



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA - FAV**

**ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CULTIVADOS
DE *Capsicum chinense* UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

Paulo Henrique Dos Santos Leite

Brasília – DF

Dezembro de 2015

PAULO HENRIQUE DOS SANTOS LEITE

**ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CULTIVADOS
DE *Capsicum chinense* UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

Projeto final de Estágio Supervisionado,
submetido à Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Orientadora: Glaucia Salles Cortopassi Buso

Brasília – DF

Dezembro de 2015

Paulo Henrique Dos Santos Leite

**ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CULTIVADOS
DE *Capsicum chinense* UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Taislene Butarello Rodrigues de Moraes

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Eng.^a Agrônoma Nayara Carvalho

Universidade de Brasília

Folha de aprovação

**ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CULTIVADOS
DE *Capsicum chinense* UTILIZANDO MARCADORES RAPD**

Projeto final de Estágio Supervisionado,
submetido à Faculdade de Agronomia e
Medicina Veterinária da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Paulo Henrique Dos Santos Leite

Orientadora: Gláucia Salles Cortopassi Buso

COMISSÃO EXAMINADORA

14 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Everaldo Anastácio Pereira

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Taislene Butarello Rodrigues de Moraes

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília

Eng.^a Agrônoma Nayara Carvalho

Universidade de Brasília

*Aos amigos e familiares que de alguma forma influenciam em minha vida, dedico
esse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Anairis Lima Lopes dos Santos, por toda a dedicação, companheirismo e amor sempre. Aos meus tios, por todo apoio e incentivo.

A minha orientadora Glaucia Salles Cortopassi Buso pela contribuição e conhecimento adquirido.

Ao meu professor Everaldo Anastacio Pereira, pelo conhecimento transmitido e ajuda. Aos professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

A Grazielle Valle Zinho, pelo incentivo, ensinamentos, parceria e cumplicidade sempre.

Aos meus avós, pelo incentivo e ensinamentos.

Aos companheiros Felipe Mont'Alvão Canela, Nayara Carvalho, por toda ajuda e paciência.

A Embrapa Cenargen, em especial para a equipe do laboratório de genética vegetal pela contribuição e conhecimento adquirido.

“O maior presente que podemos oferecer a humanidade é a manifestação do caráter de Cristo em nossa personalidade”...

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Origem e evolução das plantas do gênero <i>Capsicum</i>	2
2.2. Gênero <i>Capsicum</i>	3
2.2.1. <i>C. chinense</i>	446
2.2.2. <i>C. frutescens</i>	557
2.2.3. <i>C. annuum</i>	668
2.3. Capsaicina	778
2.4. Importância econômica	779
2.5. Melhoramento genético de pimenta	8810
2.6. Análise molecular	9911
2.7. PCR	121213
2.8. Marcadores moleculares	141416
2.8.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic)	141416
2.8.2. SSR (Simple Sequence Repeats) Erro! Indicador não definido. Erro! <u>Indicador não definido.</u> 17	
3. MATERIAL E MÉTODOS	151519
3.1. Material Vegetal	151519
3.1.1. Extração de DNA genômico	161619
3.1.2. Quantificação de diluição de DNA	171720
3.2. Reações e amplificação da PCR	181821
3.3. Marcadores RAPD Erro! INDICADOR NÃO DEFINIDO. Erro! INDICADOR NÃO <u>DEFINIDO.</u> 21	
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	191923
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	202024
5.2. Classificação e identificação de marcadores moleculares do tipo RAPD. 232327	
5.3. Avaliação de diversidade genética entre e dentro de espécies de pimenta <u>242428</u>	
6. CONCLUSÕES	242428
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	252529

Leite, Paulo Henrique Dos Santos, **ANÁLISE DE SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE GENÓTIPOS CULTIVADOS DE *Capsicum chinense* UTILIZANDO MARCADORES RAPD 2015.**

Monografia (Bacharelado em Agronomia). Universidade de Brasília – UnB.

RESUMO

Utilizada culturalmente em diversos países por sua característica de ardência derivada da capsaicina, a pimenta é amplamente cultivada em todas as regiões do Brasil. A crescente demanda de mercado, estimada em 80 milhões de reais ao ano impulsiona a agricultura familiar. Com o objetivo de esclarecer a origem de 14 genótipos de *C. chinense* cultivados na Bahia, estes foram comparados com 13 genótipos do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças com características morfológicas bastante próximas. A esta análise foram adicionados materiais de *C. frutescens* e *C. annuum* como grupos externos. A análise foi realizada com marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) por seu alto nível de polimorfismo. Utilizou-se 16 iniciadores RAPD polimórficos na amplificação do DNA por meio de reações de PCR, e a separação dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio. A matriz obtida pela análise dos marcadores foi submetida a análises estatísticas, com uso de software NTSYS (versão 2.21m), utilizando o coeficiente de JACCARD para a similaridade genética entre os genótipos, e para análise de agrupamento o método UPGMA. Foram obtidos 80 marcadores para os diferentes genótipos resultando em um dendrograma no qual se observou a formação de dois principais grupos, um compreendendo os acessos da espécie *C. chinense* e o outro com os genótipos do grupo Bahia. O primeiro grupo apresentou dois subgrupos, um com 12 acessos dos materiais do programa de melhoramento e o segundo com os 14 acessos cultivados na Bahia. A similaridade entre esses dois subgrupos foi de 0,73, o que sugere relativa divergência genética entre os acessos do programa de melhoramento e os cultivos na Bahia. O presente estudo constatou a utilidade dos marcadores RAPD na distinção de genótipos de *Capsicum* com alta similaridade morfológica.

Palavras-chaves: Marcadores moleculares, coeficiente de similaridade, pimentas.

ABSTRACT

Culturally used in several countries for its burning characteristic derived from capsaicin, pepper is cultivated in all regions of Brazil. The growing market demand, estimated at 80 million reais a year boosts family farming. In order to clarify the origin of 14 materials of *C. chinense* grown in Bahia, they were compared with 13 genotypes of the breeding program of Embrapa Vegetables with very close morphological characteristics. To this analysis were added *C. frutescens* and *C. annuum* accesses as outgroups. The analysis was performed with RAPD molecular markers (Random Amplified Polymorphic DNA) for its high level of polymorphism. It was used 16 polymorphic RAPD primers in DNA amplification by means of PCR reactions, and separation of the fragments was performed by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide. The matrix obtained by analysis of markers was subjected to statistical analysis, using NTSYS software (version 2.21m), using the JACCARD coefficient to ~~the~~ analyse similarity between accessions, and the UPGMA cluster analysis method. Eighty markers were obtained from the different genotypes resulting in a dendrogram in which we observed the formation of two major groups, one comprising the accesses of *C. chinense* and the other with the outgroups. The first group had two subgroups, one with 12 accesses of material improvement program and the second with 14 genotypes cultivated in Bahia. The similarity between these two subgroups was 0.73, suggesting genetic divergence among accessions of the breeding program and crops in Bahia. This study found the usefulness of molecular markers for distinction of Capsicum genotypes with high morphological similarity.

Keywords: Molecular markers, , Similarity coeficiente, hot pepper.

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais apresentam elevada variabilidade o que influencia diretamente na sua sustentabilidade. As Américas, em especial, apresentam grande diversidade de espécies, entre elas as do gênero *Capsicum* (pimenta) que na verdade são todas originárias da América, diferentemente do que Nikolaus Joseph Von_Jacquin (1727-1817), um botânico holandês pensava, que classificou a espécie *Capsicum chinense* como sendo de origem chinesa.

As pimentas têm grande potencial de melhoramento com enfoque nutricional, devido aos seus altos teores de vitamina A e C, e vêm sendo utilizadas também na medicina, e como plantas ornamentais (IBPGR, 1983). A necessidade de melhoramento para a produção na agricultura e qualidade depende da incorporação de novas formas alélicas nas formas cultivadas. Entretanto, não se sabe quais alelos serão necessários para o melhoramento até que surja a necessidade de introdução ou retirada de características. Como o Brasil está localizado na região de origem do gênero, a variabilidade encontrada é maior que em qualquer outro lugar do mundo, assim, vários países da América Latina, figuram como de primeira prioridade à coleta de germoplasma de *Capsicum* (BOSLAND, 1993).

Os métodos de melhoramento utilizados em plantas autógamas, em sua maioria envolvem hibridação. A escolha de genitores no programa de melhoramento é uma fase crítica e de fundamental importância, em geral, um dos genitores é escolhido em função da sua superioridade frente à variabilidade, e o outro é escolhido porque complementa deficiências específicas do primeiro genitor (ALLARD, 1971). Além da escolha de genitores o sucesso no programa de melhoramento por hibridação depende também do germoplasma disponível e do conhecimento do controle gênico das características a serem melhoradas (ALLARD, 1971; FEHR, 1987).

A caracterização molecular de uma cultivar é um passo fundamental no processo legal dos materiais desenvolvidos por melhoristas, contribuindo para descrição detalhada desses materiais. O uso de marcadores moleculares tem sido importante em processos legais que envolvem disputas de direito autoral. O grau de similaridade entre cultivares pode ser empregado para reconstituir o pedigree de

certos materiais, com fins de testar o conhecimento básico sobre o processo de desenvolvimento de uma cultivar e como subsídio à proteção legal.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a divergência genética entre 30 genótipos de pimenta dentre eles genitores, híbridos, espécies distintas e um grupo desconhecido proveniente da Bahia para a averiguação de parentesco genético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origem e evolução das plantas do gênero *Capsicum*

O gênero *Capsicum*, conhecido popularmente como pimentas e pimentões, pertence à família *Solanaceae*. O gênero possui diversas espécies de pimentas, dentre elas 31 são classificadas como domesticadas, semi-domesticadas e silvestres (POZZOBON et al. 2006; MOSCONE et al., 2007) que de acordo com Hunziker (2001) são distribuídas em quatro centros de origem, sendo 1) faixa sul dos EUA até o oeste da América do Sul, com 12 espécies (spp), 2) nordeste do Brasil e costa da Venezuela (1 spp.), 3) costa leste do Brasil (10 spp.) e 4) região central da Bolívia e do Paraguai e norte e centro da Argentina (8 spp.).

Recentemente, em 2005, Barboza e Bianchetti descreveram três novas espécies de *Capsicum* ocorrentes no Brasil, a *Capsicum pereirae* (Espírito Santos e Minas Gerais), *Capsicum friburgense* (localizada em um região restrita de Nova Friburgo, Rio de Janeiro) e *Capsicum hunzikerianum* (São Paulo), totalizando assim 34 espécies descritas para o gênero.

Diversos relatos sugerem que as pimentas estão entre as mais antigas plantas cultivadas nas Américas, e os vestígios arqueológicos indicam que *C. annum*, em particular, foi utilizada pelo homem antes mesmo do advento da agricultura (PICKERSGILL, 1969). Outros registros arqueológicos indicam que o gênero *Capsicum* já vinha sendo consumido há pelo menos 8.600-5.600 a.C. nas regiões andinas do Peru, e há 6.500-5.500 a.C. no México (NUEZ-VIÑALS et al., 1998). Juntamente com os gêneros *Phaseolus* (feijão) e *Cucurbita* (abóboras), as pimentas faziam parte das primeiras plantas a serem domesticadas nas Américas (NASCIMENTO FILHO et al., 2007).

O Brasil é um importante centro de diversidade do gênero, pois aqui é encontrada grande variedade de plantas e possui os três níveis de domesticação, domesticados, semi-domesticados e selvagem (CARVALHO et al., 2003), além de possuir um centro secundário de espécies domesticadas de *Capsicum*, tendo grande diversidade de *Capsicum annuum* var. *annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum bacatum* var. *pendulum* e *Capsicum chinense*.

Os indígenas americanos domesticaram a pimenta devido a sua mudança de hábito nômade para sedentário na história evolutiva por causa da sua necessidade de fonte segura de alimentação. Iniciou-se assim, o processo de cultivo das culturas. Para as pimentas, a domesticação resultou em mudanças nos frutos, particularmente, que eram pequenos, eretos, decíduos e vermelhos e se tornaram maiores, pendentes, não decíduos e com uma grande diversidade de cores (LUZ, 2007).

2.2. Gênero *Capsicum*

Segundo Bosland & Votava (1999), o gênero *Capsicum* e suas espécies se enquadram na seguinte taxonomia:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Solanales

Família: Solanaceae

Gênero: *Capsicum*

Dentre as pimentas domesticadas, temos a espécie *C. annuum* L. variedade *annuum*, que engloba tipos diferentes como os pimentões, além das pimentas doce e páprica, como também os tipos picantes jalapeño e cayenne. *C. baccatum* var. *pendulum* que tem como representantes as pimentas cambuci e dedo-de-moça, sendo esta última muito difundida no consumo fresco, em molhos e conserva, e também na fabricação da pimenta desidratada, conhecida como calabresa. *C. frutescens* L., são pimentas extremamente pungentes, á exemplo da malagueta, uma das mais conhecidas e consumidas pimentas no Brasil e a “tabasco”, mundialmente difundida. *C. chinense* Jacq, compreende as pimentas conhecidas

como pimenta de cheiro, pimenta bode, cumarí do Pará, murupi, habanero e biquinho (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008).

As pimenteiras apresentam flores hermafroditas e sistema reprodutivo do tipo autofecundação. Entretanto, os níveis de polinização cruzada variam entre e dentro das espécies. Estudos tem mostrado que a polinização cruzada pode ocorrer em uma faixa de 2 a 90% (TANKSLEY, 1984), o que possibilita colocá-las no grupo intermediário entre alógamas e autógamas. Nas espécies domesticadas, o estigma se encontra no mesmo nível das anteras aumentando a possibilidade de autopolinização, enquanto que nas espécies selvagens o estigma está acima das anteras facilitando a fecundação cruzada (CASALI & COUTO, 1984). A autoincompatibilidade observada neste gênero está restrita à apenas algumas espécies ou exemplares centralizados na Bolívia e áreas adjacentes (PICKERSGILL, 1991).

Costa et al. (2008) em trabalho com polinização e fixação de frutos em cinco genótipos de *C. chinense* Jacq., dois do morfotipo murupi e três do morfotipo pimenta de cheiro, observaram que a polinização natural na espécie é eficiente, não apresenta alta dependência de agentes polinizadores e que os genótipos apresentam o comportamento de plantas autógamas.

2.2.1. *C. chinense*

É representada pelas pimentas conhecidas como pimenta de cheiro, pimenta de bode, cumari do Pará, murupi, habanero e biquinho. A sua denominação foi conferida pelo holandês Kikolaus Von Jacquinomist, e surgiu de um equívoco, pois pensava-se que esta espécie era originária da China, mas na época da determinação já havia relatos de que as espécies de *Capsicum* tinham como centro de origem o Ocidente (BOSLAND & VOTAVA, 1999).

Segundo Carvalho e Bianchetti (2008) a espécie pode ser considerada como a mais brasileira dentre as espécies domesticadas, consequência da sua domesticação pelos índios, por se tratar da Bacia Amazônica o seu local de maior diversidade genética, sendo possível que na região de maior diversidade sejam encontradas espécies semi-domesticadas e até silvestres.

Smith e Heiser (1957) relatam que a espécie *Capsicum chinense* Jacq caracteriza-se por ter folhas e ramos glabros, folhas ovada a ovado-lanceoladas, largas, macias ou rugosas, de tonalidade variando do verde claro ao escuro. As flores aparecem de três a cinco por nó. Com pedicelo pendente, raramente ereto, relativamente curto, o cálice não é dentado, e possui uma forte constrição em sua base. A corola verde amarelada é raramente esbranquiçada, medindo de 0,5 a 1,0 cm de comprimento, anteras azuis, púrpuras ou amareladas, os frutos podem variar de 1,0 a 13,0 cm de comprimento, com formas variadas, de esféricos a alongados. A espécie possui ainda uma peculiaridade em relação às outras espécies, a presença de uma constrição anelar, localizada no cálice com a sua união com o pedicelo do fruto (CARVALHO & BIANCHETTI, 2008; NUEZ-VIÑALS et al., 1998).

Vale ressaltar que os frutos desta espécie apresentam uma enorme variabilidade em tamanho, forma e cor, com diferentes intensidades indo desde o amarelo até o vermelho, quando maduros (LANNES et al., 2007; REIFSCHNEIDER, 2000), o que implica em uma ampla variabilidade genética para a espécie em questão. Destacam-se também pela ampla adaptação às condições tropicais (clima quente e úmido), principalmente por apresentar melhores níveis de resistência as principais doenças tropicais, do que os verificados com outras espécies (CARVALHO et al., 2006).

2.2.2. *C. frutescens*

É uma espécie de pimenta que inclui as variedades pimenta-malagueta e pimenta-tabasco, entre outras. É um arbusto pequeno, nativo de regiões tropicais da América. Este arbusto possui folhas ovais, acuminadas, flores alvas e bagas fusiformes, vermelhas, bastante picantes, utilizadas como condimento e excitantes do aparelho digestivo. Muito cultivado no Brasil, em Portugal, na África, e em toda a região sul da Ásia.

Também são conhecidas pelos nomes de gindungo, maquita-tuá-tuá, ndongo, nedungo e piripiri. Em Portugal, existem os termos malagueta e “piripíri”. No Brasil, são chamados de cumarim, cumari, pimenta-cumarim, pimenta-apuã, malagueta e “pimenta-malagueta”.

O fruto tipicamente cresce um amarelo pálido e amadurece a um vermelho brilhante, mas também podem ter outras cores. *C. frutescens* tem uma menor variedade de formas em comparação com outras espécies de *Capsicum*, provavelmente por causa da falta de seleção humana. Mais recentemente, no entanto, *C. frutescens* foi criada para produzir linhagens ornamentais, por causa de suas grandes quantidades de pimentas eretas que crescem em padrões de maturação coloridos.

2.2.3. *C. annuum*

É uma espécie de pimenta e pimentões nativos da América do Norte e do Sul. Esta espécie é a mais comum e amplamente cultivada, além de englobar uma ampla variedade de formatos e tamanhos de pimentas, tanto suaves quanto pungentes que variam de pimentões para pimenta. A variedade mais comum desta espécie é o pimentão. Outras variedades são algumas das mais conhecidas pimentas mexicanas, por exemplo: o jalapenho, o poblano, e o acho.

É desta espécie que derivam as especiarias pimenta-caiena e páprica, que são diferentes variedades de *Capsicum annuum* secos e moídos. “Os pimentos jalapenos” são utilizados na preparação de uma variedade menos picante de molho tabasco.

No passado algumas formas lenhosas destas espécies foram chamadas *C. frutescens*, mas os recursos que foram utilizados para distinguir as formas aparecem em muitas populações de *C. annuum* e não é reconhecido como *C. frutescens*.

Embora o nome da espécie *annuum* signifique “anual” (Latim), a planta não é anual e na ausência de geadas de inverno podem sobreviver varias temporadas e se transformar em um grande arbusto perene. As flores individuais são roxas (às vezes púrpura), enquanto o caule é densamente ramificado de até 60 centímetros de altura. O fruto é baga que pode ser verde, amarelo ou vermelho quando maduro. Embora as espécies possam tolerar a maioria de climas, *C. annuum* é especialmente produtivo em climas quentes e secos.

2.3. Capsaicina

As pimentas são muito utilizadas na culinária mundial devido a sua sensação de ardência e queimação, essa sensação é dada por componentes químicos presentes nas plantas do gênero *Capsicum* capazes de estimular as papilas gustativas da boca.

Esses componentes químicos são chamados capsaicinoides, que são responsáveis pela sensação de ardência em frutos do gênero, formando um grupo de 12 alcalóides, onde a capsaicina (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonamida) e a dihidrocapsaicina são responsáveis por mais de 90% do efeito de ardência.

A concentração de capsaicina dos frutos de pimenta é o determinante da pungência, que é usualmente medida por um teste denominado Teste organoléptico Scoville, nome dado em homenagem a Wilbur Scoville. Atualmente o teste é realizado pela cromatografia líquida de precisão (HPLC), e sua medida dada em Unidades de calor Scoville (SHU).

A capsaicina tem sido estudada pela sua propriedade analgésica; provoca a liberação de endorfinas (morfina endógena), analgésicos naturais potentes, além do controle dos níveis de colesterol, dores de cabeça, e doenças reumáticas.

2.4. Importância econômica

Com a chegada dos colonizadores portugueses e espanhóis ao continente americano, foram descobertas as pimentas do gênero *Capsicum*, pimentas estas, diferentes das que o povo europeu possuía, do gênero *Piper* (pimenta-do-reino e pimenta-negra). Perceberam também que os povos nativos da região a utilizavam em diferentes refeições e em diversos pratos.

Ainda hoje, a importância da pimenta continua grande, seja na culinária, nas crenças, na medicina, no paisagismo ou como arma de defesa. Há relatos de que índios Caetés foram os primeiros brasileiros a utilizarem a pimenta como arma, séculos depois, esse tipo de arma foi melhorado e é utilizado pela polícia de diversos países, além da utilização por um grande grupo de mulheres e homens como arma de defesa.

Como as pimentas são de origem do continente americano, e um grande grupo de espécies tem classificação de origem brasileira, é importante a contribuição que o Brasil teve na dispersão de pimentas pelo mundo, feita pelos colonizadores nos anos de 1492 a 1600, em que suas rotas envolvendo África, Europa e Ásia favoreceram a dispersão pelo mundo.

Séculos depois da dispersão pelo mundo, países como China e Índia tem tradição na produção de pimentas tendo mais de 1.000.000 de hectares plantados. Entretanto, os países que tem mais consumo per capita de pimentas são a Tailândia e Coreia do Sul com consumo de 5 a 8 gramas de pimenta por habitante diário.

O cultivo da pimenta no Brasil se ajusta perfeitamente ao modelo de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor–indústria, pois em sua maioria as pimentas são cultivadas em pequenas unidades familiares e com baixo uso de insumos (RIBEIRO & REIFSCHNEIDER, 2008). A produção é feita em todos os estados do país, em grande parte por sua fácil adaptação a climas tropicais e temperados. As pimentas além de serem consumidas frescas também podem ser processadas e utilizadas na indústria de alimentos.

Em um estudo realizado pela Embrapa Hortaliças foi determinado que a área anual cultivada é de cerca de dois mil ha e os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. A produtividade média depende do tipo de pimenta cultivada, variando de 10 a 30 t/ha. A crescente demanda do mercado, estimado em 80 milhões de reais ao ano, tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas (doces e picantes) um dos mais importantes do país. Além do mercado interno, parte da produção brasileira de pimentas é exportada em diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas ornamentais.

2.5. Melhoramento genético de pimenta

Há uma grande necessidade de criação de novas cultivares de pimenta que incluam resistência às pragas, alta produtividade e características desejáveis de qualidade, pois é comum no Brasil que se tenha maior interesse nas cultivares de pimentão por seu maior valor econômico, deixando de lado assim as pimentas.

Atualmente, a Embrapa Cenargen é a principal empresa voltada para o melhoramento genético e criação de cultivares de pimenta.

A comercialização de sementes de pimentas no país é feita por diversas empresas tendo como principal característica a predominância de cultivares para pimentão e variedades para pimentas.

As características das pimentas a serem comercializadas que devem ser levadas em conta são o tamanho do fruto, textura da epiderme, aroma e pungência (ardência), pois assim é possível direcionar a região que a pimenta será consumida. Como exemplo pode-se citar os frutos maduros, pequenos e redondos são preferencialmente consumidos na região nordeste, enquanto finos e alongados na região sudeste (REIFSCHNEIDER, 2000).

2.6. Análise molecular

Marcadores moleculares são todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento de DNA, podendo ou não ter expressado suas características do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Desta forma, é possível avaliar divergências genéticas (polimorfismos) entre indivíduos. Já os marcadores morfológicos, que são baseados em fenótipos e geralmente de fácil identificação, ou moleculares, que são baseados em características genéticas e segundo HOFFMANN & BARROSO(2006), consistem em pequenos fragmentos de DNA obtidos por meio de ferramentas da biotecnologia moderna, e ambos auxiliam em uma série de estudos genéticos vegetais e animais.

Uma grande vantagem do uso de marcadores moleculares é a identificação direta do genótipo sem a interferência do ambiente o que possibilita a detecção do polimorfismo em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, que são variações de natureza genética em uma população para um ou mais locus. Com a ajuda das tecnologias modernas de genética e da biologia molecular, surgiram diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA (FALEIRO, 2007).

As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a diversos outros estudos relacionados à

conservação e uso de bancos de germoplasma, estudos filogenéticos, mapeamento genético, mas a principal aplicação do estudo da genética de plantas é o melhoramento genético (HOFFMANN E BARROSO, 2006).

Dependendo da metodologia escolhida, os métodos moleculares podem detectar mais diversidade genética do que os métodos clássicos de caracterização morfológica (BUSO, 2005). Apesar de fornecer dados fundamentais para um estudo genético, o uso de marcadores moleculares implica em uma questão financeira, relacionada à estrutura e capacitação de pessoal. Atualmente no país existem relativamente poucos laboratórios com estrutura de alta tecnologia, e muito dos métodos e técnicas utilizadas estão caindo em desuso.

A abundância genômica diz respeito à cobertura de marcadores no DNA, ou seja, a sua ocorrência no mesmo. Segundo HOFFMAN E BARROSO (2006), RAPD e microssatélites têm melhor distribuição no genoma que isoenzimas. O nível de polimorfismo detectado depende da base genética do marcador e da informação genética que essa base carrega consigo. Com relação à especificidade dos locos, os marcadores podem ser multilocos, obtidos de múltiplas regiões gênicas (RAPD, AFLP), ou uniloco, que fornecem dados de um único loco (FALEIRO, 2007).

A reprodutibilidade dentro do tema de marcadores moleculares significa dizer que, um marcador em determinada condição necessariamente deve reproduzir da mesma forma, os resultados apresentados em outro laboratório, ou seja, quanto maior a reprodutibilidade apresentada maior sua confiabilidade.

Existe também uma característica muito importante quando se trata de classificação de marcadores moleculares, a dominância. Marcadores codominantes conseguem diferenciar genótipo homozigoto de heterozigoto, desta forma se tornam mais informativos que os dominantes que não conseguem diferenciar. A dominância pode restringir a possibilidade de sua utilização em análises genéticas onde seja importante diferenciar homozigotos de heterozigotos. Isto será particularmente importante em populações de plantas alógamas, onde a porcentagem de locos em heterozigose é alta (HOFFMAN & BARROSO, 2006).

O uso de marcadores moleculares envolve uma série de investimentos, desde a mão de obra até a capacitação para que possam operar aparelhos de eletroforese,

termocicladores, centrifugas entre outras, e que possuam um conhecimento prévio de preparo de solução, uso de EPI (Equipamento individual de proteção), além de conhecimento químico.

O uso de marcadores ligado ao melhoramento pode ser feito através do processo chamado seleção assistida de marcadores que utiliza marcadores ligados a uma característica de interesse. Isto é particularmente importante quando realizada para caracteres que se expressam em estágios de desenvolvimento avançado, como características de frutos e sementes, quando o padrão de herança é recessivo ou quando há necessidade de operações especiais para que o gene se expresse, como para resistência a pragas e doenças. (HOFFMANN & BARROSO, 2006).

Quanto mais divergente for o genitor maior a variabilidade genética na população, e maior a probabilidade de reagrupar os alelos em novas combinações favoráveis. A divergência genética tem importância no melhoramento, pois quando bem explorada, pode reduzir a vulnerabilidade da cultura a doenças e acelerar o progresso genético de determinadas características (CUI *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que a utilização da divergência genética disponível nas coleções de trabalho e bancos de germoplasma, que se configura como a matéria prima do melhoramento genético vegetal, depende da caracterização e documentação dos genótipos de forma que o melhoramento possa identificar a potencialidade de uso dessas constituições genéticas (BORÉM, 1997).

O uso de marcadores de DNA é usado hoje em dia para a caracterização de variedades, linhagens e híbridos como prova legal em processos jurídicos do seu obtentor. Após o ano de 1997 com a aprovação da lei de Proteção de Cultivares, o Serviço Nacional de proteção de cultivares, ficou responsável por esta caracterização de novas variedades. Para que uma variedade seja protegida, é necessário demonstrar que é diferente de qualquer outra variedade da mesma espécie. Apesar de o processo para a proteção de cultivares ser realizado com base em descritores morfológicos, os marcadores moleculares têm sido estimulados e aceitos nos processos para a identificação de cultivares.

Muitos procedimentos em biologia molecular baseiam-se em reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou reação em cadeia da polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

2.7. PCR

Kary Mullis, bioquímico, criador da técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR – Polymerase Chain Reaction) em 1983, descobriu que possuía uma importante ferramenta em mãos. Primeiramente tentou publicar seus artigos nas revistas científicas mais importantes do mundo como a *Science*, americana, que prontamente lhe negou a publicação, e a *Nature*, britânica, que procedeu da mesma forma. Mullis conseguiu apenas publicar seu artigo sobre amplificação do gene da β -globina humana na *Methods in Enzymology*, de impacto muito menor. Nessa mesma década, desenvolveram-se algumas técnicas, uma delas a duplicação do DNA, *in vitro*, realizada pela DNA polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, que, por viver em fontes térmicas, possui enzima que polimeriza a uma temperatura alta (72°C) e mantém atividade mesmo que submetida a 95°C (SAIKI et al., 1988).

Em resumo, a PCR é a síntese enzimática *in vitro* de milhões de “cópias” de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase a partir de uma sequência alvo (BUSO et al., 2009).

A reação de PCR envolve uma quantidade mínima de DNA (algo em torno de 3 nanogramas), um par de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores da reação, que delimitam a sequência do DNA a qual se quer amplificar, e um mix de reagentes essenciais para que a reação ocorra.

O princípio da PCR envolve três etapas básicas por ciclo, estimuladas pelo calor que são repetidas por diversas vezes:

- Anelamento de oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores), que funcionam como iniciadores da reação, á cada uma das fitas do DNA molde à região da fita que sofrerá a duplicação (35-60°C).
- Quebra das pontes de hidrogênio e consequente abertura do DNA que servirá de molde, por desnaturação térmica (92-95°C).

- Anelamento de oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores), que funcionam como iniciadores da reação, a cada uma das fitas do DNA molde à região da fita que sofrerá a duplicação (35-60°C).
- Polimerização, através da enzima taq DNA polimerase, das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores utilizando cada um dos dNTP's como substrato da reação de polimerização (72°C).

Cada ciclo é repetido por diversas vezes, e uma vez que a quantidade de DNA dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica, de forma que após 20 ciclos, são produzidas mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequencias alvo.

Essa escala de amplificação permite, portanto, iniciar a reação com quantidades mínimas de DNA e terminar com grandes quantidades de uma sequência específica de interesse (ANTONINI et al., 2004).

A elaboração de iniciadores para alguns marcadores depende do conhecimento prévio das sequencias de nucleotídeos que fazem parte do DNA de interesse. Para a criação, é necessário à clonagem e o sequenciamento da região, só assim é possível identificar e sintetizar o *primer*. Atualmente, alguns marcadores são baseados em iniciadores com sequências aleatórias, o que popularizou as análises genéticas, pois, nesses casos, não é necessário conhecer previamente as sequências das espécies alvos dos estudos genéticos (BUSO et al., 2009).

O mix de reagentes envolve os seguintes componentes (BUSO et al., 2009):

- Água: A água usada para reações de PCR, diluições de iniciadores e de DNA, deve ser filtrada em aparelho Mili-Q e renovada semanalmente, pois a qualidade da mesma pode influenciar na PCR;
- Tampão 10x: Oferece as condições básicas para que a reação ocorra;
- dNTP: São desoxinucleotídeos trifosfato livres, utilizados como **precursores** da síntese de DNA;
- BSA: Bovine Serum Albumin que servem para estabilizar a ação da taq ou DNA polimerase;

- $MgCl_2$: Serve como cofator da enzima taq polimerase.;
- Taq DNA polimerase: Enzima que sintetiza o DNA, responsável pela fase de extensão da PCR.

2.8. Marcadores moleculares

Marcador molecular são sequências de DNA que revelam polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados, estes são amplamente utilizados para estudos de população, mapeamento e análises de similaridade e ainda, distância genética.

2.8.1. RAPD (Random amplified polymorphic)

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA em PCR utilizando iniciadores de 10 nucleotídeos. Tipicamente utiliza-se apenas um tipo de primer em cada reação, sendo este normalmente formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (FRITSCH & RIESEBERG, 1996). A técnica consiste no anelamento do primer a sequencias da fita do DNA opostas. A amplificação é dada através do segmento de DNA entre dois iniciadores adjacentes com auxilio da enzima Taq polimerase. Os sítios de ligação dos iniciadores devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a Taq polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Por serem pequenos, é grande a possibilidade de que os iniciadores encontrem diversas regiões do genoma para se ligarem, fazendo com que diversos fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma reação (WILLIAMS et al., 1990). A quantidade de fragmentos resultante é bastante grande se comparada com outros marcadores. A separação dos fragmentos é feita em gel de agarose de 1,5%, e corado com brometo de etídio. A amplificação do fragmento é dada pela ligação do primer ao sitio de ligação, entretanto não significa que todos os fragmentos amplificados resultem de um pareamento perfeito. O polimorfismo detectado por estes marcadores tem natureza binária, ou seja, um determinado

fragmento ou banda está presente ou ausente no gel que são características de marcadores dominantes.

Bandas de tamanhos diferentes são consideradas locos diferentes. Marcadores RAPD são dominantes, o que significa que indivíduos homozigotos dominantes para um determinado loco e indivíduos heterozigotos para o mesmo loco não podem ser diferenciados a partir do perfil de amplificação uma vez que ambos serão representados pela presença de uma banda no gel. Marcadores RAPD são considerados neutros e aparentemente estão distribuídos ao acaso por todo o genoma, representando desde sequências de cópia única até sequências altamente repetitivas (WILLIAMS et al., 1990; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Existem muitas vantagens que podem ser citadas na técnica de RAPD, dentre elas pode-se citar; a simplicidade, rapidez, baixo custo e a quantidade reduzida de DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

O material analisado foi proveniente de um cultivo na Bahia de *Capsicum chinense* para produção comercial, e de materiais provenientes da Embrapa Hortaliças (Centro Nacional de pesquisa de Hortaliças – CNPH). Consistiu de 30 genótipos sendo 16 conhecidos, entre eles; genitores, híbridos, outras espécies e 14 desconhecidos.

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Genética Vegetal – LGV, da Embrapa CENARGEN (Recursos Genéticos e Biotecnologia). Foram utilizados marcadores RAPD para a análise genética dos indivíduos, após várias tentativas de utilização de ISSR, que não apresentou polimorfismo suficiente..

As etapas do estudo compreenderam a extração de DNA genômico; quantificação e diluição de DNA; amplificação de regiões alvo por PCR (com iniciadores RAPD), primeiro em pré-seleção, que consiste na utilização de poucos

indivíduos para identificar polimorfismos (divergências no DNA entre indivíduos) e depois em reações com todos os genótipos; separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose de 1,5%; e posterior análise dos dados obtidos por software específico para avaliações genéticas.

3.1.1. Extração de DNA Genômico

As folhas das plantas à campo da Bahia foram coletadas, numeradas e conservadas em temperatura negativa de -4°C para preservação. Já as plantas em telado foram coletadas e extraídas sem o processo de congelamento em forma de triplicata para maior quantidade e qualidade do material. O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de extração CTAB (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; BUSO, 2005 – com modificações). A extração envolveu 5 etapas:

1. Maceração mecânica para a lise das paredes e membranas celulares: foram utilizados aproximadamente 200 mg de tecido foliar pesados em balança de precisão, identificadas e individualizadas em tubos tipo “eppendorf” com “beads” de cerâmica.
2. Adição do tampão de extração (detergente catiônico), responsável pela lise das membranas celulares, CTAB 2% - Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide – Cetiltrimetilamônio brometo) e 2-mercaptoetanol 14,3 M, responsável pela inibição da oxidação do material vegetal. Após a maceração em máquina “fest-prep” (marca), a suspensão obtida foi submetida à temperatura de 65°C em banho-maria por aproximadamente 1 hora, agitando suavemente os eppendorfs para solubilização e homogeneização da suspensão.
3. Adição de solvente orgânico CIA: solução de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1. Nessa etapa, a fase orgânica (inferior) contendo parede celular, celulose, lipídeos, proteínas e polissacarídeos é separada da fase aquosa (superior) contendo DNA e RNA, por centrifugação.
4. Obtenção e lavagem do pellet: foi adicionada à fase aquosa, individualizada em outro eppendorf, isopropanol gelado, responsável pela precipitação dos ácidos

nucléicos totais com formação de pellet, por meio de centrifugação. O pellet foi lavado com álcool 70% e posteriormente, álcool 100%.

5. Adição de tampão: Adicionou-se tampão TE (Tris-EDTA) para ressuspender o pellet e RNase para digerir o RNA restando apenas o DNA genômico desejado.

3.1.2. Quantificação e diluição de DNA

Para verificar a quantidade e qualidade do DNA extraído, o mesmo foi quantificado por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. Foi utilizado DNA e lambda (λ) com concentração de 100, 200, 300 e 400 ng/ μ L (total) como referência para comparação. A diluição do DNA foi feita com água mili-Q, utilizando-se o cálculo a seguir:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

C_1 = Concentração do DNA estimada no gel.

C_2 = Volume de água a ser adicionado para concentração de trabalho (3 ng/ μ L).

V_1 = Concentração do DNA para trabalho (3 ng/ μ L).

V_2 = Volume estipulado de DNA para trabalho (200 μ L).

O DNA diluído foi quantificado em gel de agarose 1% utilizando DNA λ com concentração de 15, 30 e 50 ng (total) para comparação e os ajustes e requantificação foram feitos três vezes até a obtenção da concentração de 3 ng/ μ L. Segundo BUSO et al., (2009), para a maioria das espécies a concentração ideal está em torno de 3 ng/ μ L. A visualização das bandas decorrentes da quantificação foi realizada por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídeo sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador e fotografada em fotodocumentador. O brometo de etídeo é um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucléicos sendo que a luz ultravioleta induz sua fluorescência.

3.2. Reações de amplificação

Para a realização das reações de PCR, com marcadores RAPD, foram utilizados 3 µL de DNA a aproximadamente 3 ng, 1,5 µL de *primer* (oligonucleotídeos desenhados para serem complementares à sequência alvo) a 1 µM, e 8,5 µL de mix totalizando 13 µL de reação.

Os iniciadores utilizados (quadro 2) resultaram de uma pré-seleção em que se fez reações de PCR e separação por eletroforese apenas para identificar polimorfismos entre poucos indivíduos representantes dos grupos, para posteriormente realizar a reação com todos os indivíduos.

Quadro 2. Relação dos oligonucleotídeos Iniciadores e suas respectivas bases

Iniciadores	Sequência 5' – 3'	Iniciadores	Sequência 5' – 3'
AI13	GGGTCCAAAG	C8	TGGACCGGTG
AI5	GTCGTAGCGG	AB16	GGTCAGTCAC
AB18	CTGGCGTGTC	F7	TGCAAAGGCA
AX11	TGATTGCGGG	F8	TCGAGGCCCC
AX5	AGTGACACACC	C13	AAATTTCCCG
F9	CCAAGCTTCC	F4	TCCTAGGGGA
F10	GGAAGCTTGG	F15	CTGGAAGGAG
D13	GGGGTGACGA	E2	GTTTTACGAT

Para as reações de PCR, foi usado o mix ajustado: 4,67 µL de água; 1,04 µL de dNTP a 2,5 µM; 1,04 µL de BSA a 2,5 ng/mL; 1,30 µL de tampão 10x contendo 100 µM Tris-HCl pH 8,3; 500 µM KCl; 0,25 µL de MgCl₂ 50 mM e 0,20 µL de Taq DNA polimerase a 5,0 U/µL.

As condições de amplificação a que foram submetidos os produtos acima no termociclador, deu-se da seguinte forma: Um ciclo inicial de 5 minutos a 92°C,

seguido de 40 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 92°C, 1 minuto na temperatura de anelamento 35°C, e 2 minutos de extensão a 72°C, seguidos de um ciclo final de 10 minutos a 72°C.

A separação dos fragmentos obtidos foi feita por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%. Os perfis de RAPD foram analisados quanto à presença (1) ou ausência (0) da banda para cada loco amplificado:

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A matriz de 0 e 1 obtida foi computada no software NTSYS VERSÃO 2.21 (ROHLF, 1992), que forneceu estimativa de similaridade genética e agrupamento, por meio da análise dos genótipos. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, a matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Average).

O primeiro passo para a análise dos marcadores obtidos é a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários. Os dados são codificados como: 1 (presença do marcador) e 0 (ausência do marcador). Com o intuito de discriminar erros, alguns indivíduos são selecionados aleatoriamente e reproduzidos duas vezes para análise de reprodutibilidade ao final do gel.

O segundo passo compreende a utilização dos dados codificados para a estimativa de índices de similaridade ou de distância genética entre cada par de genótipos. Vários índices são descritos na literatura, mas o coeficiente de Jaccard foi o usado nesse estudo, o coeficiente compara o número de bandas comuns presentes e o número total de bandas envolvidas, excluindo o número de ausências conjuntas. Com base nos índices, estabelece-se uma matriz de similaridade ou de distâncias entre os genótipos que servirão de base para as análises de agrupamento e de dispersão dos mesmos (FALEIRO, 2007).

A análise de agrupamento é baseada em método hierárquico que utiliza o critério das médias das distâncias entre o vizinho mais próximo (single linkage) e o

mais distante (complete linkage). Esse método é conhecido como UPGMA. Após essa análise, o programa gera o dendrograma dos genótipos analisados, bem como o agrupamento dos mesmos por similaridade ou distância genética (FALEIRO, 2007).

A realização desses procedimentos seria quase impossível sem a ajuda da bioinformática, sobretudo quando vários genótipos são analisados simultaneamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 38 locos RAPD, dos quais 4 não amplificaram, 14 foram monomórficos, e 20 polimórficos. Destes, somente 16 foram utilizados, pois produziram fragmentos bem definidos que facilitam a análise (figuras 1 e 2).

A caracterização foi realizada através da análise de presença (1) ou ausência (0) de banda, as quais geraram matrizes binárias que foram analisadas no software NTSYS. A similaridade dos indivíduos foi analisada através do coeficiente de Jaccard e variou de 0,22 a 1, indicando que com esse grupo de locos, alguns indivíduos se mostraram próximos e até idênticos. Foi gerada uma matriz triangular que foi submetida à análise de agrupamento pelo método UPGMA, descrito anteriormente.

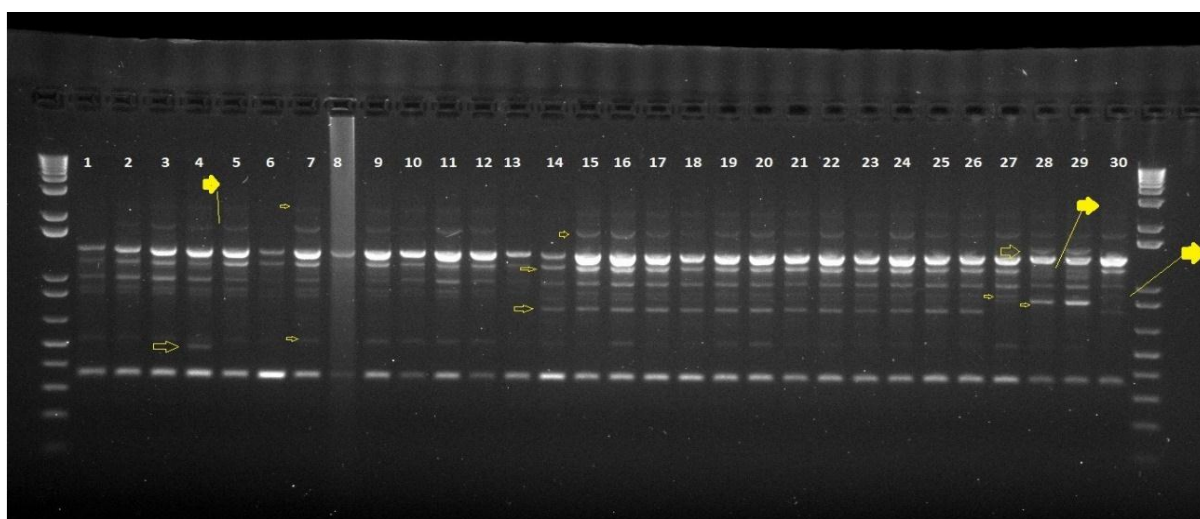


Figura 1: *Primer D13* – um dos 16 iniciadores RAPD polimórficos para os 30 indivíduos, Ladder 1kb.

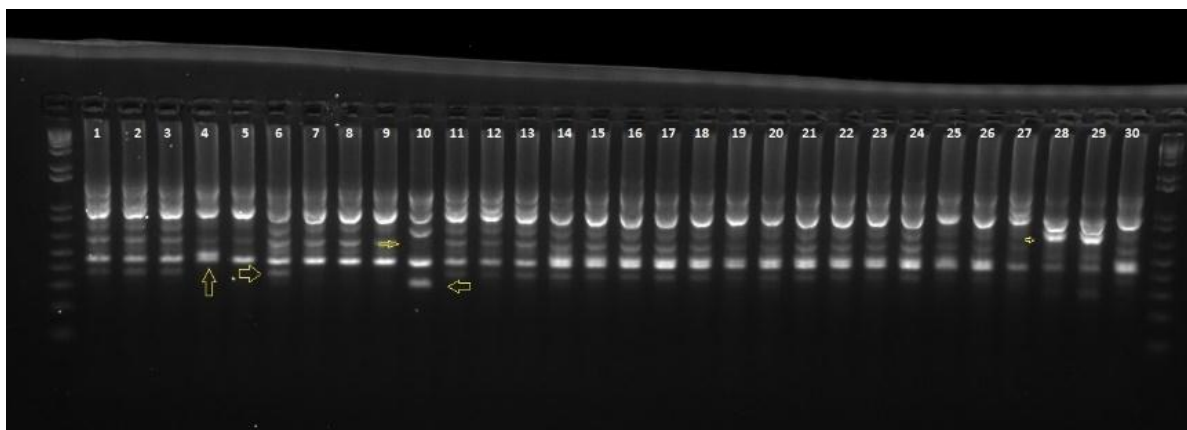


Figura 2: *Primer C13* – um dos 16 iniciadores RAPD polimórficos para os 30 indivíduos, Ladder 1kb.

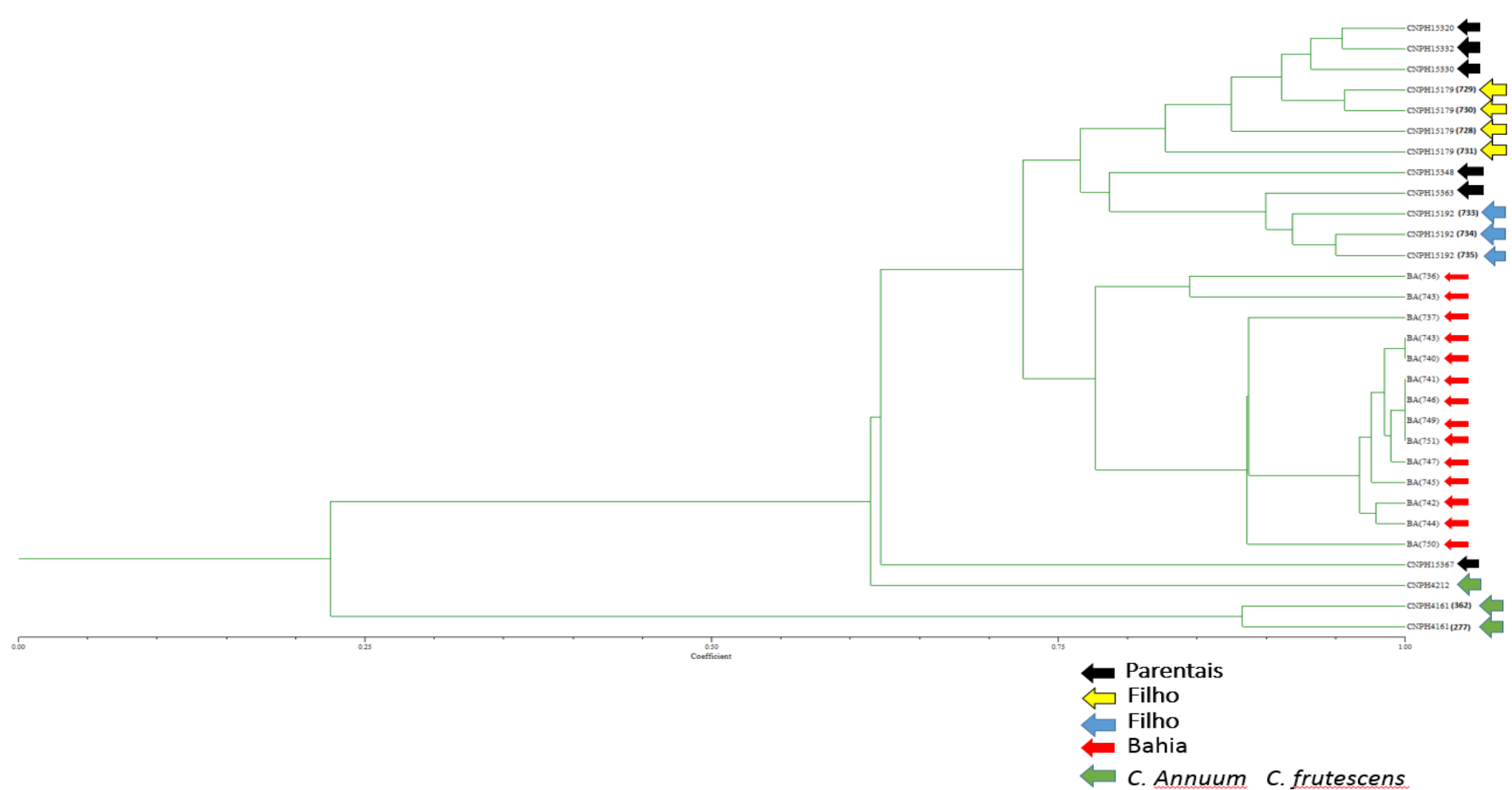


Figura 3: Dendrograma da similaridade genética (UPGMA) de 30 genótipos de *Capsicum*.

Na análise de agrupamento, 2 grupos foram formados com 22% de similaridade entre eles. No primeiro grupo foram formados dois subgrupos principais onde a espécie *Capsicum chinense* se localizou, no entanto, os subgrupos formados apresentaram uma clareza característica de divergência genética onde é possível a confirmação de que não há parentesco entre os materiais em gerações anteriores, exceto pela sua ligação pela espécie.

Os indivíduos parentais e filhos foram agrupados conforme esperado por sua similaridade genética, entretanto, um dos parentais se distanciou do grupo, o que pode ocorrer por dispor de uma ou poucas características desejadas para a progênie.

As espécies de *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* obtiveram 22% e 62% de similaridade respectivamente da espécie de *Capsicum chinense* evidenciando que o *C. annuum* possui maior proximidade genética com *C. chinense*.

5.1. Classificação e identificação de marcadores moleculares do tipo RAPD

Uma grande necessidade quando se fala na técnica de RAPD é a qualidade de DNA genômico que será utilizado como molde nas reações. A extração de DNA utilizando o método CTAB foi bastante eficiente disponibilizando grande quantidade e qualidade de DNA.

A quantidade de DNA variou de 150 a 330 ng feita em gel de agarose de 1% com λ de 100, 200, 300 e 400 ng. A integridade do DNA também pode ser avaliada da mesma forma que a quantificação não apresentando degradação, e também não apresentaram nem problemas na amplificação das reações.

Neste estudo de avaliação da diversidade genética, foram utilizados dezesseis iniciadores que geraram pelo menos uma banda polimórfica entre os indivíduos analisados. Esses dezesseis iniciadores geraram 196 produtos de amplificação (bandas), com uma média de 12,25 bandas por iniciador. Destas, 80 bandas foram classificadas como polimórficas (5 bandas por iniciador), ou seja, apresentaram polimorfismo para pelo menos um dos indivíduos estudados, e 116

foram monomórficas (7,25 bandas por iniciador). Esses iniciadores apresentaram amplificação, com tamanhos variando entre 110 e 4.080 pares de base (pb).

5.2. Avaliação de diversidade genética entre e dentro de espécies de pimenta

Há diversas vantagens na utilização de marcadores, principalmente naqueles baseados no DNA, para estimar as distâncias genéticas entre indivíduos. Como exemplo a grande quantidade de marcadores moleculares que possibilita uma maior confiança na obtenção da variabilidade. Isso é bastante importante quando se pretende selecionar progenitores para um programa de melhoramento. A frequência de alelos governando pode indicar características em comum entre as plantas, assim, a distância genética vai indicar cruzamentos que teoricamente, fornecem as melhores complementações genótípicas em cruzamentos.

A análise de agrupamento com base nas distâncias genéticas mostrou a formação de dois grandes grupos, da espécie de *Capsicum chinense*, mostrando que exceto pelo fato de serem da mesma espécie, não há ancestrais próximos que façam com que seus genótipos sejam parecidos. Entretanto, pelo fato de terem características morfológicas muito parecidas, esperava-se esta proximidade genética entre eles, inclusive porque foram coletados em propriedades vizinhas.

6. CONCLUSÕES

- Os indivíduos comparados apresentaram relativa divergência genética evidenciando distância dos genótipos analisados.
- Os marcadores RAPD mostraram-se consistentes na avaliação da variabilidade genética.
- O uso dos marcadores pôde comprovar sua eficiência através do uso de materiais conhecidos.
- 80 locos foram suficientes para obter uma análise de genótipos de 100% para a população de 30 indivíduos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher, 1971. 381p.
- ANTONINI, S.; CECCATO, R.; MENEGHIN, S.P.; URASHIMA, A.S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**. Curso de extensão universitária “Técnicas básicas de biologia molecular”, no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), Depto. Biotecnologia Vegetal/ Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). 2004.
- BARBOZA, G.E. e BIANCHETTI, L.B. **Three new species at Capsicum (Solanaceae) and a key to the wild species from Brazil**. Syst. Bot. 30; 863-871, 2005.
- BASSAM, B.J.; CAETANO ANOLLES, G.; GERSSHOFF, P.M. **Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels**. Analyt Biochem. 196: 80-83, 1991.
- BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547 p.
- BOSLAND, P. W. Breeding for quality in Capsicum. **Capsicum and Eggplant Newsletter**, 12: 25-31, 1993.
- BOSLAND, P. W. & VOTAVA, E.J. **PEPPERS: Vegetable and Spice Capsicums**. CABI Publishing, 1999, 20 4p.
- BOSLAND, P.W., VOTAVA, E.J. **Peppers: vegetable and spice Capsicum**. CABI publishing. New York. 1999. 66-83p.
- BRONDANI, C; BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; FERREIRA, M.E. **Development and mapping of Oryza glumaepatula – derived microsatellite markers in the interspecific cross Oryza glumaepatula x O.sativa**. Hereditas, v. 134, p. 59-71, 2001.
- BUSO, G.S.C. **Marcadores Moleculares e Análise Filogenética**. In: **Marcadores moleculares e análise filogenética e Utilização de DNA na análise filogenética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 7-10.

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: Embrapa Hortaliças. 2003, 49p.

CARVALHO, S.I.C. de; BIANCHETTI, L.B.; RIBEIRO, C.S. da C.; LOPES, C.A. **Pimentas do Gênero Capsicum no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2006, 23p.

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

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

COSTA, C.S.R. da; HENZ, G.P. (Org.) **Pimentas Capsicum spp. Botânica. Sistemas de Produção 2**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2007a. ISSN 1678-880x.

COSTA, L.F.; LOPES, M.T.G.; LOPES, R.; ALVES, S.R.M. **Polinização e fixação de frutos em Capsicum chinense Jacq.** Acta amazonica. 2008 p.361-364.

CUI, Z. et al., **Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars**. Crop Science, Saint Paul, v.41, p.1954-1967, 2001.

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

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development: Theor and technique**. New York: Macmillian Publication, 1987. v.1, 736p.

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

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2a . ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1995 220p.

FRITSCH, P. & RIESEBERG, L. H. **High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata***. Nature, 359: 1993 633- 636

FRITSCH, P. & RIESEBERG, L. H. **The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics**. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, 1996 p. 54-73.

HOFFMAN, L.V.; BARROSO, P.A.V. Marcadores moleculares como ferramentas para estudos de genética de plantas. **EMBRAPA Algodão**. Documentos, 147, 35p. Campina Grande-PB, 2006.

HUNZIKER, A. T. **Genera Solanacearum**. **Rugell**: A.R.G. Gantner Verlag. 500p. 2001.

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

LANNES, S. D.; FINGER, F. L.; SCHUELTER, A. R.; CASALI, V. W. D. **Growth and quality of Brazilian accessions of Capsicum chinense fruits**. Scientia Horticulturae. p.266-270, 2007.

LUZ, F. J. de F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (Capsicum chinense Jacq)**. (Tese de doutorado) – UNESP, Jaboticabal. 2007. 81p.

MALLICK M.F.R.; MASSUI, M. **Origin, distribution and taxonomy of melos**. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v.28, p.251-261, 1986.

MOSCONE EA; SCALDAFERRO MA; GRABIELE M; CECCHINI NM; GARCÍA YS; JARRET R; DAVIÑA JR; DUCASSE DA; BARBOZA GE; EHRENDORFER F. **The evolution of chili peppers (Capsicum – Solanaceae): a cytogenetic perspective**. Acta Horticulturae. p.137-169, 2007.

NASCIMENTO FILHO, H.R.; BARBOSA, R.I., LUZ, F.J.F. **Pimentas do gênero Capsicum cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira. II. Hábitos e formas de uso**. Acta Amazonica, v.37, p561-568, 2007.

NUEZ-VIÑALS, F.; DÍEZ, M.J.; RUIZ, J.J.; FÉRNANDEZ de CÓRDOVA, P.; COSTA, J.; CATALÁ, M.S.; GONZÁLEZ, J.A.; RODRIGUEZ, A. **Catálogo de semillas de pimienta**. **Ministério de Agricultura, Pesca y Alimentación** (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). Madrid. 108p. 1998.

POZZOBON MT; SCHIFINO-WITTMAN; BIANCHETTI LB. **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. p.259-269, 2006.

PICKERSGILL, B. **The domestication of chili peppers. The domestication and explotation of plantas and animals.** London, p.443-450, 1969.

PICKERSGILL, B. **Citogenetics and evolution of Capsicum L.** In: Tsuchia,T; Gupta, P.K. **Chromossome engineering plants: genetics, breeding evolution.** Amsterdam, p.139-160, 1991.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. (Org.). **Capsicum: Pimentas e pimentões no Brasil.**Brasília: **Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia.** Embrapa Hortaliças. 113p., 2000.

RIBEIRO CSC; HENZ GP. 2008. Processamento. In: RIBEIRO CSC; LOPES CA; CARVALHO SIC; HENZ GP; REIFSCHNEIDER FJB (Org.). **Pimentas Capsicum.** Brasilia: Embrapa Hortaliças, 2008, v.1, p. 157-171.

ROHLF, J.F. **NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2.** New York, Exeter Publications. 1992.

SAIKI, R.K.; BUGUWAN, G.T.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a semi-stable DNA polymerase,** Science, v.239, p. 487-494, 1988.

SMITH, P.G., HEISER, C.B. **Taxonomy of Capsicum chinense Jacq and the geographic distribution of the cultivated Capsicum species.** Bulletin of the Torrey Botanical Club. p.413-420, 1957.

TANKSLEY,S.D. **High Rates of cross-pollination in chile pepper,** HortScience, 19 (4): 580-582, 1984.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, F.G. **DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research, v.18, p.6531-6535, 1990.