser escolhida

## RESUMO

*Capsicum baccatum* L., tendo o seu centro de origem na Bolívia e no sul do Peru, é considerada uma das principais pimentas da América do Sul. No Brasil, essa espécie é amplamente produzida por agricultores familiares, sendo os tipos cambuci e dedo-de-moça os mais cultivados. Essa espécie de pimenta é geralmente consumida *in natura* ou processadas na forma de pós ou extratos. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de 79 acessos de *C. baccatum*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, por meio de descritores morfoagronômicos do fruto e de marcadores moleculares de AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphisms*). O uso de quinze descritores, sendo onze qualitativos e quatro quantitativos, empregados para a caracterização morfológica, identificou uma ampla variabilidade fenotípica entre os acessos de *C. baccatum* avaliados. A análise dos dados, usando o método de Ward-MLM, resultou na formação de dois grupos, sendo o formato e o comprimento do fruto, essenciais para esta separação. Para a análise molecular, o DNA dos acessos foi amplificado usando seis combinações de *primers* seletivos de AFLP marcados com fluorescência. A análise dos produtos amplificados por AFLP identificou um total de 1200 bandas, das quais 1122 (93,5%) foram polimórficas. O dendrograma gerado por do coeficiente de distância genética de Jaccard, a partir do método de agrupamento UPGMA, identificou a formação de dois grupos, sendo possível a separação da variedade silvestre *C. baccatum* var. *praetermissum* das demais. Estes resultados corroboram com a análise de coordenada principal (PCoA) e com a análise Bayesiana de agrupamentos. Não houve relação entre distância genética e origem geográfica dos acessos, provavelmente, devido à intensa troca de frutos e sementes entre agricultores. Os descritores morfoagronômicos, usados concomitantemente com os marcadores AFLP, se mostraram eficientes para detectar altos níveis de variabilidade genética entre acessos mantidos na coleção de germoplasma analisada. Esses resultados podem ser utilizados como uma fonte adicional de informações para auxiliar na condução de programas de melhoramento genético de *C. baccatum*.

**Palavras-Chave:** AFLP; descritores morfoagronômicos; pimentas; variabilidade genética.

## ABSTRACT

*Capsicum baccatum* L., with its center of origin in Bolivia and southern Peru, is one of the most regular pepper species cultivate in South America. In Brazil, this specie is widely used by family farmers, which the most common grown varieties are cambuci and dedo-de-moça. This pepper species is consumed either fresh or processed into powders or extracts. The purpose of this work was the characterization of 79 accessions of *C. baccatum*, obtained from different regions of Brazil, using fruit morphoagronomical descriptors and AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphisms) molecular markers. The use of 14 descriptors, comprising 11 qualitatives and four quantitatives, allowed the identification of high phenotypic variability among the accesses of *C. baccatum*. Data analysis applied using the Ward-MLM method identified two main groups that were mostly based on form and length of the fruits. Molecular data were acquired using six fluorescence-labeled AFLP primer combinations, used for DNA amplification on all accessions. Analysis of the AFLP products identified 1200 markers, of which 1122 (93.5%) were polymorphic. UPGMA clustering, by Jaccard's genetic distance coefficient, revealed associations of accesses into two groups, with the wild variety *C. baccatum* var. *praetermissum* isolated from all others. These results were in agreement with PCoA and Bayesian analysis of clusters. There was absence of relation between genetic distance and geographic origin of the accesses, possibly due to the constant exchange of fruits and seeds among farmers from different regions. The concomitant use of morphoagronomic and AFLP molecular data revealed high genetic variability among accesses maintained in this germoplasm collection. The results can be used as additional source of information to guide programs of genetic improvement of *C. baccatum*.

**Key words:** AFLP; chilli peppers; genetic variability; morphoagronomic descriptors.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* L., pertencente à família Solanaceae, possui origem nas zonas tropicais úmidas da América Central e do Sul e é um dos primeiros gêneros a ser cultivado e domesticado, a cerca de 6100 anos atrás (BASU e DE, 2003; MENICHINI, 2009). O gênero compreende aproximadamente 35 espécies, incluindo 200 variedades de pimentas e pimentões, as quais possuem uma variação morfológica, principalmente em relação a cor, tamanho e formato dos frutos (GOVINDARAJAN, 1986). Dessas 35 espécies, apenas cinco são consideradas como sendo domesticadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* e *C. baccatum* (DEWITT e BOSLAND, 2006).

O Brasil é considerado um importante centro de diversidade do gênero, abrigando o maior número de espécies, tanto domesticadas, quanto silvestres (BARBOZA e BIANCHETTI, 2005; SUDRÉ et al, 2010). Além da importância econômica, gênero *Capsicum* possui propriedades farmacológicas, auxiliando no combate de muitas enfermidades. Dentre as espécies domesticadas, *C. baccatum* destaca-se por ser amplamente produzida no Brasil, sendo seus principais representantes a pimenta “Cumari”, “Dedo-de-moça” e “Cambuci” (REIFSCHNEIDER, 2000). A Bolívia e o Sul do Peru são reconhecidos como o centro de origem de *C. baccatum* cuja domesticação acredita-se, tenha ocorrido a cerca de 4500 anos atrás (HUNZIKER, 1950; ESHBAUGH, 1970; D'ARCY e ESHBAUGH, 1974). No país, os agricultores familiares são os principais responsáveis pelo cultivo e produção das variedades de *C. baccatum*, sendo difícil obter estimativas de produção dessa hortaliça (SUDRÉ et al, 2010; DOMENICO et al, 2012).

Conhecer a variabilidade genética de uma espécie é essencial para estudos que visam a sua conservação e aplicação em programas de melhoramento genético. Neste contexto, os bancos de germoplasma são responsáveis por armazenar, conservar e disponibilizar uma ampla gama de genótipos, entretanto, muitas vezes estes repositórios genéticos acumulam erros devido ao armazenamento inadequado, a duplicação de amostras e a perda de variabilidade por erosão genética (GILBERT et al, 1999; NICOLAI et al, 2013). Portanto, a caracterização dos bancos de germoplasma é uma necessidade urgente e pode ser realizada em vários níveis, tendo como base

os descritores morfológicos e agrônômicos disponíveis e os marcadores moleculares (GONÇALVES et al, 2008).

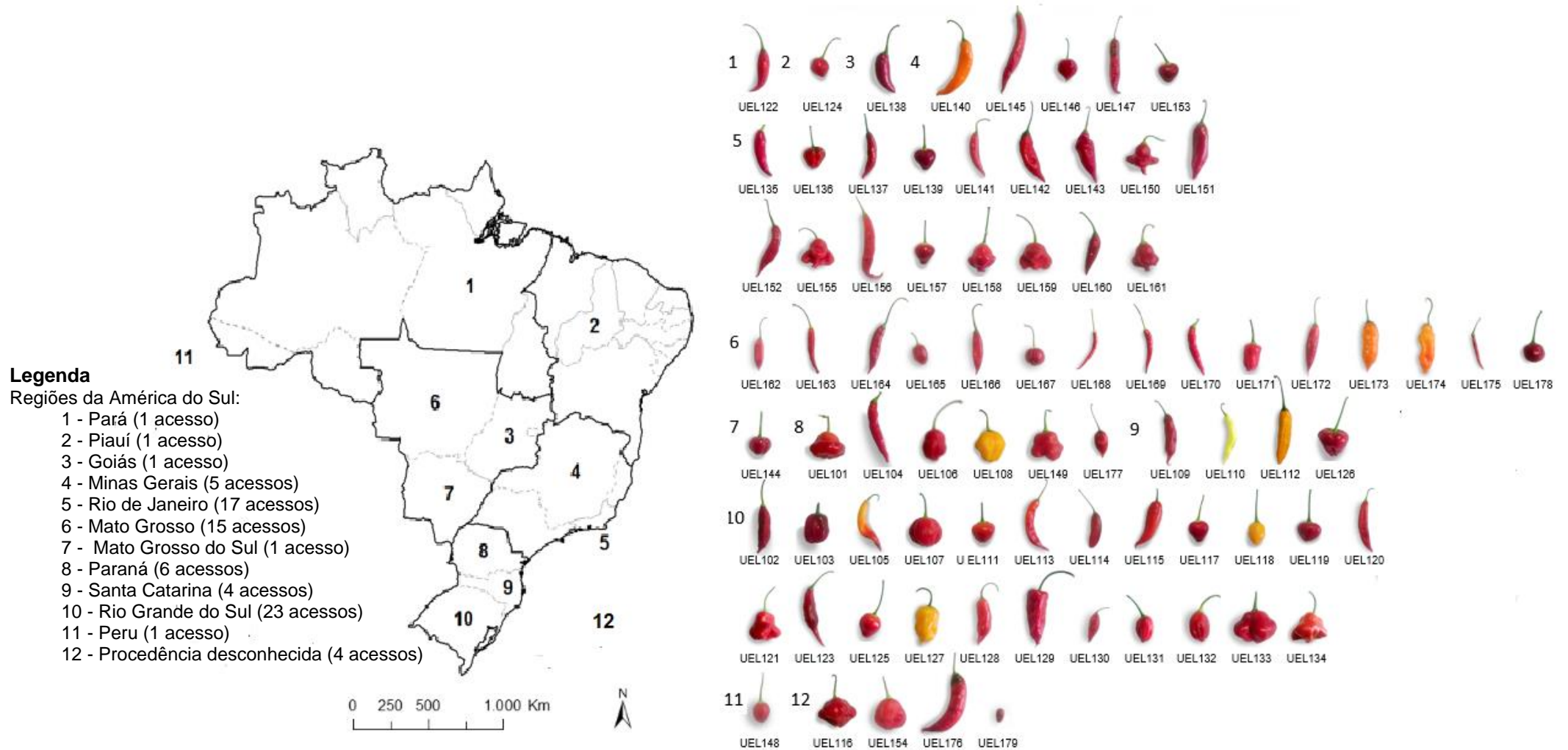
Dentre os marcadores moleculares, destaca-se o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o qual, devido à alta taxa de polimorfismo gerada e boa reprodutibilidade, vem sendo amplamente utilizado em estudos com o gênero *Capsicum* (GELETA et al, 2005; FALEIRO, 2008; ALBRECHT et al, 2012a; BABA et al, 2015; CHHAPEKAR et al, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo, realizar a caracterização morfológica e molecular de acessos de *C. baccatum*, obtidos de coleções de germoplasma, contendo amostras provenientes de diferentes regiões do Brasil. Os resultados desse trabalho irão fornecer subsídios para o conhecimento, a respeito da variabilidade encontrada em acessos de *C. baccatum*, ajudando assim, na conservação da espécie, bem como na identificação de acessos potenciais para serem utilizados em programas de melhoramento genético.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

O material biológico compreendeu 79 acessos de *C. baccatum*, provenientes de 10 estados brasileiros, com 78 representantes das cinco regiões geográficas do Brasil e um representante do Peru (Figura 2). Os acessos foram obtidos do banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado e da Universidade Estadual do Norte Fluminense *Darcy Ribeiro* (UENF), formando o banco de Germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Tabela 1). Para a condução dos experimentos, os acessos foram semeados em bandejas de poliestireno de 128 células, contendo o substrato comercial Vivatto®. Foram semeadas duas sementes por célula, com posterior desbaste, deixando apenas uma plântula em cada célula. Depois de 30 dias, duas plântulas de cada acesso foram transplantadas para vasos contendo uma mistura de solo e substrato (proporção 2:1) e cultivadas em casa de vegetação. O experimento foi realizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) e Centro de Ciências Biológicas (CCB), da Universidade Estadual de Londrina, na cidade de Londrina, PR.



**Figura 2** - Distribuição geográfica dos 79 acessos de *C. baccatum*, pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina (UEL) nas diferentes regiões do Brasil e um representante do Peru.

**Tabela 2** - Identificação dos 79 acessos de *C. baccatum* pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Londrina, seu banco de germoplasma de origem e sua procedência geográfica.

<b>Código</b>	<b>Banco de germoplasma</b>	<b>Procedência</b>	<b>Código</b>	<b>Banco de germoplasma</b>	<b>Procedência</b>
UEL101	EMBRAPA	Renascença/PR	UEL121	EMBRAPA	Cerrito/RS
UEL102	EMBRAPA	Tuparandi/RS	UEL122	EMBRAPA	Belém/PA
UEL103	EMBRAPA	Pelotas/RS	UEL123	EMBRAPA	Pelotas/RS
UEL104	EMBRAPA	Renascença/PR	UEL124	EMBRAPA	Piauí
UEL105	EMBRAPA	Farroupilha/RS	UEL125	EMBRAPA	Herval/RS
UEL106	EMBRAPA	Renascença/PR	UEL126	EMBRAPA	Garopaba/SC
UEL107	EMBRAPA	Farroupilha/RS	UEL127	EMBRAPA	Turuçu/RS
UEL108	EMBRAPA	Renascença/PR	UEL128	EMBRAPA	Turuçu/RS
UEL109	EMBRAPA	São Lourenço do Sul/SC	UEL129	EMBRAPA	Turuçu/RS
UEL110	EMBRAPA	São Lourenço do Sul/SC	UEL130	EMBRAPA	Pelotas/RS
UEL111	EMBRAPA	Cristal/RS	UEL131	EMBRAPA	Cachoeirinha Sul/RS
UEL112	EMBRAPA	São Lourenço do Sul/SC	UEL132	EMBRAPA	Turuçu/RS
UEL113	EMBRAPA	Pelotas/RS	UEL133	EMBRAPA	Encruzilhada do Sul/RS
UEL114	EMBRAPA	Turuçu/RS	UEL134	EMBRAPA	Arroio do Padre/RS
UEL115	EMBRAPA	Três forquilhas/RS	UEL135	UENF	Campos dos Goytacazes /RJ
UEL116	EMBRAPA	Desconhecida	UEL136	UENF	Rio de Janeiro/RJ
UEL117	EMBRAPA	Turuçu/RS	UEL137	UENF	Campos dos Goytacazes /RJ
UEL118	EMBRAPA	Pelotas/RS	UEL138	UENF	Goiânia/GO
UEL119	EMBRAPA	Pelotas/RS	UEL139	UENF	Duas Barras/RJ
UEL120	EMBRAPA	Povo Novo/RS	UEL140	UENF	Viçosa/MG

Tabela 1 – Continuação

<b>Código</b>	<b>Banco de germoplasma</b>	<b>Procedência</b>	<b>Código</b>	<b>Banco de germoplasma</b>	<b>Procedência</b>
UEL141	UENF	Campos dos	UEL161	UENF	Campos dos Goytacazes/RJ
UEL142	UENF	Campos dos	UEL162	UENF	UNEMAT/MT
UEL143	UENF	Campos dos	UEL163	UENF	UNEMAT/MT
UEL144	UENF	Miranda/MS	UEL164	UENF	UNEMAT/MT
UEL145	UENF	Manhuaçu/MG	UEL165	UENF	UNEMAT/MT
UEL146	UENF	Viçosa/MG	UEL166	UENF	UNEMAT/MT
UEL147	UENF	Viçosa/MG	UEL167	UENF	UNEMAT/MT
UEL148	UENF	Peru	UEL168	UENF	UNEMAT/MT
UEL149	UENF	Renascença/PR	UEL169	UENF	UNEMAT/MT
UEL150	UENF	Campos dos	UEL170	UENF	UNEMAT/MT
UEL151	UENF	Campos dos	UEL171	UENF	UNEMAT/MT
UEL152	UENF	Cachoeira de Macacu/RJ	UEL172	UENF	UNEMAT/MT
UEL153	UENF	Viçosa/MG	UEL173	UENF	UNEMAT/MT
UEL154	UENF	Desconhecida	UEL174	UENF	UNEMAT/MT
UEL155	UENF	Campos dos	UEL175	UENF	UNEMAT/MT
UEL156	UENF	Trajano de Morais/RJ	UEL176	UENF	Desconhecida
UEL157	UENF	Trajano de Morais/RJ	UEL177	Coleta <sup>1</sup>	Chopinzinho/PR
UEL158	UENF	Trajano de Morais/RJ	UEL178	UENF	Mato Grosso
UEL159	UENF	Campos dos	UEL179 <sup>2</sup>	UENF	Desconhecida
UEL160	UENF	Campos dos			

<sup>1</sup> Acesso coletado em propriedade familiar; <sup>2</sup> Acesso representante da variedade silvestre *C. baccatum* var. *praetermissum*.

**Tabela 3** - Descritores qualitativos utilizados para avaliar os 79 acessos de *C. baccatum*.

Descritores <sup>1</sup>	Classes observadas
MA	0 = Ausente e 1 = Presente.
CFEI	1 = branco; 2 = amarelo; 3 = verde; 4 = laranja; 5 = roxo; 6 = roxo escuro e 7 = outro.
CFEM	1 = branco; 2 = amarelo-limão; 3 = amarelo-laranja pálido; 4 = amarelo-laranja; 5 = laranja-pálido; 6 = laranja; 7 = vermelho-claro; 8 = vermelho; 9 = vermelho-escuro; 10 = roxo; 11 = marrom; 12 = preto e 13 = outro.
FF	1 = alongado; 2= redondo, 3= triangular; 4= campanulado; 5= retangular e 6 = outro.
OF	1 = agudo; 2 = obtuso; 3 = truncado; 4 = cordado e 5 = lobado.
FPF	1 = pontiagudo; 2 = truncado; 3 = afundado; 4 = afundado com ponta e 5 = outro.
APF	0 = Ausente e 1 = Presente.
ESTF	3 = levemente corrugado; 5 = intermediário e 7 = corrugado.
NL	1 = um; 2 = dois; 3 = três e 4 = quatro.
SF	1 = liso; 2 = semirrugoso; 3 = rugoso; 4 = liso com estrias e 5 = outro.
CP	1 = <1/4 comprimento do fruto, 2 = 1/4-1/2 comprimento do fruto e 3 = >1/2 comprimento do fruto.

<sup>1</sup>MA - Manchas de antocianina; CFEI - Cor do fruto no estágio intermediário; CFEM - Cor do fruto no estágio maduro; FF - Formato do fruto; OF - Ombro do fruto; FPF - Formato da ponta do fruto; APF - Apêndice na ponta do fruto; ESTF - Enrugamento da secção transversal do fruto; NL - Número de lóculos; SF - Superfície do fruto; CP - Comprimento da placenta.

**Tabela 4** - Descritores quantitativos utilizados para avaliar os 79 acessos de *C. baccatum*.

Descritores <sup>2</sup>	Descrição
CF (cm)	Determinado na região longitudinal dos frutos, com o auxílio de um paquímetro, em uma média de dez frutos maduros.
DF(cm)	Determinado na região equatorial dos frutos, com o auxílio de um paquímetro, em uma média de dez frutos maduros.
PF (g)	Com o uso de uma balança, em uma média de dez frutos maduros.
EP (mm)	Medido na maior espessura da polpa do fruto após um corte transversal, com o auxílio de um paquímetro, em uma média de dez frutos maduros.

<sup>2</sup>CF - comprimento do fruto; DF - diâmetro do fruto; PF – Peso fresco do fruto e EP – Espessura do pericarpo.

## Caracterização morfológica

A caracterização morfológica dos frutos de *C. baccatum* foi realizada com base na lista de descritores sugerida pelo IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*, 1995), atualmente nomeado como *Biodiversity International*. Foram utilizados 15 descritores, sendo 11 qualitativos e quatro quantitativos (Tabela 2 e 3).

## Análise estatística dos dados morfológicos

Os descritores morfoagronômicos qualitativos e quantitativos foram analisados simultaneamente, utilizando o método de Ward-MLM (*Modified Location Model*), proposto por Franco et al, (1998), o qual possibilita a análise simultânea de características qualitativas e quantitativas. Para a formação de grupos entre os acessos, foram utilizados os procedimentos CLUSTER e IML, disponíveis no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2000). A matriz de distância foi determinada por meio do algoritmo de Gower (GOWER, 1971), para obter o agrupamento de Ward. O número ideal de grupos foi definido seguindo o critério pseudo-F e pseudo-t<sup>2</sup>, junto com o gráfico logarítmico da função de verossimilhança, maximizada, segundo o método MLM (SAS INSTITUTE, 2000). A diferença entre os grupos e a correlação das variáveis com as variáveis canônicas foram graficamente representadas utilizando o procedimento CANDISC, disponível no programa SAS (SAS INSTITUTE, 2000).

## Caracterização molecular

### Extração de DNA e reações de AFLP

O DNA foi extraído individualmente, a partir de folhas jovens de cinco indivíduos de cada acesso, coletadas diretamente das bandejas. As amostras foram trituradas utilizando o extrator de DNA automático (Retch MM 400), seguindo-se a extração, conforme proposto pelo método CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide, Sigma-Aldrich, Missouri-USA) de Doyle e

Doyle (1987), exceto que o CTAB foi substituído por MATAB (Alquiltrimetilamonium Bromide, Sigma-Aldrich, Missouri-USA) no tampão de extração. A qualidade e integridade do DNA obtido foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%). A concentração de DNA foi estimada utilizando o quantificador NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Califórnia-USA).

A técnica de AFLP foi realizada seguindo o protocolo proposto por Vos et al (1995), com modificações. O DNA extraído dos cinco indivíduos de cada acesso foi misturado de maneira proporcional. Aproximadamente 700 ng desse DNA foi duplamente digerido com 1 U de *MseI* e 5 U de *EcoRI* (Thermo Scientific, Califórnia-USA) e ligado aos adaptadores *EcoRI* (0,5  $\mu$ M) e *MseI* (5  $\mu$ M) em uma reação contendo: T4 DNA ligase (2U); tampão T4 DNA ligase 1X; NaCl (0,05 M); BSA (50  $\mu$ g/ $\mu$ L); DTT (0,25 mM) para um volume final de 10  $\mu$ L. O programa estabelecido para a etapa de digestão-ligação foi: 37°C por 4 h, 22°C por 1 h e 70°C por 10 min. O padrão da digestão/ligação foi visualizado em gel de agarose a 1%. Confirmada a digestão, o produto amplificado foi diluído na proporção de 1:4 com água ultrapura.

A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando 3,5  $\mu$ L do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, Winchester-USA), 0,58  $\mu$ L dos *primers* pré-seletivos *EcoRI* + A e *MseI* + C (4,75  $\mu$ M), 3,0  $\mu$ L da diluição restrição-ligação e água ultra pura, para completar o volume de 10  $\mu$ L. Os *primers* pré-seletivos tem como base a seqüência dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* acrescidos de um único nucleotídeo (*EcoRI*-A e *MseI*-C), para amplificar um sub conjunto de fragmentos, que contenham a base seletiva correspondente após o sítio de restrição. A pré-seleção reduz em até 16 vezes os produtos de amplificação e tem como objetivo a seleção dos fragmentos de interesse. O programa da amplificação pré-seletiva consistiu de: 1 ciclo de 72 °C por 2 min, 20 ciclos de 94 °C por 1 seg, 56 °C por 30 seg, 72 °C por 2 min e um ciclo final de 60 °C por 30 min. A confirmação da PCR pré-seletiva foi revelada em gel de agarose 2% e o produto amplificado foi diluído em 1:8 em água ultrapura.

Para a amplificação seletiva foi feito um *screening* inicial com 12 combinações de *primers* seletivos *EcoRI/MseI*, com o objetivo de identificar as combinações capazes de gerar maior quantidade de polimorfismo nos acessos

de *C. baccatum*. Para esse *screening* foram utilizados 5 amostras de 5 acessos e os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, corados com nitrato de prata e visualizados sob luz branca. As seis combinações mais polimórficas incluindo, *EcoRI*(FAM)/-ACA/*Msel*-CAC; *EcoRI*(NED)-AGC/*Msel*-CTGA; *EcoRI*(VIC)-ACT/*Msel*-CAA; *EcoRI*(PET)-AGC/ *Msel*-CAG; *EcoRI*(VIC)-ACT/*Msel*-CAG; e *EcoRI*(NED)-ACG/*Msel*-CTGA, foram escolhidas para a amplificação seletiva. As reações seletivas foram feitas em um volume de 10  $\mu$ L contendo: 3,5  $\mu$ L de master mix para PCR (GoTaq® Green Master Mix, Promega, Winchester-USA), 0,54  $\mu$ L de cada *primer Msel* (5  $\mu$ M) e *EcoRI* (1 $\mu$ M), 2,5  $\mu$ L da reação de pré-amplificação diluída e 2,92  $\mu$ L de água ultrapura. O programa de amplificação foi composto por 1 ciclo de 94°C por 2 min, 65°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min. A resolução dos fragmentos foi realizada por eletroforese capilar usando o analisador automático de DNA modelo 3500xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA). Os resultados da eletroforese dos fragmentos foram combinados em uma matriz binária pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems).

#### Análises estatísticas dos dados moleculares

A partir do programa FAMD 2.3 (SCHLÜTER e HARRIS, 2006), foi desenhado um dendrograma com base na matriz de distância genética de Jaccard, usando o método de agrupamento UPGMA, bem como a análise de coordenadas principais (PCoA). O dendrograma foi editado por meio do programa FigTree 1.4.3. Para identificar a formação de grupos (K) entre os acessos, foi utilizado o programa Structure versão 2.3.4 (HUBISZ et al, 2009), onde a análise do número de clusters foi realizada seguindo o modelo misto com período de comprimento de 10000 e 100000 repetições. O número de clusters foi determinado de acordo com o método descrito por Evanno et al (2005).

## RESULTADOS

### Caracterização morfológica

Foi observada uma ampla variabilidade morfológica entre os acessos (Figura 2). Seis diferentes cores foram encontradas no estágio de fruto maduro. Vermelho foi a cor predominante, correspondendo a um total de 86% dos frutos, seguido pela cor laranja (6,32%) e amarelo-laranja (3,79%). Apenas um acesso apresentou a cor amarelo-limão, laranja-pálido e vermelho-escuro. A maioria dos acessos apresentou a cor dos frutos no estágio intermediário verde (60,75%), seguido por laranja (36,7%) e amarelo (1,26%). Foram encontrados todos os formatos de frutos propostos pelo IPGRI (1995), sendo predominantemente as formas alongadas (41,7%), em relação às triangulares (27,84%), campanuladas (16,45%), retangulares (7,59%) e redondas (6,35%).

Na maioria dos acessos, a superfície dos frutos foi lisa com 46,86%, seguido da semi-rugosa (21,51%), lisa com estrias (17,72%) e rugosa (13,92%). Todas as classes do ombro do fruto foram encontradas, sendo obtuso o predominante com 39,24%, truncado com 34,17%, cordado com 13,92%, agudo com 8,86% e lobado com 3,79%. Já o formato da ponta do fruto variou de pontiagudo (43,03%), afundado (22,78%), afundado com ponta (15,18%), truncado (13,92%) e outro (5,06%). A maioria dos frutos (79,74%) apresentou ausência de apêndice na ponta dos frutos, enquanto 51,89% mostraram ausência de manchas de antocianina no estágio intermediário. O enrugamento da secção transversal dos frutos foi levemente corrugado em 36,7%, corrugado em 35,44% e intermediário em 27,84%. O número de lóculos variou de um a quatro, sendo que a maioria (51,89%) dos acessos apresentou três lóculos. A placenta ocupou  $>1/2$  do comprimento do fruto em 98,73% dos acessos.

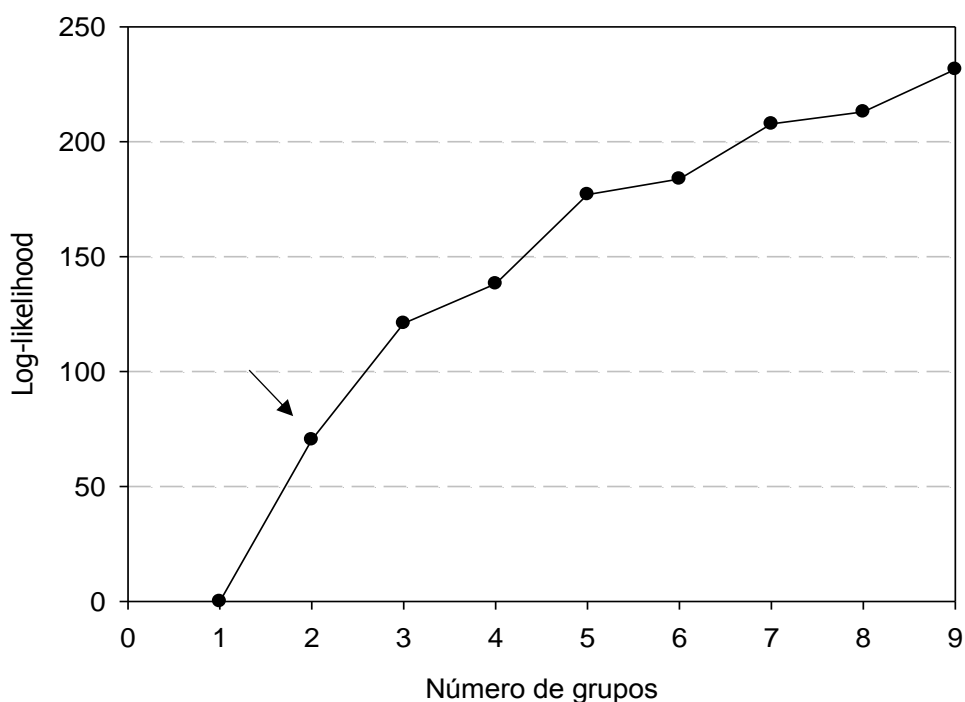
Para os descritores quantitativos, também observou-se uma grande variabilidade. O comprimento do fruto variou de 0,93 a 13,64 cm com média de 5,58 cm. Já o diâmetro do fruto variou de 0,4 a 5,9 cm, com média de 2,48 cm. O peso dos frutos variou de 0,33 a 34,21 cm, com média de 11,14 cm. A última característica observada, foi a espessura do pericarpo, que variou de 0,01 a 0,4 cm, com média de 0,18 cm.

De acordo com a função logarítmica de probabilidade (Log-Likelihood), o número ótimo de grupos foi definido como dois, uma vez que o valor máximo foi atingido nesse ponto (70,3) (Tabela 4; Figura 3).

**Tabela 5** - Número de grupos formados pelo método de Ward-MLM, com base na função logarítmica da probabilidade (Log-Likelihood) e seu incremento

Número de grupos	Log-likelihood	Aumento
1	-798.12	0.00
2	-727.83	<b>70.30*</b>
3	-677.17	50.65
4	-659.94	17.24
5	-621.12	38.82
6	-614.34	6.78
7	-590.34	24.00
8	-585.14	5.20
9	-566.68	18.47

\* Maior incremento



**Figura 3** - Gráfico da função logarítmica de probabilidade (Log-Likelihood), mostrando o número ótimo de grupos para 79 acessos de *C. baccatum*, caracterizados por meio de descritores morfoagronômicos.

No grupo 1 correspondente a 40 acessos (Tabela 5), predominou a cor verde no estágio intermediário (65%), cor vermelha no estágio maduro (87,5%), formato do fruto triangular (37,5%), superfície do fruto lisa (52,5%), ombro do fruto truncado (62,5%), ponta do fruto afundada (40%), apêndice na ponta do fruto ausente (92,5%), ausência de manchas de antocianina (62,5%), enrugamento da secção transversal do fruto do tipo corrugado (47,5%), número de lóculos igual a 3 (55%) e comprimento da placenta maior do que  $\frac{1}{2}$  do comprimento do fruto (Tabela 6).

No grupo 2, correspondente a 39 acessos (Tabela 5), predominou a cor verde no estágio intermediário (56,4%), cor vermelha no estágio maduro (87,5%), formato do fruto alongado (79,4%), superfície do fruto lisa (41%), ombro do fruto obtuso (76,9%), ponta do fruto pontiaguda (79,4%), apêndice na ponta do fruto ausente (66,66%), presença de manchas de antocianina (58,97%), enrugamento da secção transversal do fruto do tipo levemente corrugado (43,58%), número de lóculos igual a 3 (48,7%) e todos os frutos com o comprimento da placenta maior do que  $\frac{1}{2}$  do comprimento do fruto (Tabela 6).

**Tabela 6** - Associação dos 79 acessos de *C. baccatum* em dois grupos, conforme o método de Ward-MLM.

<b>Grupos</b>	<b>Acessos</b>
Grupo 1	UEL102, UEL105, UEL110, UEL112, UEL114, UEL115, UEL116, UEL119, UEL120, UEL121, UEL123, UEL124, UEL125, UEL127, UEL131, UEL133, UEL137, UEL143, UEL144, UEL145, UEL146, UEL147, UEL149, UEL150, UEL152, UEL153, UEL157, UEL158, UEL159, UEL160, UEL161, UEL163, UEL165, UEL166, UEL167, UEL168, UEL169 UEL172, UEL178 e UEL179.
Grupo 2	UEL101, UEL103, UEL104, UEL106, UEL107, UEL108, UEL109, UEL111, UEL113, UEL117, UEL118, UEL122, UEL126, UEL128, UEL129, UEL130, UEL132, UEL134, UEL135, UEL136, UEL138, UEL139, UEL140, UEL141, UEL142, UEL148, UEL151, UEL154, UEL155, UEL156, UEL162, UEL164, UEL170, UEL171, UEL173, UEL174, UEL175, UEL176, e UEL177.

**Tabela 7** - Variáveis qualitativas e número de genótipos por grupo em cada um dos dois grupos (G1 e G2), formados pelo método de Ward-MLM, para 79 acessos de *C. baccatum*.

Variáveis	Grupos	
	G1 (40)	G2 (39)
<b>Cor do fruto no estágio Intermediário</b>		
Amarelo	1	1
Verde	26	22
Laranja	13	16
<b>Cor do fruto no estágio maduro</b>		
Amarelo-limão	-	1
Amarelo-laranja	2	1
Laranja-pálido	-	1
Laranja	2	3
Vermelho	35	33
Vermelho-Escuro	1	-
<b>Formato do fruto</b>		
Alongado	2	31
Redondo	4	1
Triangular	15	7
Campanulado	13	-
Retangular	6	-
<b>Superfície do fruto</b>		
Lisa	21	16
Semirugosa	5	12
Rugosa	1	10
Outro (lisa com estrias)	13	1
<b>Ombro do fruto</b>		
Agudo	-	7
Obtuso	1	30
Truncado	25	2
Cordado	11	-
Lobado	3	-
<b>Formato da ponta do fruto</b>		
Pontiagudo	3	31
Truncado	5	6
Afundado	16	2
Afundado com ponta	12	-
Outro	4	-
<b>Apendice na ponta do fruto</b>		
Ausente	37	26
Presente	3	13
<b>Manchas de antocianina</b>		
Ausente	25	16
Presente	15	23
<b>Enrugamento da secção transversal do fruto</b>		
	12	17
Levemente corrugado	9	13
Intermediário	19	9
Corrugado		
<b>Número de Lóculos</b>		
Um	1	-
Dois	12	15

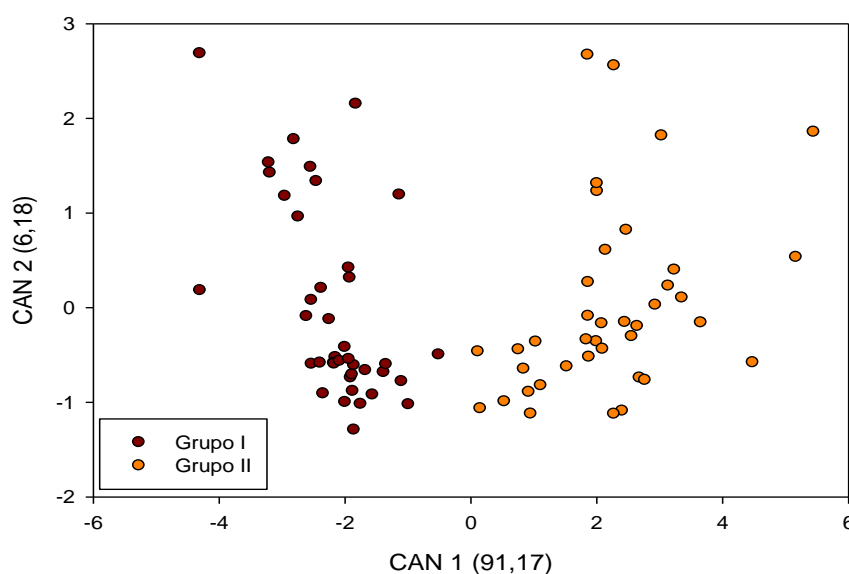
Três	22	19
Quatro	5	5
<b>Comprimento da placenta</b>		
1/4-1/2 comprimento do fruto	1	-
>1/2 comprimento do fruto	39	39

Em relação aos dados dos descritores morfoagronômicos quantitativos (Tabela 7), o grupo 1 obteve a menor média para o comprimento do fruto (3,14 cm) e maiores médias para o peso do fruto (11,41 g), diâmetro do fruto (3 cm) e espessura do pericarpo (0,2 cm). Já o grupo 2 obteve a maior média para o comprimento do fruto (8 cm) e menores médias para o peso do fruto (10,87 g), diâmetro do fruto (1,88 cm) e espessura do pericarpo (0,16 cm).

As duas primeiras variáveis canônicas obtidas pelo procedimento Ward-MLM explicaram 97,35% da variação total (Figura 4), sendo a primeira variável responsável por 91,17% dessa contribuição. Com base na primeira variável canônica (tabela 7), o comprimento do fruto foi o que mais contribuiu para explicar a variabilidade genética encontrada entre os acessos. Já para a segunda variável canônica, o peso do fruto foi a característica mais significativa, com pouca contribuição em relação ao diâmetro do fruto e espessura do pericarpo.

**Tabela 8** - Médias das variáveis quantitativas para cada um dos dois grupos (G1 e G2) formados pelo método Ward-MLM e as duas variáveis canônicas em 79 acessos de *C. baccatum*.

Variáveis	Grupos		CAN1	CAN2
	G1	G2		
Peso do Fruto	11,41	10,87	-0,03	0,99
Comprimento do fruto	3,14	8,09	0,91	0,37
Diâmetro do fruto	3,07	1,88	-0,52	0,66
Espessura do pericarpo	0,20	0,16	-0,25	0,55



**Figura 4** - Dispersão gráfica das duas primeiras variáveis canônicas para os dois grupos formados pela análise Ward-MLM para variáveis quantitativas entre 79 acessos de *C. baccatum*.

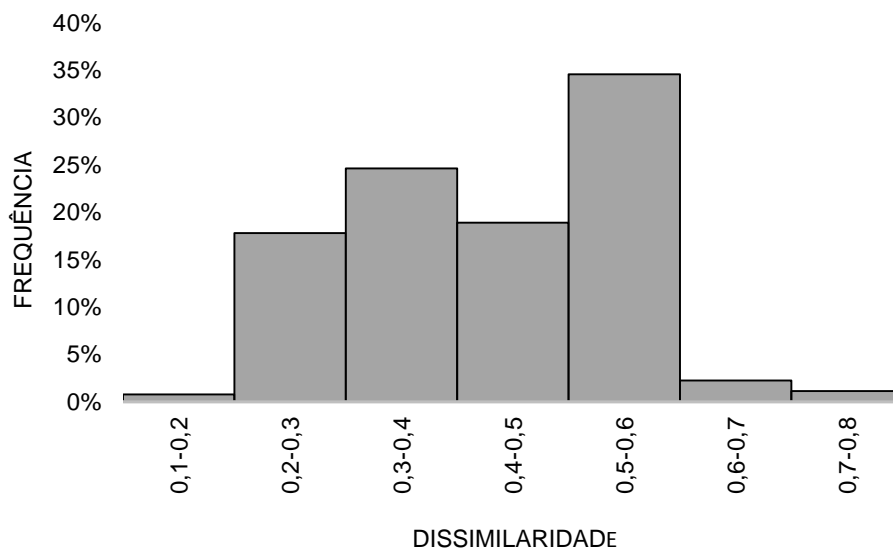
## Caracterização molecular

Seis combinações de *primers* seletivos geraram, sem ambiguidade, um total de 1200 fragmentos de AFLP, distribuídos entre 50 e 500 pb, dos quais, 1122 (93,5%) foram polimórficos. O número de fragmentos polimórficos variou de 68 (*EcoRI*(FAM)-ACA/*MseI*-CAC) a 234 (*EcoRI*(PET)-AGC/*MseI*-CAG), sendo a combinação *EcoRI*(FAM)-ACA/*MseI*-CAC a mais polimórfica, proporcionalmente (Tabela 8).

**Tabela 9** - Combinações de *primers* seletivos de AFLP utilizados, número de fragmentos amplificados, número de fragmentos polimórficos e porcentagem de polimorfismo por primer obtido em 79 acessos de *C. bacatum*.

<b>Combinações de <i>primers</i></b>	<b>Números de fragmentos</b>	<b>Número de fragmentos polimórficos</b>	<b>% de polimorfismo</b>
<i>EcoRI</i> (FAM)-ACA/ <i>MseI</i> -CAC	69	68	98,5%
<i>EcoRI</i> (NED)-AGC/ <i>MseI</i> -CTGA	228	218	95,6%
<i>EcoRI</i> (VIC)-ACT/ <i>MseI</i> -CAA	208	186	93,9%
<i>EcoRI</i> (PET)-AGC/ <i>MseI</i> -CAG	249	234	89,4%
<i>EcoRI</i> (VIC)-ACT/ <i>MseI</i> -CAG	220	204	92,7%
<i>EcoRI</i> (NED)-ACG/ <i>MseI</i> -CTGA	226	212	93,8%
<b>Total</b>	<b>1200</b>	<b>1122</b>	<b>93,5%</b>

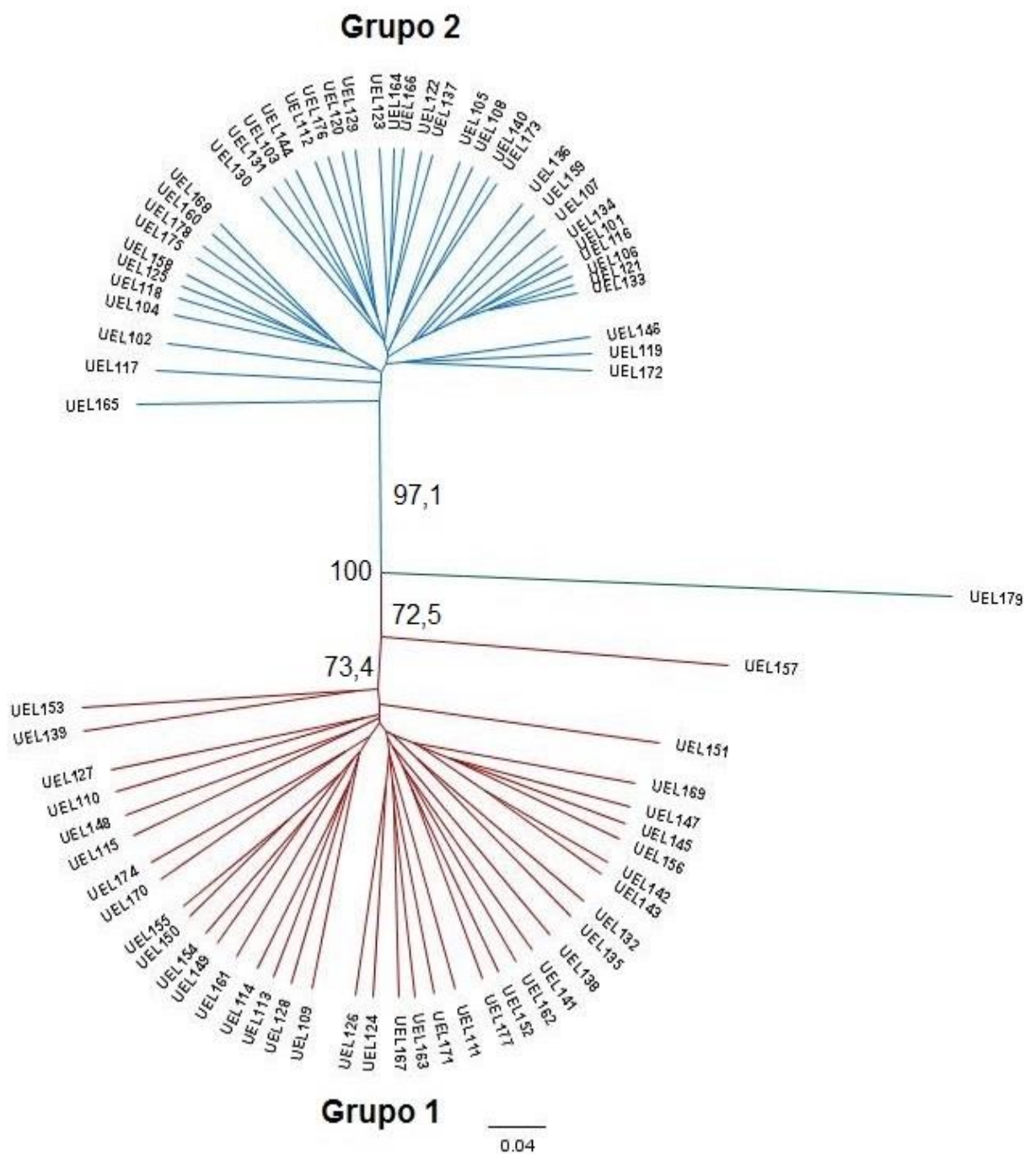
A distância genética média, estimada com base no coeficiente de Jaccard entre os acessos foi de 0,46. As classes que apresentaram distância genética entre 0,5-0,6 e 0,3-0,4 foram as que tiveram maior frequência, com 34,54% e 24,61%, respectivamente (Figura 5). A menor distância genética foi de 0,14, entre os acessos UEL101 e UEL116, UEL106 e UEL121 e UEL106 e UEL133. A maior distância foi de 0,75, entre os acessos UEL177 e UEL179. O dendrograma, obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, identificou a formação de dois grandes grupos, com a clara separação do acesso UEL179 (Figura 6).



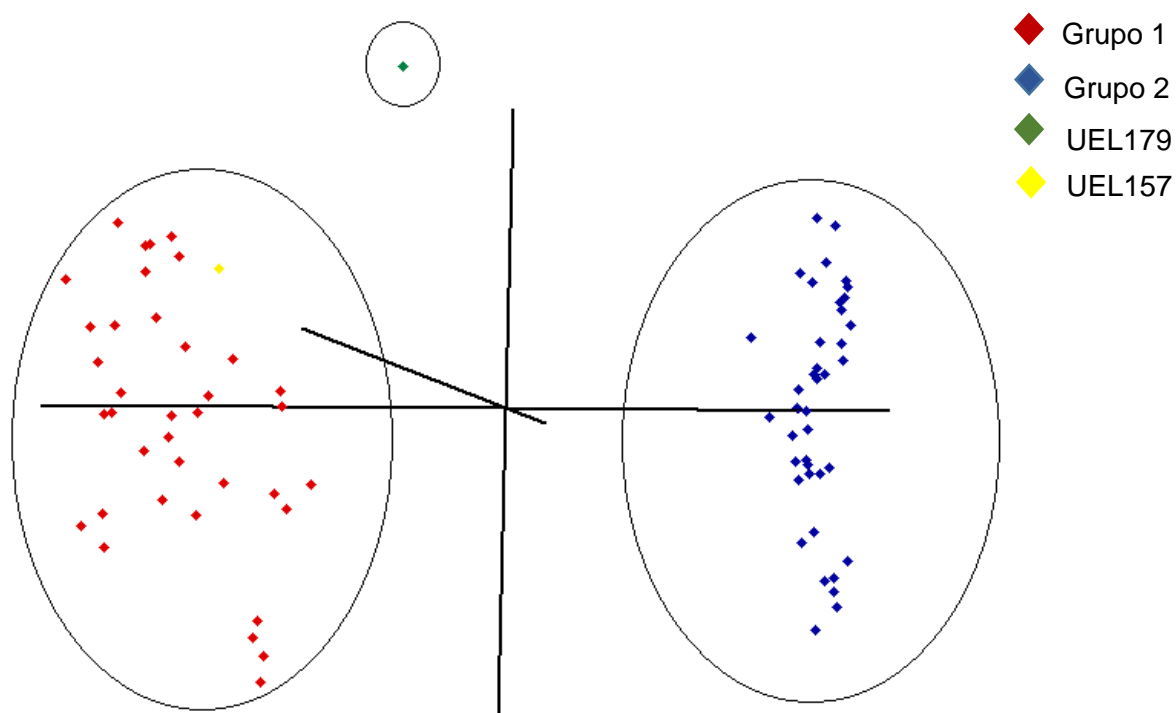
**Figura 5** - Frequência da distribuição de dissimilaridade, com base nos marcadores AFLP entre 79 acessos de *C. bacatum*.

O grupo 1 foi formado por 38 representantes (Figura 6), incluindo acessos provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Goiás, Paraná, Mato Grosso, Piauí, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e um representante do Peru (Tabela 1). Já o grupo 2, associou 39 acessos (Figura 6), incluindo aqueles provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso, Pará, Rio de Janeiro, Paraná e Mato Grosso do Sul (Tabela 1). Já. O acesso UEL157 aparece associado próximo ao grupo 1 enquanto o acesso UEL179 ocorre isolado entre os dois grupos (Figura 6).

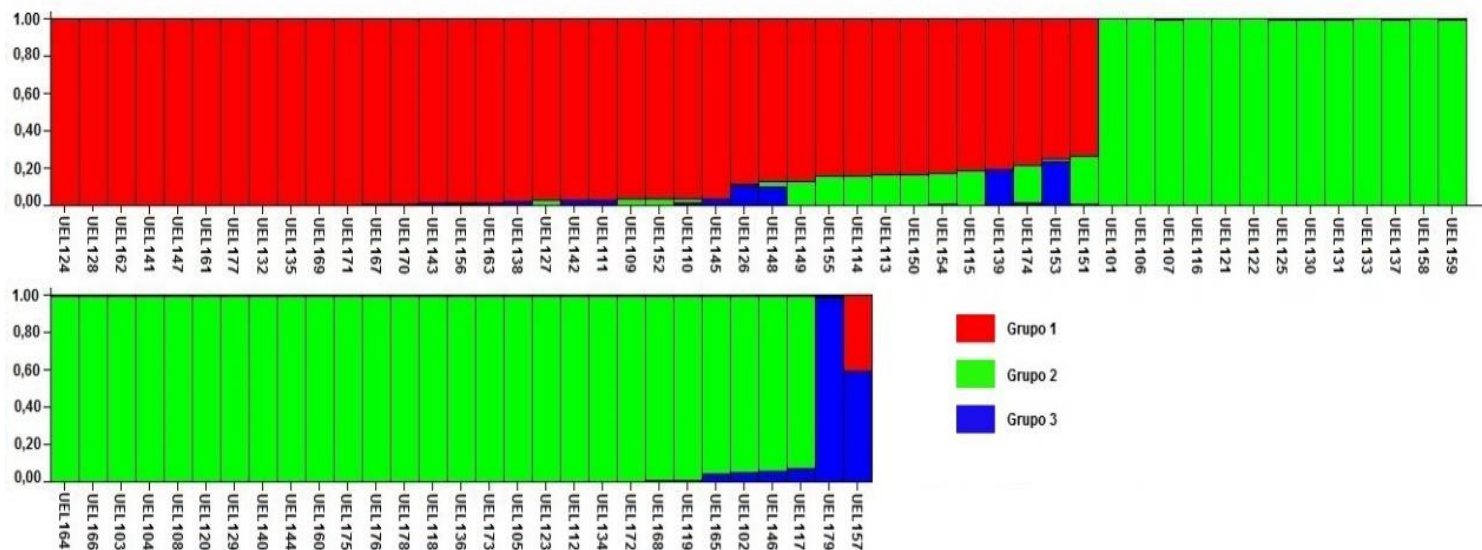
A análise da coordenada principal (PCoA) também evidencia claramente a formação dos dois grupos, com a separação do acesso UEL179 (Figura 7). Os eixos X, Y e Z explicaram 53,58% da variabilidade encontrada entre os acessos de *C. bacatum* (42,52%, 5,82% e 5,24%, respectivamente). A estimativa do número de possíveis agrupamentos, obtida por meio de abordagem Bayesiana, identificou um valor de  $K = 3$ , evidenciando a formação de três grupos (Figura 8). Os acessos alocados nos grupos 1 e 2 do agrupamento UPGMA (Figura 6), foram correspondentes com os mesmos (grupo 1 e 2) do agrupamento Bayesiano (Figura 8), enquanto os acessos UEL157 e UEL179 formam o terceiro grupo.



**Figura 6** - Dendrograma com base no agrupamento UPGMA de 79 acessos de *C. baccatum* por meio da distância de Jaccard para os dados moleculares de AFLP.



**Figura 7** - Análise da Coordenada principal (PCoA) de 79 acessos de *C. baccatum*, conforme distância genética de Jaccard, explicando 53,58% da variabilidade.



**Figura 8** - Agrupamentos (K=3) formados segundo a análise bayesiana para os 79 acessos de *C. baccatum*. As três cores representam os três diferentes grupos. O percentual estimado de participação de cada acesso em um grupo é demonstrado no eixo y.

## DISCUSSÃO

A análise de acessos contidos em bancos de germoplasma é uma importante estratégia para a conservação e o manejo correto dos recursos genéticos. Estudos em coleções de germoplasma, envolvem a caracterização morfológica e a caracterização molecular, que possibilita identificar a variabilidade genética contida na coleção com maior precisão e confiabilidade, bem como determinar o grau de relação entre os genótipos, gerando informações importantes para planejamento dos programas de melhoramento.

### Caracterização morfológica

Na caracterização morfológica observou-se uma ampla variedade para os descritores morfológicos do fruto propostos pelo IPGRI (1995). A variabilidade de cores, formatos e a utilização de novas classes de descrição, que não estavam propostas na lista de descritores original (Ex: superfície do fruto e formato da ponta do fruto), evidenciaram a enorme variabilidade fenotípica existente nos frutos dos acessos de *C. baccatum*. Alguns acessos (ex. UEL139 e UEL157) apresentaram ainda, mais de uma coloração antes de alcançar o estágio maduro. Os resultados encontrados corroboram com aqueles relatados no trabalho de Sudré et al (2010), onde alguns acessos de *Capsicum* spp. apresentaram mais de seis diferentes cores no estágio imaturo.

A ampla variabilidade fenotípica existente em espécies do gênero *Capsicum* já vem sendo reportada em estudos com *C. chinense* (BABA et al, 2015; FONSECA et al, 2008), *C. annuum* (GELETA et al, 2005) e *C. baccatum* (ALBRECHT et al, 2012b; LEITE et al, 2016). Possivelmente, a variabilidade morfológica observada em *C. baccatum* reflete a ampla distribuição geográfica da espécie, aonde condições climáticas e ambientais específicas possibilitaram a seleção de genótipos mais adaptados às condições locais (BOSLAND e VOTAVA, 1999; ALBRECHT et al, 2012b).

O método de Ward-MLM, para a análise conjunta das características qualitativas e quantitativas, permitiu a separação dos acessos em dois grandes grupos (grupos 1 e 2), vem sendo utilizado com eficiência para a análise de características morfoagronômicas em culturas como o feijão (BARBÉ et al,

2010), goiaba (CAMPOS et al, 2013) e tomate (GONÇALVES et al, 2009) e também para o gênero *Capsicum* (SUDRÉ et al, 2010; BABA et al, 2015)

Nossos resultados mostraram que alguns descritores foram essenciais para a distinção entre os grupos 1 e 2, principalmente o formato do fruto, corroborando com o trabalho de Baba et al (2015), onde este descritor também foi essencial para a separação de acessos *C. chinense* em três grupos. Algumas características diretamente ligadas ao formato do fruto, como o ombro e o formato da ponta do fruto, também foram essenciais para a separação dos dois grupos. As características quantitativas também contribuíram para formação dos dois agrupamentos, alocando acessos com frutos de maior comprimento no grupo 2, onde o formato do fruto era alongado.

Conhecer a variedade fenotípica dos frutos é essencial para a sua aplicação em programas de melhoramento genético. Os acessos de *C. baccatum* que apresentaram como característica a presença de frutos de maior comprimento e de formato alongado, podem ser aplicados em programas de melhoramento da pimenta dedo-de-moça. É o caso, por exemplo, dos acessos, UEL102, UEL113, UEL120, UEL122, UEL137, UEL147, UEL156 e UEL163 (Figura 2). A pimenta dedo-de-moça é amplamente apreciada no Brasil, principalmente no Sul e Sudeste (NEITZKE et al, 2008), devido ao grau intermediário de pungência, sendo geralmente consumida *in natura*, em molhos, conservas e desidratadas, como é o caso da pimenta calabresa (LOPES et al, 2007). Já os acessos com formato de frutos campanulado (UEL116, UEL121, UEL134, UEL149, UEL150, UEL155, UEL159 e UEL161) são característicos da pimenta Cambuci ou Chapéu-de-Frade, a qual apresenta uma pungência suave e em alguns casos, doce, sendo também bastante apreciada na culinária, para uso em saladas e cozidos (LOPES et al, 2007).

Ainda, outros acessos (UEL117, UEL119, UEL125, UEL139, UEL157 e UEL153) apresentaram porte pequeno e frutos em diferentes colorações no processo de maturação. Essas características são atrativas e muito apreciadas para uso decorativo. Segundo Pickersgill (1971) e Bosland (1993) as pimenteiras ornamentais geralmente tem de 30 a 50cm de altura e são utilizadas para a decoração de ambientes. Entretanto, no Brasil existem poucas variedades ornamentais conhecidas, embora os bancos de germoplasma possuam muitos acessos com esse potencial (NEITZKE et al, 2010). Portanto,

os acessos portadores destas características mostram potencial para uso em programas voltados para o desenvolvimento de variedades de pimentas ornamentais.

Na análise das variáveis canônicas, as duas primeiras variáveis explicaram grande parte da variação total (97,35%). Valores similares foram encontrados nos estudos de Sudré et al (2010) (90,5%), Régo et al (2011) (81,84%) e Baba et al (2015) (92,2%), esses valores, também foram encontrados para as duas primeiras variáveis canônicas. O alto valor encontrado, indica que a representação gráfica é adequada para demonstrar a relação entre os dois grupos formados, bem como entre os acessos dentro desses grupos (SUDRÉ et al, 2010). Assim como em nosso estudo, Baba et al (2015) demonstraram que o comprimento do fruto também contribuiu de forma significativa para a primeira variável canônica, enquanto que o peso e o diâmetro do fruto, ficaram correlacionados com a segunda variável.

#### Caracterização molecular

As altas porcentagens de polimorfismo geradas pelas combinações de *primers* de AFLP demonstram que esses marcadores são altamente eficientes para identificar polimorfismos entre os acessos de *C. baccatum*. Resultados semelhantes foram encontrados nas análises desenvolvidas para as espécies *C. baccatum* e *C. anuumm*, conforme relatado por Krishnamurthy et al (2015), onde os autores encontraram uma porcentagem de 93,96% para os marcadores AFLP. Em contraste, o nível de polimorfismo encontrado em nossos resultados foi superior em comparação com aqueles encontrados por Albrecht et al (2012a) e Ibiza et al (2012). Os autores encontraram, respectivamente, uma porcentagem de polimorfismo de 67% e 42,5%, para acessos de *baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum*, originados de diferentes coleções. Esses dados enfatizam a importância de estudos voltados para as análises genéticas das coleções mantidas em bancos de germoplasma.

O dendrograma gerado a partir dos dados de AFLP, separaram os acessos em dois grandes grupos (Figura 6), corroborando com os dados fornecidos pela análise da coordenada principal (Figura 7) e pela análise

Bayesiana (Figura 8). Nesta última, o acesso UEL157, ficou alocado com o acesso UEL179, sugerindo uma maior proximidade genética entre esses acessos. O acesso UEL157 possui características ornamentais e devido a sua maior distância com os demais acessos e proximidade com o UEL179, pode apresentar interessantes características que podem ser exploradas no desenvolvimento de variedades ornamentais. Já o acesso UEL179 pode ser uma potencial fonte de genes de resistência à doenças, visto que é uma variedade silvestre da espécie *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *praetermissum*) (BIANCHETTI e CARVALHO, 2005).

Os acessos associados em cada um dos grupos gerados pelos marcadores AFLP revelaram uma grande variabilidade genética, não sendo possível identificar uma relação com os descritores morfoagronômicos do fruto. Resultados semelhantes foram encontrados por Baba et al (2015) em *C. chinense*. O acesso UEL179 (*C. baccatum* var. *praetermissum*) aparece isolado entre os dois grupos, apresentando uma distância média de 0,70 com os demais acessos. Nossos dados corroboram com os encontrados por Albrecht et al (2012a), onde esta variedade também agrupou distante de outras variedades de *C. baccatum*. No mesmo trabalho os autores citam que a separação de *C. baccatum* var. *praetermissum* é muito mais evidente do que para outras variedades de *C. baccatum*, como por exemplo a variedade silvestre *C. baccatum* var. *baccatum*. Ainda o trabalho realizado por Ibiza et al (2012), mostra que a variedade *C. baccatum* var. *praetermissum* agrupou de forma distinta, podendo ser considerada como uma espécie diferente. O alto valor de bootstrap (100%), encontrado em nosso trabalho, confirma esta informação.

Nossos resultados demonstraram ausência de relação entre a distância genética, estimada a partir dos dados de AFLP, e a origem geográfica entre os acessos avaliados. Esse resultado corrobora com os trabalhos realizados com a espécie *C. chinense* (FINGER et al, 2010; BABA et al, 2015) e *C. anuumm* (SREELATHAKUMARY e RAJAMONY, 2004). Baral e Bosland (2002) citam que muitas vezes, acessos provenientes de coleções de germoplasma são obtidos em mercados, feiras e até mesmo em propriedades familiares. Assim, é difícil afirmar a real origem geográfica desses acessos, o que explicaria, pelo

menos em parte, a ausência de relação entre distância genética e a origem geográfica.

Assim como as outras espécies domesticadas do gênero, *C. baccatum* é predominantemente autógama. Entretanto, estudos realizados por Albrecht et al (2012b) demonstraram introgressão de caracteres morfológicos entre variedades botânicas e ainda, que formas selvagens e domesticadas são interférteis, evidenciando a existência de fluxo gênico em populações naturais da espécie. O fluxo gênico pode também ser causado por agentes de polinização e dispersão naturais, como insetos e o vento (BREESE, 1989; BABA et al, 2015). Tewksbury (2001) cita ainda, a importância dos pássaros no processo de dispersão de sementes de pimenta a curtas distâncias entre diferentes regiões. O autor argumenta que os pássaros, por não apresentarem sensibilidade a capsaicina, facilitam a dispersão das sementes do gênero *Capsicum*. Todavia, enquanto o processo de domesticação e cultivo limita o fluxo gênico, identificamos altos níveis de variabilidade entre os acessos possivelmente, decorrente a mistura de material genético contido no banco de germoplasma e, que tem origem a partir de amostras resultantes do intenso intercâmbio de sementes e frutos de *C. baccatum* entre agricultores.

Nos estudos de diversidade genética com marcadores AFLP e de eco geografia, realizados por Albrecht et al (2012a) e Albrecht et al (2012b), outro importante ponto é ilustrado. Os autores identificaram a separação de acessos de *C. baccatum* em dois grandes grupos, de acordo com suas origens geográficas (oriental e ocidental). O grupo oriental correspondeu a acessos com origem no Brasil e leste da Argentina e Paraguai. Já o ocidental, agrupou acessos provenientes do Peru, Colômbia, Chile, Bolívia e oeste da Argentina. Notou-se que o pool genético dessas duas áreas é homogêneo e provavelmente essa separação foi causada por isolamento por distância. Sugeriu-se, portanto, que *C. baccatum* teve diferentes origens de domesticação, evoluindo em duas linhas principais (oriental e ocidental). Em nosso estudo, todos os acessos (com exceção do UEL148, que tem origem no Peru), são provenientes da zona oriental, podendo explicar a ausência de relação entre as associações verificadas pelos dados genéticos e origem geográfica. Por outro lado, a alta variabilidade genética encontrada, pode ter

relação com a procedência dos acessos a partir da zona oriental, considerada como um dos centros de diversificação da espécie *C. baccatum*. Segundo Bernal et al (2007), o centro de diversidade de uma espécie é caracterizado como tendo uma elevada variabilidade genética.

A falta de associação, observada entre os agrupamentos identificados pela caracterização morfoagronômica e molecular, mostram que as duas análises se complementam e são necessárias para a boa caracterização de um banco de germoplasma, conforme já demonstrado por Islam et al (2011), Potokina et al (2012), Baba et al (2015) e Leite et al (2016). A análise combinada de dados morfoagronômicos e moleculares adiciona informações importantes referentes à base genética contida nos acessos analisados, evidenciando que a coleção conserva grande potencial como fonte de genes de interesse. Os resultados obtidos podem ser utilizados para aumentar a eficiência dos procedimentos voltados para a conservação e manejo do banco de germoplasma de *C. baccatum*.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados comprovaram a eficiência da utilização concomitante dos descritores morfoagronômicos do fruto e dos marcadores AFLP, em identificar a variabilidade genética existente entre 79 acessos de *C. baccatum*, demonstrando que o banco de germoplasma analisado é altamente representativo da base genética da espécie, com grande potencial como fonte de genes para ser utilizado em programas de melhoramento genético.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBRECHT, E; ZHANG, D; MAYS, A. D; SAFTNER, R. A; STOMMEL, J. R. Genetic diversity in *Capsicum baccatum* is significantly influenced by its ecogeographical distribution. **BMC Genetics**. v. 13, n. 68, p. 1-12, 2012b.

BABA, V. Y; ROCHA, K. R; GOMES, G. P; RUAS, C. F; RUAS, P. M; RODRIGUES, R; GONÇALVES, L. S. A. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genet Resource Crop Evolution**. p. 1-11, 2015.

BARAL, J; BOSLAND, P. W. Genetic diversity of a *Capsicum* germoplasm 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.

BARBÉ, T. C; AMARAL JÚNIOR, A. T; GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; SCAPIM, C. A. Association between advanced generations and genealogy in inbred lines of snap bean by the Ward-Modified Location Model. **Euphytica**, v. 173, n. 3, p. 337-343, 2010.

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, p. 863–871, 2005.

BASU, K. S; DE, A. K. *Capsicum*: historical perspectives. In: **Capsicum: The genus Capsicum**. Ed. Amit Krishna De, 2003.

BESPALHOK, C. F; GUERRA, E. P; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F; GUERRA, E. P; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de plantas**, 2007.

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

BOSLAND P. W. Breeding for quality in *Capsicum*. **Capsicum Eggplant News**. v.12, p.25–31, 1993.

BOSLAND, P. W; VOTAVA, E. **Peppers: Vegetable and Spice Capsicum**. Oxford, UK: CABI Publishing; 1999.

BREESE, L. Multiplication and regeneration of germoplasm. In: STALKER, H. T.; CHAPMAN, C. (Ed) Scientific Management of Germoplasm. **Characterization, Evolution and Enhancement**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, p.17-22. 1989.

CAMPOS, B. M; VIANA, A. P; QUINTAL, S. S. R; GONÇALVES, L. S. A; PESSANHA, P. G. Quantificação da divergência genética entre acessos de goiabeira por meio da estratégia Ward-MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 35, n. 2, p. 87-94, 2013.

CHHAPEKAR, S; KEHIE, M; RAMCHIARY, N. Advances in Molecular Breeding of *Capsicum* Species. **Biotechnological Tools for Genetic Resources**, p. 233–274, 2016.

D'ARCY, W. G; ESHBAUGH, W. H. New World peppers (*Capsicum*–Solanaceae) north of Colombia: a resume. **Baileya**. v.19, 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, 336p, 2006.

DOMENICO, C. I; COUTINHO, J. P; GODOY, H. T; MELO, A.M.T. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira**. v. 30, p. 466-472, 2012.

DOYLE, J. J; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p. 13-15, 1987.

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

EVANNO, G; REGNAUT, S; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. v. 14, p. 2611–2620, 2005.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2008.

FINGER, F. L; LANNES, S. D; SCHUELTER, A. R; DOEGE, J; COMERLATO, A. P; GONÇALVES, L. S. A; FERREIRA, F. S. 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.

FRANCO, J; CROSSA, J; VILLASENÖR, J; TABA, S; EBERHART, S. A. Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. **Crop Science**. n. 38, p.1688-1696, 1998.

GELETA, L. F.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiversity and Conservation**. v.14, n. 10, p. 2361- 2375, 2005.

GILBERT, J. F; LEWIS, R. V. WILKINSON, M. J; CALIGARI, P. D. S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 98, p. 1125-1131, 1999.

GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; AMARAL, J; KARASAWA, M; SUDRE, C. P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**. v. 7, p. 1289–1297, 2008.

GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; AMARAL JÚNIOR, A. T; KARASAWA, M; SUDRÉ, C. P. Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data, using a Ward-modified location model. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 364-374, 2009.

GOVINDARAJAN, V. S; SALZER, U. J. *Capsicum* — production, technology, chemistry, and quality — part II. Processed products, standards, world production and trade. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 23, p. 207 – 288, 1986.

GOWER J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**. v. 27, p. 857-871, 1971.

HUBISZ, J. M; FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**. v. 9, p. 1322-1332, 2009.

HUNZIKER, A. T. Estudios sobre Solanaceae. I. Sinopsis de las especies silvestres de *Capsicum* de Argentina y Paraguay. **Darwiniana**. v. 9, p. 225–247, 1950.

IBIZA, V. P; BLANCA, J; CANIZARES, J; NUEZ, F. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 9, p. 1077–1088, 2012.

IPGRI. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Roma: IPGRI. 51p, 1995.

ISLAM, M. M; HOQUE, M. E; RABBI, S. M. H. A; ALI, M. S. DNA Fingerprinting and Diversity Analysis of BRRI Hybrid Varieties and their Corresponding Parents. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v. 21, n. 2, p. 189-198, 2011.

KRISHNAMURTHY, S. L; PRASHANTH, Y; RAO, A. M; REDDY, K. M; RAMACHANDRA, R. Assessment of AFLP marker based genetic diversity in chilli (*Capsicum annuum* L. e *Capsicum baccatum* L.). **Indian Journal of Biotechnology**. v. 14, p. 49-54, 2015.

LEITE, P. S. S; RODRIGUES, R; SILVA, R. N. O; PIMENTA, S; MEDEIROS, A. M; BENTO, C. S; GONÇALVES, L. S. A. Molecular and agronomic analysis of intraspecific variability in *Capsicum baccatum* var. *pendulum* accessions. **Genetics and Molecular Research**. v. 15, n.4, p. 1-16, 2016.

LOPES, C. A.; RIBEIRO, C. S. C.; CRUZ, D. M. R.; FRANÇA, F. H.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; HENS, G. P.; SILVA, H. R.; PESSOA, H. S.; BIANCHETTI, L. B.; JUNQUEIRA, N. V.; MAKISHIMA, N.; FONTES, R. R.; CARVALHO, S. I. C.; MAROUELLI, W. A.; PEREIRA, W. **Pimenta (Capsicum spp.)**. Embrapa Hortaliças. Sistema de produção 2. Versão eletrônica, nov. 2007. Disponível em: [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/botanica.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/botanica.html). Acesso em: 01 de fev. 2017

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M. R; CONFORTI, F; STATTI, G; CINDIO, B. DE; HOUGHTON, P. J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**. v.114, p. 553–560, 2009.

NEITZKE, R. S; BARBIERI, R. L; HEIDEN, G; CASTRO, C. M. Divergência genética entre variedades locais de *Capsicum baccatum*, utilizando caracteres multicategóricos. **Magistra**. v. 20, n. 3, p.249-255, 2008.

NEITZKE, R. S; BARBIERI, R. L; RODRIGUES, W. F; CORRÊA, I. V; CARVALHO, F. I. F. de. Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. **Horticultura brasileira**. v. 28, n. 1, p. 47-53, 2010.

NICOLAI, M; CANTET, M; LEFEBVRE, V; PALLOIX, A. M. S; PALLOIX, A. 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.

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

POTOKINA, E.K; ALEKSEEVA, E.A., LYSENKO, N.S; EGGI, E.E. Genetic Diversity of Russian Advanced Wheat Cultivars Revealed With SSR Markers. **Journal of Stress Physiology e Biochemistry**. v. 8, 2012.

RÉGO, E. R; FINGER, F. L; NASCIMENTO, N. F. F; ARAÚJO, E. R; SAPUCAY, M. J. L. C. Genética e melhoramento de pimenteiras. In: RÉGO; E. R. FINGER, F. L. RÉGO, M. M. (Org.). **Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.)**. 1 ed. Recife - PE: Imprima, v. 1, p. 117-136, 2011.

REIFSCHNEIDER, F. J. B. ***Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000.

SAS Institute. **SAS Online DOC**. Version 8. SAS Institute Inc., 2000.

SCHLUTER, P. M; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology**. v. 6, p. 569-572, 2006.

SREELATHAKUMARY, I; RAJAMONY, L. Genetic divergence in chilli (*Capsicum annum* L.). **Indian Journal Horticulture**. v. 61, p. 137–139, 2004.

SUDRE, C. P; GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; AMARAL JÚNIOR, A. T. do; RIVA-SOUZA, E. M; BENTO, C do 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.

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

VOS, P; HOGERS, R; BLEEKER, M; REIJANS, M; LEE, T; HORNES, M; FRIGTRS, A; POT, J; PELEMAN, J; KUIPER, M; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleics Acids Research**. v. 33, p. 4407-4414, 1995.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABCSEM - Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes. **Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças**, 2009. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>. Acesso em: 10 nov, 2016.

ADENIJI, O. T; KUSOLVA, P; REUBEN, S. W. O. M. Morphological descriptors and microsatellite diversity among scarlet eggplant groups. **African Crop Science Journal**. v. 21, n. 1, p. 37 - 49, 2013.

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

ALMEIDA, C. M. C. V. de; DIAS, L. A. S; OKABE, E. T; MEDEIROS, J. R. P. Variability in genetic resources of cacao in Rondônia, Brazil, **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v. 5, p. 318-324, 2005.

BABA, V. Y; ROCHA, K. R; GOMES, G. P; RUAS, C. F; RUAS, P. M; RODRIGUES, R; GONÇALVES, L. S. A. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genet Resourse Crop Evolution**. p. 1-11, 2015.

BARBOSA, R. I; LUIZ, F.J.F; NASCIMENTO, FILHO. H. R; MADURO, C. B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira: Espécies domesticadas. **Acta Amazônica**. 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, p. 863–871, 2005.

BASU, K. S; DE, A. K. *Capsicum*: historical perspectives. In: **Capsicum: The genus Capsicum**. Ed. Amit Krishna de, 2003.

BEDUHN F. A. **Crescimento e fotossíntese em *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum frutescens* L.** Tese de doutorado - Universidade Federal de Pelotas, RS, 2010.

BERED, F; NETO, J. F. B; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**. v. 27, n.3, p. 513-50, 1997.

BERGER, A; HENDERSON, M; NADOOLMAN, W; DUFFY, V; COOPER, D; SABERSKI, M. D; BARTOSHUK, L. Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy/radiation therapy. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 10, p. 243-248, 1996.

BESPALHOK, C. F; GUERRA, E. P; OLIVEIRA, R. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F; GUERRA, E. P; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de plantas**, 2007.

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

BLOCK G; LANGSETH L. Antioxidant vitamins and disease prevention. **Food Technology**. v. 48, p. 80-84, 1994.

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Editora Alaúde, 2007.

BOSLAND P. W. Breeding for quality in *Capsicum*. **Capsicum Eggplant News**. v.12, p.25–31, 1993.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microsatélites em Espécies Vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 7, p 46-50, 2003.

CARVALHO, C. G. P; ARIAS, C. A. A; TOLEDO, J. F. F; ALMEIDA, L. A; KIIHL, R. A. S; OLIVEIRA, M. F. Interação genótipo x ambiente no desempenho produtivo da soja no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 7, p. 989-1000, 2002.

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

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

CARVALHO, J. M. F. C; SILVA, M. M. A; MEDEIROS, M. J. L. A Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais. **Embrapa Algodão**, 2009.

CASALI, V. W. D; COUTO, F. A. A. Origem e botânica de *Capsicum*. **Informe Agropecuário**. v. 10, n. 11, p. 8-10, 1984.

CHHAPEKAR, S; KEHIE, M; RAMCHIARY, N. Advances in Molecular Breeding of *Capsicum* Species. **Biotechnological Tools for Genetic Resources**, p. 233-274, 2016.

CICHEWICZ, R. H.; THORPE, P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, p. 61-70, 1996.

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

DE, A. K. ***Capsicum: The genus Capsicum***. Ed. Amit Krishna De, 2003.

DEWITT D, BOSLAND PW. **Peppers of the world: na identification guide**. Ten Speed press, Bekerley, 1996

DEWITT, D; BOSLAND, P. W. **The complete Chile Pepper Book. A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking**. Timber Press. Portland London, 336p, 2006.

DJIAN-CAPORALINO, C; LEFEBVRE, V; SAGE-DAUBE`ZE, A. M; PALLOIX, A. *Capsicum*. In: SINGH, R. J; JAUHAR, P. P (eds). **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement**. v. 3, p. 186–245, 2007.

DOMENICO, C. I; COUTINHO, J. P; GODOY, H. T; MELO, A.M.T. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira**. v. 30, p. 466-472, 2012.

DUTECH, C; ENJALBERT, J; FOURNIER, E; FRANÇOIS, D; BARRES, B; CARLIER, J; THARREAU, D; GIRAUD, T. Challenges of microsatélite isolation in fungi. **Fungal Genetics and Biology**. v. 44, p. 933-949, 2007.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. **Potato and pepper research group**. 2007. Disponível em: [www.cpact.embrapa.br](http://www.cpact.embrapa.br). Acesso em: 10 de Set, 2016.

ENGELMANN, F; ENGELS, J. M. M. Technologies and Strategies for *ex situ* Conservation. In: ENGELS, J. M. M; RAO, R; BROWN, A. H. D; JACKSON, M. T. **Managing plant genetic diversity**. IPGRI, 2002.

ESHBAUGHT, 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 chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. v. 102, p. 396–403, 1976.

FALEIRO, F. G; LOPES, U. V; YAMADA, M. M; PIRES, J. L; BAHIA, R. C. S; SANTOS, R. S; GOMES, L. M. C; ARAUJO, I. S; FALEIRO, A. S. G; GRAMACHO, K. P; MELO, G. R. P; MONTEIRO, W. R; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Treobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microsatélites. **Agrotrótipa**. v. 13, p. 79-86, 2001.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2008.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014. **Agricultural production**. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org>. Acesso em: 10 de Jan, 2017

FEDERIZZI, L.C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In: FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Embrapa - Cenargen, Brasília, 3 ed, 220p, 1998.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Embrapa – Cenargen. Brasília, 3 ed, 220p, 1998.

FERREIRA, M. E. Genotipagem de coleções de germoplasma vegetal. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L.; RIBEIRO JUNIOR, W.Q. **Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios**. Embrapa Cerrados. Embrapa Informação Tecnológica, p. 75-89, 2008.

FORD-LLOYD, B. V; JACKSON, M. T. Biotechnology and methods of conservation of plant genetic resources. **Journal of Bzotechnology**. v. 17, p. 247-256, 1991.

GELETA, L. F.; LABUSCHAGNE, M. T.; VILJOEN, C. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiversity and Conservation**. v.14, n. 10, p. 2361- 2375, 2005.

GILBERT, J. F; LEWIS, R. V. WILKINSON, M. J; CALIGARI, P. D. S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 98, p. 1125-1131, 1999.

GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; AMARAL, J; KARASAWA, M; SUDRE, C. P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**. v. 7, p. 1289–1297, 2008.

GOVINDARAJAN, V. S; SALZER, U. J. *Capsicum* — production, technology, chemistry, and quality — part II. Processed products, standards, world production and trade. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 23, p. 207 – 288, 1986.

GUERRA, N. A. Estudios cromosómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. **Revista UDO Agrícola**. v. 1, n. 1, p. 34-41. 2001.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health. **Food Technology**. v. 52, p. 63-69, 1998.

HUNZIKER, A. T. Estudios sobre Solanaceae. I. Sinopsis de las especies silvestris de *Capsicum* de Argentina y Paraguay. **Darwiniana**. v. 9, p. 225–247, 1950.

HUNZIKER, A. T. Estudios Sobre Solanaceae. VII. Contribucion al conocimiento de *Capsicum* y generos afines (*Witheringia*, *Achnistus*, *Athenaea*, etc.), Tercera Parte. **Kurtziana**. v. 6, p. 241–259, 1971.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system**, 2001.

IBIZA, V. P; BLANCA, J; CANIZARES, J; NUEZ, F. Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 9, p. 1077–1088, 2012.

IPGRI. **Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.)**. Roma: IPGRI. 51p, 1995.

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

ISLAM, M. M; HOQUE, M. E; RABBI, S. M. H. A; ALI, M. S. DNA Fingerprinting and Diversity Analysis of BRRI Hybrid Varieties and their Corresponding Parents. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v. 21, n. 2, p. 189-198, 2011.

KOCHIEVA, E. Z; RYZHOVA, N. N. Molecular AFLP Analysis of the Genotypes of Pepper *Capsicum annuum* Cultivars. **Russian Journal of Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1345–1348, 2003.

KUMAR, P; GUPTA, V; MISRA, A; MODI, D; PANDEY, B. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. **Journal of Plant Molecular Biology & Omics**. v. 2 n. 4, p. 141-62, 2009.

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

LATHAM, M. C. Human nutrition in the developing world. **FAO collection 29**. FAO, Rome, 2002.

LUTSENKO, E. A; CARCAMO, J. M; GOLDE, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 16895–16899, 2002

MACNEISH. R. S. Ancient Mesoamerican civilization. **Science**. v. 143, p. 531-537, 1964.

MCCARTHY, G. M., MCCARTY, D. J. Effect of topical capsaicin in the therapy of painful osteoarthritis of the hands. **Journal of Rheumatology**. v. 19, p. 604–60, 1992.

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

MENICHINI, F; TUNDIS, R; BONESI, M; LOIZZO, M. R; CONFORTI, F; STATTI, G; CINDIO, B. DE; HOUGHTON, P. J; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**. v.114, p. 553–560, 2009.

MILACH, S. C. K. Principais Tipos de Marcadores Moleculares e suas Características. In MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre. UFRGS, p 17-28, 1998.

MOREIRA, G. R.; CALIMAN, F. R. B.; SILVA, D. J. H.; RIBEIRO, C. S. C. Espécies e variedades de pimenta. **Informe Agropecuário**. v. 27, n. 235, p. 16-29, 2006.

NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 1183p, 2001.

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

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. C. **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. Linnaean Society Symposium Series Number 7. Academic Press, London, 1979.

PINEDA, O. C.; TAPIA, L.W.T.; PACHECO, L. C. G; MARTÍN; F. C.; ESTRADA, T.G; SÁNCHEZ, S. R. P. Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**. v. 104, n. 4, p. 1755-1760, 2007.

POTOKINA, E.K; ALEKSEEVA, E.A., LYSENKO, N.S; EGGI, E.E. Genetic Diversity of Russian Advanced Wheat Cultivars Revealed With SSR Markers. **Journal of Stress Physiology e Biochemistry**. v. 8, 2012.

POZZOBON, M.T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.E.; BIANCHETTI, L. B. Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines?. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.151, p. 259-269, 2006.

RAMOS, S. R. R.; QUEIRÓZ, M. A.; CASALI, V. W. D; CRUZ, C. D. Recursos genéticos de *Cucurbita moschata*: caracterização morfológica de populações locais coletadas no Nordeste brasileiro. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov, 1999.

RÊGO, E. R; FINGER, F. L; NASCIMENTO, N. F. F; ARAÚJO, E. R; SAPUCAY, M. J. L. C. Genética e melhoramento de pimenteiras. In: RÊGO; E. R. FINGER, F. L. RÊGO, M. M. **Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.)**. 1 ed. Recife - PE: Imprima, v. 1, p. 117-136, 2011.

REIFSCHEIDER, F. J. B. ***Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000.

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

RODRIGUES, R.; BENTO, C.S.; SILVA, M.G.M.; SUDRÉ, C.P. Atividades de caracterização e avaliação em bancos de germoplasma. In: PEREIRA, T.N.S. **Germoplasma: Conservação, Manejo e Uso no Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Arca, p. 115-140, 2010.

RODRIGUEZ, J. M.; BERKE, T.; ENGLE, L; NIENHUIS, J. Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 99, n. 1-2, p. 147-156, 1999.

RUFINO, J. L. S.; PENTEADO, D. C. S. Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. **Informe Agropecuário**. v. 27, n. 235, p.7-15, 2006.

SACCARDO, F. Miglioramento del peperone. In: COLLANA L'ITALIA AGRICOLA. **Miglioramento genetico dei vegetali**. Roma: Reda, p. 183-200, 1992.

SAITO, M; YONESHIRO, T. Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 1, p 71–77, 2013.

SALLA, M. F. S; RUAS, C. F; RUAS, P. M. CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SPILLER, F; ALVES, M. K; VIEIRA, S. M; CARVALHO, T. A; LEITE, C. E; LUNARDELLI, A; POLONI, J. A; CUNHA, F. Q. OLIVEIRA, J. R. de. Anti-inflammatory effects of red pepper (*Capsicum baccatum*) on carrageenan- and antigen-induced inflammation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 60, n. 4, p. 473-478, 2008.

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D. Vegetables, fruit, and câncer prevention: a review. **Journal of American Dietetic Association**. v. 96, p. 1027- 1039, 1996.

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

SUDRÉ, C. P; GONÇALVES, L. S. A; RODRIGUES, R; AMARAL JÚNIOR, A. T. do; RIVA-SOUZA, E. M; BENTO, C do 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.

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

TOFANELLI, M. B. D.; AMAYA-ROBLES, J. E.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Ácido giberélico na produção de frutos partenocápicos de pimenta. **Horticultura**

**Brasileira**. v. 2, n. 1, p. 116-118, 2003.

TOQUICA, S. P; RODRIGUEZ, F; MARTINEZ, E; DUQUE, M. C; TOHME, J. Molecular Characterization by AFLPs of *Capsicum* Germplasm from the Amazon Department in Colombia, Characterization by AFLPs of *Capsicum*. **Genetic Resources and Crop Evolution**. v. 50, p. 639–647, 2003.

VOS, P; HOGERS, R; BLEEKER, M; REIJANS, M; LEE, T; HORNES, M; FRIGTRS, A; POT, J; PELEMAN, J; KUIPER, M; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleics Acids Research**. v. 33, p. 4407-4414, 1995.

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, p.1409–1418, 2001.

YAMAMOTO, S; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**. v. 59, n. 1, p. 18-28, 2005.

ZIETJIIIEWICZ, E; RAFALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v.20, p 176-183, 2002.

ZIMMER, R. A; LEONARDI, B; MIRON, D; Schapova, E; OLIVEIRA, J. R. de; GOSMANN, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology** v.139, p. 228– 233, 2012.