

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, QUÍMICA E MOLECULAR EM
Capsicum chinense Jacq.

SÉRGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2008

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, QUÍMICA E MOLECULAR EM
Capsicum chinense Jacq.

SÉRGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas

Orientadora: Profa. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela biblioteca do **CCTA/UENF** 043/2008

Souza, Sérgio Alessandro Machado

Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq. / Sérgio Alessandro Machado Souza – 2008.
66f. :il.

Orientador: Telma Nair Santana Pereira

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

Bibliografia: f. 45 – 55.

1. Cariótipo 2. Viabilidade polínica 3. RAPD 4. Diversidade genética
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD - 635.64323
583.952

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, QUÍMICA E MOLECULAR EM
Capsicum chinense Jacq.

SÉRGIO ALESSANDRO MACHADO SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 28 de março de 2008

Comissão Examinadora:

Prof. Derly Jose Henriques da Silva (Dr Agronomia) – UFV

Prof. Alexandre Pio Viana (Dr Produção Vegetal) – UENF

Prof Messias Gonzaga Pereira (Ph. D., Melhoramento de Plantas) – UENF

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., Melhoramento de Plantas) – UENF
Orientadora

*A minha mãe, Juraci que nunca mediu esforços e incentivo para que todos os
meus anseios pudessem ser alcançados:
Ao meu pai, Frederico,
e as minhas irmãs:
Catiúscia e Juliana.
Dedico.*

AGRADECIMENTO

A DEUS.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À professora Telma Nair Santana Pereira, pela dedicação e orientação neste trabalho.

Ao professor Messias Gonzaga Pereira, pela co-orientação neste estudo.

Ao professor Alexandre Pio Viana, pelas sugestões na realização deste trabalho.

À técnica Vitória Régia, pelos ensinamentos e valiosas sugestões no laboratório de marcadores de DNA.

À Kellen Coutinho Martins, uma pessoa especial.

Aos colegas de república, Pedro, Marcos e Sávio.

Aos colegas de laboratório, Carlos, Daniella, Emanuelli, Fabiane, Hérica, Monique, Neuma e Pedro.

Aos amigos da UENF, Alessandra, Ana Paula, Aroldo, Beatriz, Cíntia, Deisy, Elba, Kenea, Lidiane, Luciléia, Patrícia, Rozana, Sarah e Tatiane

Às funcionárias da biblioteca do CCTA, Conceição e Vângela.

Ao Daniel, funcionário da secretaria do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	1
3.REVISÃO DE ITERATURA.....	4
2.2. Centro de origem e distribuição geográfica	5
2.3. Melhoramento genético	6
2.4. Caracterização citogenética	8
2.5. Viabilidade polínica.....	10
2.6. Caracterização química.....	11
2.7. Caracterização molecular	12
2.8. Diversidade genética	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material genético e condições de cultivo	16
3.2. Caracterização citogenética	18
3.4. Viabilidade polínica.....	19
3.5. Caracterização química.....	20
3.5.1. Teor de sólidos solúveis.....	20
3.5.2. Teor de vitamina C.....	20
3.6. Análise molecular via marcadores RAPD	20
3.6.1. Caracterização molecular	20
3.6.2. Preparo das amostras.....	21

3.6.3. Quantificação do DNA	22
3.6.4. Condições de amplificação	22
3.6.5. Seleção de iniciadores	22
3.6.6. Análise dos dados.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1. Caracterização citogenética	25
4.2. Viabilidade polínica.....	31
4.3. Caracterização química.....	34
4.4. Caracterização molecular.....	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

SOUZA, Sérgio Alessandro Machado; M.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março, 2008; Caracterização citogenética, química e molecular em *Capsicum chinense* Jacq. Orientadora: Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Messias Gonzaga Pereira.

Os estudos de caracterização e avaliação de germoplasma são importantes para o uso e conservação dos recursos genéticos. A caracterização pode ser feita a nível morfológico, agrônômico, bioquímico, citogenético, químico e molecular. Baseado nisto este estudo teve como objetivo, realizar uma caracterização citogenética, química e molecular em acessos de *C. chinense* conservados no banco de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Esta coleção tem acessos pertencentes as cinco espécies cultivadas com diferentes procedências. Este estudo foi realizado com 52 acessos de *C. chinense* procedentes dos estados do Rio de Janeiro (RJ), Maranhão (MA), Pará (PA) e Bahia (BA). A caracterização citogenética foi feita em quatro acessos dos 52, cada um representando um Estado, e a técnica empregada foi a de esmagamento e coloração com Giemsa. Os cromossomos foram mensurados e classificados de acordo com a razão entre braços e índice centromérico. A viabilidade polínica foi realizada com base na coloração tripla; os grãos de polens foram classificados baseados na coloração como viáveis (cor vermelho/-púrpura) e inviáveis (cor verde). A análise química baseou-se na determinação do teor de sólidos solúveis, usando refratômetro, sendo os valores expressos em grau brix (°Brix), e o teor de vitamina C foi determinado pelo método titulométrico de Tillmans. A diversidade genética entre os acessos foi realizada via marcadores moleculares RAPD. Pela análise citogenética confirmou-

se o número de cromossomos somáticos para a espécie ($2n=2x=24$) e observou-se que o acesso (UENF1740), procedente do RJ, apresentou o par 12 como cromossomo do tipo submetacêntrico, diferindo dos demais acessos analisados que apresentaram para este par a classificação de cromossomos acrocêntricos; este resultado caracteriza a existência de citótipos na espécie conforme já registrado por alguns pesquisadores de *Capsicum*. Os acessos utilizados no estudo apresentam uma taxa de viabilidade polínica alta, demonstrando uma potencialidade para a utilização em cruzamentos intra e interespecíficos. Quanto ao teor de vitamina C os melhores acessos foram UENF1706, UENF1757, UENF1763, UENF1768, UENF1770 e o UENF1778. Para grau Brix os acessos os melhores resultados foram observados em UENF1749, UENF1757, UENF1786 e o UENF1795; assim, esses acessos apresentam características desejáveis para a indústria alimentícia. A caracterização molecular via marcadores RAPD permitiu observar que os acessos analisados neste estudo apresentam um alto grau de similaridade, independente da procedência geográfica, sugerindo, dessa forma, que as diferenças genéticas entre eles são mínimas.

ABSTRACT

SOUZA, Sérgio Alessandro Machado; M.Sc.. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2008. Cytogenetic, chemical and molecular characterization in *Capsicum chinense* Jacq. Adviser: Telma Nair Santana Pereira. Committee Members: Alexandre Pio Viana and Messias Gonzaga Pereira.

Studies of germplasm characterization and evaluation are important for the use and conservation of genetic resources. The germplasm can be characterized by morphological, agronomic, biochemical, cytogenetic, chemical and molecular properties. This study had the purpose of a cytogenetic, chemical and molecular characterization of *C. chinense* accessions of the genebank of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). The collection contains accessions of the five cultivated *Capsicum* species from different origins. Fifty-two *C. chinense* accessions from Rio de Janeiro (RJ), Maranhão (MA), Pará (PA) and Bahia (BA) were used. Four of the 52 accessions, each from a different state, were characterized cytogenetically, using the technique of squashing and staining with Giemsa dye. The chromosomes were measured and classified based on the arm ratio and centromeric index. The pollen grain viability was determined by triple dye solution (red/purple-viable grain, green – non-viable grain). The chemical characterization was based on the soluble solids content expressed in degree brix (°Brix), determined by a refractometer, and the vitamin C content was determined by Tillman's titration method. The genetic diversity in accessions was evaluated by RAPD markers. The cytogenetic analysis confirmed the somatic chromosome number of the species ($2n=2x=24$). In the accession UENF1740 from RJ submetacentric chromosomes were observed in pair 12, differing from the other accessions with acrocentric chromosomes in this pair; this result identified the

existence of cytotypes in *C. chinense*, as reported elsewhere by some researchers of Capsicum. The pollen grain viability of the accessions used here was high, demonstrating the capacity for intra and inter specific crossings. The following accessions had the highest vitamin C contents: UENF1706, UENF1757, UENF1763, UENF1768, UENF1770, and UENF1778. The best results for Brix degree were observed in UENF1749, UENF1757, UENF1786 and UENF1795, i.e., the characteristics of these accessions are desirable for food industry. The molecular characterization by RAPD markers showed a high similarity degree in the accessions analyzed, regardless of the provenance, which indicates minimal genetic differences among them.

1.INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante centro de diversidade genética do gênero *Capsicum*, que compreende as pimentas e pimentões, com ampla variabilidade dessas espécies. Essas hortaliças estão difundidas em todas as Regiões do Brasil, sendo que as principais áreas de cultivo estão localizadas no Sudeste e Centro-oeste do país. Entretanto, mesmo o Brasil sendo reconhecido como *habitat* natural de várias espécies silvestres de pimentas do gênero *Capsicum*, ainda há pouco conhecimento biológico e ecológico sobre elas (Luz, 2007). No país são cultivados anualmente cerca de 13 mil ha de pimentas e pimentões, gerando uma produção estimada em 280 mil toneladas, sendo 2 mil ha ocupados com pimentas doces e picantes, sem contudo haver informação fidedigna sobre o volume produzido (Henz, 2004). Este autor relata que a produção brasileira ainda é incipiente quando comparada com a do cenário mundial; na China, por exemplo, a produção média de pimentas e pimentões é de 8,2 milhões de toneladas em uma área de aproximadamente 443.400 ha.

Os frutos de *Capsicum* podem ser consumidos na forma *in natura* ou processados (condimentos, conservas, corantes, etc) na composição de medicamentos e na confecção de aerossol de pimenta. A principal característica dos frutos de *Capsicum* é a pungência, conferida por substâncias denominadas de capsaicinóides. Outra característica importante dos frutos de *Capsicum* é a presença de vitaminas, como A e C, principalmente em frutos com alta pungência,

que pode variar entre 50 e 80% em comparação com os frutos pouco pungentes (Bosland, 1992).

Os recursos genéticos são componentes da biodiversidade, importantes ao desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria. Esses recursos são estratégicos para as pesquisas, principalmente em locais tidos como centro de diversidade de determinadas espécies, para que a diversidade sejam preservadas e utilizadas, colaborando também para o desenvolvimento tecnológico e econômico (Valois *et al.* 2001). Os estudos de caracterização e avaliação de germoplasma são essenciais para o uso e a conservação dos recursos genéticos. De um modo geral, a caracterização pode ser morfológica, agrônômica, bioquímica, citogenética e molecular (Valois *et al.* 2001).

A caracterização citogenética é uma das ferramentas disponíveis para a avaliação dos recursos genéticos vegetais, especialmente quando reportada na literatura variação intra-específica (citótipos) como é o caso do *Capsicum* (Moscone *et al.*, 2007). Estudos da diversidade genética via marcadores moleculares também têm auxiliado os trabalhos de caracterização, a qual é útil na identificação de genótipos, possibilitando, desta forma, a análise da variabilidade das espécies. A avaliação molecular é uma forma eficiente de se estudar a variabilidade genética dentro da espécie e entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres, esclarecendo as relações filogenéticas e colaborando na escolha de estratégias para o melhoramento, coleta de germoplasma, conservação e utilização de recursos genéticos (Nass *et al.*, 2001).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro possui em sua coleção de germoplasma cerca de 200 acessos de *Capsicum*, representantes de várias espécies, procedentes de várias regiões do Brasil e também de outros países. Trabalhos de caracterização com o objetivo de estimar a divergência genética têm sido realizados via descritores morfoagronômicos (Sudré *et al.*, 2005) e via marcadores moleculares (Costa *et al.*, 2006), análise da viabilidade polínica (Monteiro, 2007) e (Martins, 2007) e obtenção de híbridos interespecíficos também tem sido realizada com relativo sucesso (Campos, 2006).

Apesar da grande diversidade observada em *C. chinense*, poucas são as informações sobre a caracterização citogenética e molecular de acessos representantes dessa espécie. A espécie *C. chinense* é tida como a mais brasileira de todas as espécies de pimentas, o continente americano é

reconhecido como centro de origem das espécies de pimenta, e a Bacia amazônica como provável centro de diversidade da espécie *C.chinense* (Reifschneider, 2000). Em razão da importância dessa espécie, este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização citogenética e química de acessos de *Capsicum chinense* Jacq. de diferentes procedências geográficas e estimar a diversidade genética desses acessos via marcadores moleculares RAPD.

3. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Classificação botânica

Segundo Cronquist (1998), a classificação taxonômica mais correta para a descrição do gênero *Capsicum* é a seguinte:

Reino: Plantae

Divisão: Spermatophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Solanales

Família: Solanaceae

Gênero: *Capsicum*

De acordo com Pickergill (1991), existem aproximadamente 30 espécies de *Capsicum* divididas em domesticadas, semi-domesticadas e silvestres. Apenas cinco espécies são classificadas como domesticadas: *C. annuum* L. var. *annuum* (pimentão), *C. baccatum* L. var. *pendulum* (Wild.) (pimenta dedo-de-moça), *C. chinense* Jacq. (pimenta-de-cheiro), *C. frutescens* L. (pimenta malagueta) e *C. pubescens* Ruiz e Pavon. As espécies *C. buforum*, *C. cardenassi*, *C. coccineum*, *C. dimorphum*, *C. eximium*, *C. geminifolium*, *C. lanceolatum*, *C. minutiflorum*, *C. parviflorum*, *C. flexuosum*, *C. villosum*, *C. campylopodium*, *C. chacoense*, *C. ciliatum*, *C. cornutum*, *C. dusenii*, *C. galapagoense*, *C. hookerianum*, *C. leptopodium*, *C. mirabile*, *C. shottianum*, *C. tovarii*, *C. anomalum* e *C. brevifolium* são classificadas em semi-domesticadas e/ou silvestres.

O gênero *Capsicum* pode ser classificado em três grandes complexos, de acordo com a cruzabilidade entre as espécies: Complexo *annuum*, Complexo

baccatum e Complexo pubescens; cada um desses grupos compreende espécies que se cruzam facilmente. O Complexo *annuum* é representado pelas espécies: *C. annum* (variedades *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapagoensei* e *C. chinense*. As espécies *C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* e *pratermissum*) e *C. tovari* são representantes do Complexo *baccatum*. O Complexo *pubescens* compreende as espécies: *C. cardenassi*, *C. eximium* e *C. pubescens* (Pickergill, 1991).

A denominação da espécie *Capsicum chinense* Jacq. foi conferida pelo holandês Kikolaus von Jacquinomist e surgiu de um equívoco, pois pensava-se que essa 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 e Votava, 1999).

Segundo Smith e Heiser (1957), a espécie *C. chinense* caracteriza-se por ter folhas e ramos glabros, folhas ovadas 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 denteado 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, com diversidades de cores, por exemplo, salmão, laranja, amarela, vermelha ou marrom. A espécie *C. chinense* apresenta uma peculiaridade em relação às outras espécies de pimentas, o cálice possui uma constrição anelar localizada na sua união com o pedicelo (Casali e Couto, 1984; Carvalho *et al.*, 2003; Nuez-Viñals *et al.*, 2003).

2.2. Centro de origem e distribuição geográfica

De acordo com Heiser (1979), o cultivo de pimentas nas Américas é muito antigo. A domesticação acarretou mudanças nos frutos, os quais eram pequenos, eretos e decíduos, e tornaram-se maiores, não-decíduos e com uma grande diversidade de cores. Existem várias hipóteses sobre a região de domesticação das espécies de *Capsicum*. A hipótese mais aceita sugere que uma porção importante do gênero originou-se na região Sul-Central boliviana, com

subseqüentes migrações aos Andes e terras baixas da Amazônia (Mc Leod *et al.* 1982). Os mesmos autores relatam que as pimentas e pimentões têm sua origem na América tropical, com pelo menos um centro de origem na América do Sul, outro no México e distribuição por toda a América Latina. A distribuição natural das espécies silvestres e semidomesticadas restringe-se à região andina, compreendendo da Argentina até a América Central, e também regiões da Mata Atlântica e Amazônia brasileira. Acredita-se que todas as espécies de *Capsicum*, com exceção de *C. anonalum*, tiveram sua origem no Continente Americano (Viñals *et al.* 1998).

O Brasil é considerado um centro de diversidade secundário de espécies domesticadas de *Capsicum*, sendo um importante centro de diversidade genética de *C. annum* var. *annuum*, *C. bacatum*, *C. frutescens* e *C. chinense*, apresentando esta última sua maior diversidade na Bacia Amazônica (Moscone *et al.* 2007). Na Amazônia, o consumo de pimentas é muito comum na culinária local, principalmente de *C. chinense* devido a sua grande diversidade, talvez isto seja um indício de que tenha sido domesticada pelos índios, e é considerada a mais brasileira das espécies do gênero (Reifschneider, 2000).

Apesar da grande diversidade de *C. chinense* na Bacia Amazônica, há pouco interesse na conservação da espécie (Casali e Couto, 1984). Estes autores ainda relatam que a coleta e a conservação em bancos de germoplasma ou em coleções de trabalho em conjunto com a conservação *in situ* são as únicas atividades realizadas com o germoplasma de pimenta nativo da Amazônia.

2.3. Melhoramento genético

Segundo Luz (2007), os povos indígenas das Américas foram os primeiros a selecionar variedades de pimentas, a partir de ancestrais silvestres. O mesmo autor ainda ressalta que o conhecimento atual dessa cultura, que sempre fez parte da dieta dos silvícolas americanos, adquiriu grande relevância na culinária asiática com o passar do tempo.

No Brasil, apesar do uso comum, algumas espécies de *Capsicum* são desconhecidas ou ainda não caracterizadas morfológica e agronomicamente (Luz, 2007). Segundo Bianchetti (1996) essas espécies representam um material

genético que pode potencialmente ser empregado em programas de melhoramento.

A busca de variedades resistentes a doenças, principalmente a viroses tem sido o alvo preferencial dos melhoristas de *Capsicum*. Maior ênfase tem sido dada aos tipos “doces” em comparação aos pungentes. Híbridos F_1 , plantas haplóides e poliplóides e, inclusive, plantas com macho-esterilidade citoplasmática são ferramentas reais ou potenciais à disposição dos melhoristas de pimentas.

A base genética do gênero *Capsicum* não é tão estreita como em muitas outras culturas, e um grande número de variedades tropicais ainda não foi explorado (Heiser, 1979). As pimentas do gênero *Capsicum* são autógamas, embora a polinização cruzada realizada por abelhas e outros insetos possa chegar a 40%, bem acima dos 5% registrados em condições normais (Martín *et al.*, 1979).

Apesar de haver forte apelo para o melhoramento visando à resistência a viroses e outras doenças, considerável interesse tem sido expresso na busca de novas cultivares tendo os frutos como foco principal (tamanho, forma, teor de capsaicina, cor, firmeza, teor de vitamina, uniformidade da maturação), além da adaptação da planta para colheita mecânica (Martín *et al.*, 1979).

O melhoramento de pimentas no Brasil nunca atingiu a relevância dada à outra espécie de *Capsicum*, o pimentão. Segundo Reifschneider (2000), as pimentas mais plantadas no Brasil são consideradas variedades botânicas ou grupos varietais, com frutos bem definidos. As diferenças existentes dentro desses grupos estão relacionadas às diferentes fontes de obtenção de sementes. A cultivar Agrônômico 11 do tipo “Americana” e a cultivar Ubatuba do tipo “Cambuci” seriam exceções, por serem resultados de um programa de melhoramento desenvolvido pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC). Programa em andamento na Embrapa Hortaliças busca o desenvolvimento de cultivares de pimenta picante do tipo “Jalapeño”, para processamento industrial (Luz, 2007).

2.4. Caracterização citogenética

A caracterização citogenética de espécies tropicais amplia as perspectivas da conservação da diversidade vegetal de espécies comumente utilizadas em programas de melhoramento genético (Pereira *et al.*, 2006).

Como ferramenta de análise da diversidade, a taxonomia clássica baseia-se, em geral, apenas em caracteres morfológicos. No entanto, informações citogenéticas têm contribuído de forma complementar ou mesmo decisiva na reformulação de hipóteses filogenéticas e estudos de diversidade com base nos dados dos cromossomos, pois trata-se de um caráter bem conservado nas espécies (Lewis e Elvin-Lewis, 1995; Heslop-Harrison, 2000).

No estudo do cariótipo, variações cromossômicas numéricas e estruturais são de grande importância para análise citotaxonômica (Stace, 2000). Dados cariomorfológicos, tais como comprimento total cromossômico, posição do centrômero, presença de constrições, número de regiões organizadoras do nucléolo (NORs) e identificação de seqüências repetitivas, são caracteres úteis para diferenciar espécies (Stace, 2000). Além das técnicas convencionais, que permitem a obtenção de dados referentes à morfologia cromossômica, outras também são utilizadas para caracterizar individualmente os cromossomos do complemento.

Nos últimos anos, a citogenética alcançou importantes progressos relacionados ao desenvolvimento da biologia molecular, o que permitiu o aparecimento de novas e diversificadas técnicas citológicas, como a hibridização fluorescente *in situ* ou FISH (Pedrosa *et al.*, 2002), a hibridização genômica *in situ* ou GISH (Poggio *et al.*, 2005) e a microdissecção cromossômica (Forminaya *et al.*, 2005). Essas técnicas vêm permitindo um detalhamento minucioso dos cariótipos, permitindo o reconhecimento de pequenas variações cromossômicas, difíceis de serem detectadas com técnicas convencionais. Contudo, o alto custo de determinados reagentes e dos equipamentos de laboratório torna restritas suas aplicações a grupos com interesse econômico já comprovado. Desse modo, a variabilidade em número e a morfologia cromossômica continuam sendo amplamente utilizadas nas análises citogenéticas (Guerra, 2000).

O estudo morfológico dos cromossomos permite comparações entre categorias taxonômicas relacionadas, com mesmo número cromossômico, e

assim detectar possíveis variações existentes, principalmente no comprimento dos cromossomos, na posição do centrômero, na presença de satélites e constrições secundárias, e permite ainda inferir sobre o conteúdo de DNA comparando-se o tamanho absoluto dos cromossomos (Mayeda, 1997). O mesmo autor também relata que, além disso, a análise do cariótipo permite observar a existência ou não de rearranjos estruturais dos cromossomos, uma vez que variações morfológicas podem admitir diferentes alterações ao nível de cromossomos.

A citogenética também pode estar relacionada diretamente a estudos da biologia reprodutiva pela análise do índice meiótico, em que a meiose é considerada o mais importante evento entre os processos de diferenciação dos organismos, sendo o principal responsável pelo sucesso evolutivo da reprodução sexuada em eucariotos (Holliday, 1984). Na meiose, são produzidas células haplóides que permitem que, após a fecundação, o número de cromossomos permaneça igual ao dos genitores. É durante a meiose que ocorre também a recombinação dos genes, evento de máxima importância na adaptação das populações e evolução (Guerra, 1988).

Os estudos citogenéticos do gênero *Capsicum* estão relacionados principalmente à determinação do número cromossômico para muitas espécies. Otha (1962) analisou o número de cromossomos de algumas espécies de *Capsicum* e Pickersgill (1971), publicou um trabalho em que, analisou a morfologia dos cromossomos de espécies cultivadas e silvestres de *Capsicum*. Paralelamente, nas pesquisas de inúmeros autores, foi encontrada uma diferença em relação ao número básico de cromossomos dentro do gênero *Capsicum*. De acordo com Moscone (1990, 1993), Pickersgill (1991), Guerra (2001) e Pozzobon *et al.* (2006), o número de cromossomos do gênero *Capsicum* é $2n=2x=24$, mas algumas espécies silvestres, por exemplo, *C. buforum*, *C. capylopodium* e *C. cornutum*, possuem $2n=2x=26$ cromossomos.

Diferenças na morfologia ou no número de cromossomos ocorrerem em populações da mesma espécie ou em taxa interespecíficos; essas alterações nesses espécimes, são denominadas de citótipos ou raças cromossômicas. De acordo com Moscone *et al.*, (2007), o gênero *Capsicum* apresenta diferentes citótipos, e esses diferem principalmente na fórmula cariotípica e no comprimento dos cromossomos.

Em relação à morfologia cromossômica, observa-se que pode ocorrer uma divergência na sua. Os cromossomos de *Capsicum* podem variar de 11 pares de cromossomos metacêntricos e um submetacêntrico a 12 pares de cromossomos metacêntricos (Moscone, 1990, 1993; Pickersgill, 1991; Guerra, 2001; Pozzobon *et al.* 2006).

2.5. Viabilidade polínica

A viabilidade polínica é um dos fatores que têm influência direta sobre o sucesso da fertilização, uma vez que o tamanho do fruto, o número de sementes e a percentagem de frutos aumentam se uma quantidade de grãos de pólen viáveis acima do requerido for depositada sobre o estigma (Akamine e Girolami, 1957, Stone *et al.*, 1995; Rodrigues-Riano e Dafni, 2000; Rigamoto e Tyagi, 2002). De acordo com Alexander (1980), estudo sobre a viabilidade polínica contribui para estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo e é muito empregada no monitoramento do grão de pólen, de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos de potencial econômico com floração em épocas distintas.

Fatores climáticos, como a temperatura baixa e a umidade relativa do ar, durante o florescimento, podem inibir a abertura das flores, prejudicando a germinação do grão de pólen e o desenvolvimento do tubo polínico (Lima Filho *et al.*, 2002). Evidencia-se assim, a importância de estimar a viabilidade polínica de espécies de interesse no melhoramento vegetal.

Considerando a importância de se conhecer o potencial reprodutivo da planta várias técnicas foram definidas visando sempre à eficiência do método em definir com rapidez e precisão a viabilidade polínica (Dafni, 1992).

Um método comum para avaliar a viabilidade polínica é o método de coloração e contagem direta (Kelly *et al.*, 2002). Segundo os mesmos autores uma grande variedade de corantes tem sido usada para testar a viabilidade do grão de pólen, mas poucos estudos testaram o risco potencial destes corantes em corar grão de pólen morto e produzir falso positivo. Os corantes nucleares e vitais mais comumente utilizados são o corante de Alexander, acetocarmim, azul de

anilina em lactofenol e sais do tetrazolio (Rodrigues-Riano e Dafni, 2000; Kelly *et al.*, 2002).

Techio *et al.* (2006) relatam que as análises usando a coloração tripla de Alexander parecem fornecer dados mais acurados sobre a viabilidade do grão de pólen, pois se obtém coloração diferencial dos grãos de pólen viáveis e inviáveis, devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, os quais apresentam coloração reversa. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado pela fucsina ácida. Desta maneira, por não apresentarem protoplasma, os grãos-de pólen abortados coram-se de verde e os viáveis adquirem uma coloração púrpura (Alexander, 1980). Há outras técnicas, porém em uso rotineiro de laboratório é necessário que a técnica seja eficaz, prática e fácil de manusear; a coloração tripla de Alexander (Alexander, 1969) apresenta todos esses quesitos.

2.6. Caracterização química

A qualidade dos frutos é atribuída aos caracteres químicos que respondem pela presença de vitaminas, sólidos solúveis totais, acidez, açúcares redutores, entre outros. Essas características estão relacionadas ao conjunto de atributos referentes ao sabor e valor nutritivo. (Chitarra e Chitarra, 1990).

De acordo com Chaves *et al.* (2004), os sólidos solúveis totais são usados como índice de maturidade para alguns frutos e indicam a quantidade de substâncias que se encontra dissolvida, sendo constituídos na sua maioria por açúcares.

O teor de sólidos solúveis sido usado como indicador da qualidade dos frutos, sendo de grande importância tanto para o consumo *in natura* como para o processamento industrial, visto que elevados teores desses constituintes na matéria-prima implicam menor adição de açúcares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em maior economia no processamento (Silva, *et al.*, 2002).

Os carotenóides estão associados à cor vermelha e à presença de ácido ascórbico nos frutos de *Capsicum* (Simões *et al.*, 2004). Os capsaicinóides são produzidos em um tecido interno do ovário denominado placenta, ao longo do qual são dispostas as sementes, sendo os componentes principais, responsáveis

pelo sabor picante e também pelas atividades biológicas atribuídas às pimentas (até 1% na matéria seca do fruto), sendo a capsaicina e a dihidrocapsaicina os mais importantes.

As vitaminas mais importantes encontradas nos frutos de pimenta são A, B1, B2, C e E. A vitamina C (ácido ascórbico) se encontra em maiores concentrações em frutos mais pungentes, com valores próximos a 250 mg por 100 gramas de fruto fresco; valores comparáveis ao da goiaba, e inferiores ao da acerola (1800 mg) e camu-camu (3000 mg), mas superiores ao da laranja (60 mg por 100 gramas de polpa) (Bosland e Votava, 2000) .

A coloração dos frutos de *Capsicum* está relacionada diretamente à concentração de vitamina C; os frutos de cor branca, preta e roxa apresentam baixos teores de vitamina C em comparação com frutos de coloração vermelha, amarela e laranja (Simonne *et al.*,1997).

2.7. Caracterização molecular

A importância da caracterização molecular para o melhoramento reside no fato de que cruzamentos envolvendo progenitores geneticamente diferentes são os mais convenientes para produzir alto efeito heterótico e, também, maior variabilidade genética em gerações segregantes (Rao *et al.*, 1981).

Segundo Konstantinov *et al.* (2005), aplicações de marcadores moleculares em coleções de germoplasma incluem: identificação e verificação de acessos coletados, detecção de duplicatas, análise de pureza genética, análise de diversidade genética, construção de coleções de base e seleção de genes de interesse agrônomico. Além disso, os marcadores moleculares podem ser usados para monitoramento da viabilidade e mudanças genéticas decorrentes de armazenagem em baixa temperatura por longo tempo e avaliação da estrutura e função do genoma em processos evolucionários nas plantas cultivadas.

Ferreira e Grattapaglia (1998) citam que a caracterização molecular do germoplasma pode auxiliar o melhorista na seleção de progenitores dentro de populações básicas, objetivando o estabelecimento de programas de melhoramento. Os mesmos autores ainda relatam que, uma vez caracterizado o germoplasma disponível, o melhorista pode escolher genotipicamente os genitores dos cruzamentos, tanto com o objetivo de maximizar a segregação de

genes de importância agrônômica como o de restringir essa segregação a poucos genes, e com a escolha dos genitores será possível identificar os recombinantes desejáveis. De acordo com Veira e Nodari (2007), os marcadores genéticos baseados na análise direta da molécula de DNA detectam alto nível de polimorfismo e permitem acesso a uma ampla região do genoma.

Com o desenvolvimento da técnica de PCR, foram criados métodos que se baseiam na amplificação do DNA genômico a partir de iniciadores que detectam polimorfismo específico de fragmentos de DNA. Dentre eles, os mais conhecidos e utilizados são RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA* – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Williams *et al.*, 1990) e AFLPs (*Amplified Restriction Fragment Polymorphism* – polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (Vos *et al.*, 1995).

A técnica de RAPD tem como característica ser um marcador dominante, isto é, identifica o alelo dominante pela presença de banda, e o alelo recessivo, pela ausência de banda; a utilização da técnica tem sido bastante atrativa por ser simples, de modesto custo, possibilitando gerar um grande número de marcadores em pouco tempo. Essa técnica também tem a vantagem de, mesmo sem o conhecimento prévio do genoma, requerer pouca quantidade de DNA por análise (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores RAPD têm sido utilizados no melhoramento de plantas para identificar ao acaso regiões do genoma. Esses marcadores podem detectar rapidamente grande número de polimorfismo genético, por isso têm sido bastante utilizados na construção de mapas genéticos em um número significativo de espécies, como *Malus domestica* (Hemmat *et al.*, 1997); *Citrus spp* (Cristofani *et al.*, 1999); *Actinidia spp* (Testolin *et al.*, 2001); *Mangifera indica* (Kashkush *et al.*, 2001) e *Prunus persica* (Chaparro *et al.*, 1994).

A caracterização morfológica de pimentas é feita com descritores estabelecidos pelo IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), entretanto, outras metodologias têm sido empregadas para a caracterização de germoplasma de pimenta. Estudos relacionados com a análise da diversidade genética e a evolução do grupo das pimentas estão sendo realizados com base não só na morfologia da planta, mas na citologia e no DNA genômico. Tais estudos, em geral, têm ratificado a identificação prévia das espécies por meio da morfologia floral (Prince *et al.*, 1995).

Segundo Teixeira (1996), ao estudar aspectos morfológicos e moleculares de acessos silvestres e domesticados de *Capsicum* do Brasil, concluiu-se que a análise molecular apresentou maior contribuição para a discriminação dos acessos em relação à caracterização morfológica. As relações evolutivas entre e dentro das espécies de *Capsicum* foram investigadas por meio de marcadores morfológicos, citogenéticos e moleculares, demonstrando sempre, segundo Corona-Torres *et al.* (2000), que o nível de variação entre as pimentas domesticadas seria menor que entre as espécies silvestres.

Buso *et al.* (2001) utilizaram marcadores moleculares RAPD para avaliar a relação genética entre espécies silvestres do gênero *Capsicum* coletadas na Mata Atlântica e espécies cultivadas de pimenta, cujos resultados indicaram uma alta similaridade entre acessos da espécie *C. chinense* e, no geral, uma baixa similaridade entre as espécies silvestres e as cultivadas, além de relatarem que o arranjo dos acessos dentro de cada grupo de espécie cultivada parecia refletir os dados de origem, revelando uma provável estruturação geográfica.

Costa *et al.* (2006) avaliaram a diversidade genética de acessos do gênero *Capsicum* pertencentes ao banco de germoplasma da UENF, utilizando marcadores moleculares RAPD e verificaram uma ampla diversidade no gênero e que a espécie *C. chinense* apresenta alta similaridade com a espécie *C. frutescens*.

2.8. Diversidade genética

Segundo Cruz e Carneiro (2003), o procedimento de avaliação da diversidade genética via marcadores moleculares utiliza variáveis binárias, sendo avaliadas a presença e a ausência de marcas. Assim os coeficientes de similaridade são obtidos pela coincidência ou não de bandas entre pares de indivíduos.

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista por quantificarem e informarem o grau de semelhança ou de diferença entre pares de genótipos. Entretanto, quando o número de acessos é relativamente grande, torna-se inviável o reconhecimento de grupos homogêneos pelo exame visual das estimativas de distância. Devido a isto os acessos semelhantes são reunidos com o uso de técnicas de agrupamento, em que a união se dá pela classificação de

acessos em vários grupos, de forma que exista homogeneidade entre esses grupos, ou seja, o grupo original é dividido em vários grupos, seguindo o critério de similaridade ou de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2003).

O método de ligação média entre os grupos (UPGMA) é o mais utilizado em diversidade, tendo uma vantagem sobre os demais por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os genótipos (Cruz e Carneiro, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material genético e condições de cultivo

Cinquenta e dois acessos de *C. chinense*, pertencentes à coleção da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), provenientes das Regiões Norte, Nordeste e Sudeste (Tabela 1), foram cultivados na Unidade de Apoio à Pesquisa do Centro de Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

As sementes foram plantadas em casa de vegetação no mês de maio de 2007, em bandejas de isopor, em substrato vegetal Plantmax[®], depois de transplantadas para vasos de 5 L utilizando-se o mesmo tipo de substrato vegetal. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações da cultura da pimenta segundo Filgueira (2000).

Tabela 1 - Relação dos 52 acessos de *C. chinense* pertencentes à coleção de *Capsicum* da UENF

Número	Acesso	Procedência
01	UENF1703	Viçosa-MG
02	UENF1706	Viçosa-MG
03	UENF1798	Campos dos Goytacazes-RJ
04	UENF1739	Itaguaí-RJ
05	UENF1749	Campos dos Goytacazes-RJ
06	UENF1736	São Domingos do Norte-ES
07	UENF1753	Ilhéus-BA
08	UENF1721	Ilhéus-BA

Tabela 1, cont.;

09	UENF1722	Ilhéus-BA
10	UENF1723	Ilhéus-BA
11	UENF1725	Ilhéus-BA
12	UENF1726	Ilhéus-BA
13	UENF1756	Ilhéus-BA
14	UENF1757	Ilhéus-BA
15	UENF1758	Ilhéus-BA
16	UENF1744	Marajó Soure-PA
17	UENF1745	Marajó Soure-PA
18	UENF1746	Marajó Soure-PA
19	UENF1748	Marajó Soure-PA
20	UENF1759	Belém-PA
21	UENF1761	Belém-PA
22	UENF1762	Belém-PA
23	UENF1763	Belém-PA
24	UENF1764	Belém-PA
25	UENF1765	Belém-PA
26	UENF1766	Belém-PA
27	UENF1767	Belém-PA
28	UENF1768	Belém-PA
29	UENF1770	Belém-PA
30	UENF1742	Belém-PA
31	UENF1743	Belém-PA
32	UENF1772	Bequimão-MA
33	UENF1774	Bequimão-MA
34	UENF1778	Bequimão-MA
35	UENF1781	Bequimão-MA
36	UENF1782	Bequimão-MA
37	UENF1708	São Luís -MA
38	UENF1709	São Luís -MA
39	UENF1713	São Luís -MA
40	UENF1784	São Luís -MA
41	UENF1787	São Luís -MA
42	UENF1788	São Luís -MA
43	UENF1791	São Luís -MA
44	UENF1792	São Luís -MA
45	UENF1793	São Luís -MA
46	UENF1785	São Luís -MA
47	UENF1786	São Luís -MA

Tabela 1, cont.;

48	UENF1751	Parintins-AM
49	UENF1795	São Luís -MA
50	UENF1796	São Luís -MA
51	UENF1797	São Luís -MA
52	UENF1799	São Luís -MA

3.2. Caracterização citogenética

As sementes dos acessos 05 (UENF1749), 07 (UENF1753), 20 (UENF1759) e 37 (UENF1708) foram colocadas para germinar em recipientes de 500 mL contendo substrato Plantmax[®] e, após 15 dias, surgiram as primeiras raízes emergentes. Os meristemas foram coletados e pré-tratados com paradiclorobenzeno (PDB), por 4 horas e 30 minutos a 10 °C, de acordo com Sharma e Sharma (1999). Após o pré-tratamento, as pontas de raízes foram lavadas três vezes em água destilada, fixadas em solução de Carnoy – etanol e ácido acético (3:1) e, depois, conservadas em freezer a -4 °C, para utilização posterior. No momento do preparo da lâmina, os meristemas fixados foram lavados com água destilada por cinco minutos, para a retirada do excesso da solução de fixação e, em seguida, foram submetidos à hidrólise em HCl 1N pré-aquecido a 60 °C, durante 10 minutos; após a hidrólise, as pontas foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Lâminas temporárias foram preparadas colocando-se uma ponta de raiz em uma lâmina limpa que foi macerada suavemente sob uma lamínula. Posteriormente, a lamínula foi retirada com o auxílio do nitrogênio líquido. Em seguida, foi depositada, sobre o macerado, uma gota de solução de Carnoy, e a lâmina foi colocada para secar em temperatura ambiente. Finalmente, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 2% (água destilada), por 15 minutos, e posteriormente lavadas e submetidas à secagem à temperatura ambiente. As lâminas foram observadas em microscópio *Olympus BX60*, e as imagens, capturadas e analisadas utilizando-se o programa *Image-Pro Plus* versão 5.1.

Cinco placas metafásicas foram utilizadas para a mensuração dos cromossomos; essa mensuração foi feita utilizando o Programa *MicroMeasure* 3.3 (Reeves e Tear, 2000). Foram mensurados: comprimento total do cromossomo

(μm) e comprimento do braço longo e do braço curto. Com base nesses dados foi estimada a razão entre braços ($r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$), o comprimento do lote haplóide (CLH = somatória dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos) e o índice centromérico (ic), que é obtido pela razão entre o comprimento do braço curto do lote haplóide em relação ao comprimento absoluto do cromossomo.

Os cromossomos foram classificados em metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico, com base na razão entre braços (r) e no índice centromérico (ic) de acordo com Guerra (1986), que classifica os cromossomos em metacêntrico ($r=1,00 - 1,49$ e $ic=50,0 - 40,1$), submetacêntrico ($r=,50 - 2,99$ e $ic 40,0 - 25,1$), acrocêntrico ($r=3,00 - \infty$ e $ic=25,0 - 0,01$) e telocêntrico ($r= \infty$ e $ic=0$).

Apartir desses dados foi montado um ideograma para cada acesso. Para determinação dos cromossomos homólogos, foi observado o tamanho absoluto, a relação entre braços e o índice centromérico. Na montagem do ideograma, os cromossomos homólogos foram numerados de 1 a 12, segundo a ordem decrescente de tamanho.

3.4. Viabilidade polínica

Para a análise da viabilidade polínica, botões florais na antese foram coletados e fixados em solução de Carnoy e armazenados em freezer ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento do preparo das lâminas. Posteriormente, as anteras foram maceradas em gotas da solução tripla de Alexander composta pelos corantes orange G, fucsina ácida e verde malaquita (Alexander, 1969). A presença de grãos de pólen viáveis/férteis foi detectada pela presença da cor vermelha ou púrpura, enquanto grãos de pólen inviáveis/estéreis pela coloração verde. Foram analisadas oito lâminas/acesso e 250 grãos de pólen/lâmina totalizando 2000 grãos de pólen/acesso.

A análise dos dados da viabilidade polínica foi realizada por intervalo de confiança para proporção com auxílio do programa GENES, empregando o método de amostragem simples ao acaso (Cachoran, 1995).

3.5. Caracterização química

3.5.1. Teor de sólidos solúveis

A determinação do teor de sólidos solúveis foi realizada por meio de refratômetro, e os valores foram expressos em grau brix (°Brix). Cinco frutos frescos foram macerados, sendo recolhida uma amostra de suco de cada acesso e aplicada sobre o refratômetro para a realização da leitura (Martinsen e Schaare, 1998).

3.5.2. Teor de vitamina C

O teor de vitamina C foi determinado pelo método titulométrico de Tillmans, descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Dois gramas da polpa do fruto foram macerados em solução ácida. Nessa solução, foram dissolvidos 30 g de ácido metafosfórico e 80 ml de ácido acético por litro. Esse macerado foi filtrado e titulado em solução de Tillmans.

Os dados referentes às características químicas vitamina C e TSS foram submetidos à análise de variância, testando-se por meio do teste F a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa GENES (Cruz, 2001).

3.6. Análise molecular via marcadores RAPD

3.6.1. Caracterização molecular

A caracterização molecular dos acessos foi realizada mediante o emprego da técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990), no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes-RJ.

3.6.2.Preparo das amostras

O DNA genômico dos acessos foi extraído utilizando-se a metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Cinco folhas jovens de cada acesso foram coletadas, identificadas, acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -70 °C. Posteriormente os acessos foram macerados e, depois transferidos para microtubos (2,0 ml) devidamente identificados. Após a maceração, foram adicionados 800 µL de tampão de extração (CTAB em concentração final de 1% NaCl - 1,4 M, EDTA – 20 mM, Tris-HCl (pH=8) – 100 mM, polivinilpirrolidona sólido (PVP) - 1%, β-Mercaptoetanol - 0,1%, proteinase K e água) e, posteriormente, incubados em banho-maria a 65 °C por 45 minutos; os microtubos foram agitados por intervalos de 10 minutos. Decorrido o período no banho-maria, reduzida a temperatura, foram centrifugados por cinco minutos a 13200 rotações por minutos (rpm) (microcentrífuga Eppendorf® 1435D). Após a centrifugação, coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para novos microtubos (1,5 mL) devidamente identificados.

Para efetuar a desproteinização, foram realizadas três extrações orgânicas com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Nesse processo, acrescentaram-se 800 µL de solvente, centrifugou-se a 13200 rpm por 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante. Sobre o volume coletado, foram acrescentados 700 µL de álcool isopropílico gelado, causando a precipitação dos ácidos nucléicos e, em seguida as amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) por 12 horas. Na sequência, centrifugou-se esse material novamente, por 10 minutos, a 13200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* duas vezes com álcool etílico a 70% e uma, a 95%, deixando secar por um intervalo de 20 minutos. O *pellet* foi ressuspensão com 200 µL de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8) contendo RNase na concentração final de 4,0 µl/mL. A seguir, essa solução foi incubada a 37 °C em banho-maria por 30 minutos e, posteriormente, adicionaram-se 40 µL de NaCl (2,5M) na proporção de 1:10 (NaCl: DNA ressuspensão) e 150 µL de álcool isopropílico que foram mantidos a 4 °C durante 12 horas. Depois, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13200 rpm, lavadas em etanol, nas concentrações citadas posteriormente, e ressuspensas em um volume final de 100 µL.

3.6.3. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose a 0,8%, sobre o qual 10 µl de cada amostra composta de 2 µl da amostra de DNA genômico, 3 µl de corante e 5µL de água ultrapura, foram aplicados sobre o gel, comparando-se com quantidades conhecidas de 10, 25, 50, 75 e 100 nanogramas (ng) do DNA do fago λ. Após essa comparação, as amostras foram padronizadas na concentração de 7,5 nanogramas por microlitro (ng/µL).

3.6.4. Condições de amplificação

O protocolo para as reações de RAPD consistiu na amplificação de uma solução de 20 µL, que continham, em uma concentração final, 18,5 µL de água ultrapura, solução tampão com sulfato de amônio (NH₄SO₄), MgCl₂ – 2mM, uma unidade da enzima Taq DNA polimearase, 7,5 ng de DNA genômico, 1,0 µL de cada um dos desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e 2,0 µL de oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) com 10 bases.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Gen Amp-PCR System 9700. Após permanecerem por quatro minutos a 94 °C, 45 ciclos foram efetuados da seguinte forma: um minuto a 94 °C, dois minutos a 35°C e um minuto a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 4%, sendo posteriormente corados com brometo de etídio na concentração de 2 mg.L⁻¹.

3.6.5. Seleção de iniciadores

A seleção de iniciadores teve como base a utilização de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados em trabalhos anteriores (Lannes, 2005, Costa *et al.* 2006 e Campos 2006). Os oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas seqüências se encontram na Tabela 2. Uma seleção prévia de iniciadores pode evitar o desperdício de tempo e reagentes.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores (*Primer*) de RAPD utilizados na detecção de diversidade genética entre os acessos de *C. chinense*

Primer	Seqüência (5' → 3')	Primer	Seqüência (5' → 3')
A-01	CAGGCCCTTC	AA-17	GAGCCCGACT
A-03	CAGCCGAGAA	AB-05	CCCGAAGCGA
A-05	AGGGGTCTTG	AB-11	GTGCGCAATG
A-08	GTGACGTAGG	AB-17	TCGCATCCAG
A-15	TTCCGAACCC	AE-03	CATAGAGCGG
A-18	AGGTGACCGT	AF-02	CAGCCGAGAA
A-19	CAAACGTCGG	B-12	CCTTGACGCA
AA-02	GAGACCAGAC	B-18	CCACAGCAGT

3.6.6. Análise dos dados

A composição de grupos formados por acessos mais similares entre si foi determinada pelos métodos de otimização de Tocher (Rao, 1952) e pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA), utilizando o índice de similaridade de Jaccard, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2001).

O agrupamento dos acessos por meio do método de otimização de Tocher consiste na identificação do par mais similar dentro da matriz de dissimilaridade, isto é, aquele com menor estimativa de distância. Esses genótipos formaram o primeiro grupo e, a partir deste, foi avaliada a possibilidade de inclusão de novos genótipos no grupo, adotando o critério de que a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo (Cruz e Carneiro, 2003). O método de ligação média entre grupos (UPGMA) é um agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico, sem superposição, com base na média aritmética. Neste método, a distância entre dois agrupamentos é a distância média entre todos os pares de observações, um em cada agrupamento.

De acordo com Cruz e Carneiro (2003), devido ao fato de haver vários tipos de médias, métodos de ligações médias foram propostos, entre os quais o UPGMA, um método não ponderado de agrupamento aos pares, que utiliza

médias aritméticas das medidas de dissimilaridades e que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos (máximos e mínimos) entre os genótipos com maior similaridade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização citogenética

Com base nas metáfases analisadas, observou-se que todos os acessos apresentavam $2n=24$ cromossomos (Figura 1 e 2), conforme registrado para a espécie *C. chinense* (Carluccio e Saccardo, 1977; Pickersgill, 1977; Limaye e Patil, 1989; Bertão, 1993; Moscone *et al.*, 1995; Ferreira, 1998).

A coloração com Giemsa foi eficaz na coloração dos cromossomos ao permitir uma melhor visualização das estruturas por ter uma coloração mais intensa proporcionando um maior contraste em espécies que apresentam cromossomos de tamanho que varia do pequeno ao médio (Aarestrup, 2001; Guerra e Souza, 2002).

Os acessos analisados apresentaram cariótipos com cromossomos variando de 2,59 μm a 4,12 μm . De acordo com Guerra (2001), os cromossomos de *C. chinense* variam de 2,1 μm a 4,5 μm . Moscone (1990, 1993) demonstra que o tamanho dos cromossomos de *C. chinense* varia em média de 3 a 3,5 μm .

O acesso (UENF1749) apresentou a fórmula cariotípica $11M+SB$ (11 pares de cromossomos metacêntricos e um par submetacêntrico); e os acessos (UENF1753), (UENF1759) e (UENF1708) apresentaram uma fórmula cariotípica $11M+11A$ (11 pares de cromossomos metacêntrico e um par acrocêntrico). Esses acessos estão representados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7, e os respectivos ideogramas na Figura 2 (A, B, C, D). De acordo com Guerra (2001), o cariótipo de *C. chinense* apresenta 11 pares de cromossomos metacêntricos e um par de cromossomos submetacêntrico, ou um par de cromossomos acrocêntricos.

Não foram observadas diferenças entre os comprimentos totais dos cromossomos dos acessos, como mostra o resumo da análise de variância (Tabela 3). As variações no comprimento dos cromossomos nas espécies de *Capsicum* podem ser atribuídas a diferenças significativas no grau de compactação e espiralização (Limaye e Patil, 1989) ou em razão da diferença entre os cariótipos de *C. chinense*, à frequência de cruzamentos naturais que ocorre na espécie (Pickersgill, 1977). Datta (1968) e Kuriachan (1981) relatam que variações entre o cariótipo de espécies do mesmo gênero podem ser maiores do que a que ocorre entre gêneros distintos.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o comprimento total dos cromossomos dos acessos

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F
Acessos	3	125,34	3,11 ^{ns}
Resíduo	16	40,18	
Total	19		
coeficiente de variação (%)	9,52%		

^{ns} não significativo a 5% de probabilidade

Segundo Moscone (1990) e Cid e Palomino (1996), diferenças entre o cariótipo da mesma espécie devem-se a variações genéticas entre populações, gerando distintas cariotípicas intra-específicas em consequência de diferentes rearranjos estruturais. Moscone *et al.* (2007) ressaltam que a presença de citótipos em *C. chinense* ocorre devido a alterações cromossômicas, como deleções e translocações.

Guerra (2001) não observou diferença em relação ao número de cromossomos, ao analisar diferentes espécimes de *C. chinense* oriundos da Venezuela, mas os mesmos apresentaram diferença morfológica em apenas um par cromossômico onde alguns apresentaram um par de cromossomos submetacêntricos e outros, um par de cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos.

Segundo Lefebvre *et al.* (1995), o número cromossômico $2n=24$ é muito conservado evolutivamente, na família Solanaceae, tem se questionado também

se o número de genes também permanece conservado, pois há pouca ou nenhuma variação dentro de determinados gêneros, como, por exemplo, o gênero *Capsicum*.

Espécies cultivadas de *Capsicum*, tais como *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* foram analisadas, e em todas elas o número cromossômico tem sido reportado como $2n=24$. Variação de tamanho entre o cromossomo mais longo e o menor tem sido observada em *C. chinense* e *C. annuum* (Limaye e Patil, 1989). Os mesmos autores ainda relatam que essas variações em espécies silvestres, como, por exemplo, *C. chacoense* e *C. pubescens*, são relativamente raras por causa de suas ocorrências serem restritas aos seus centros de origem.

Bertão (1993) determinou que o cariótipo padrão em espécies de *Capsicum*, que apresentam $2n=24$ cromossomos, é representado por 11 pares de cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e um par subterminal (ou seja, acrocêntrico ou telocêntrico). Entretanto, Moscone *et al.* (1996) caracterizam o cariótipo com 11 pares de cromossomos metacentricos e um par de cromossomos submetacêntricos ou subtelo-cêntricos, segundo a classificação de Levan *et al.* (1964).

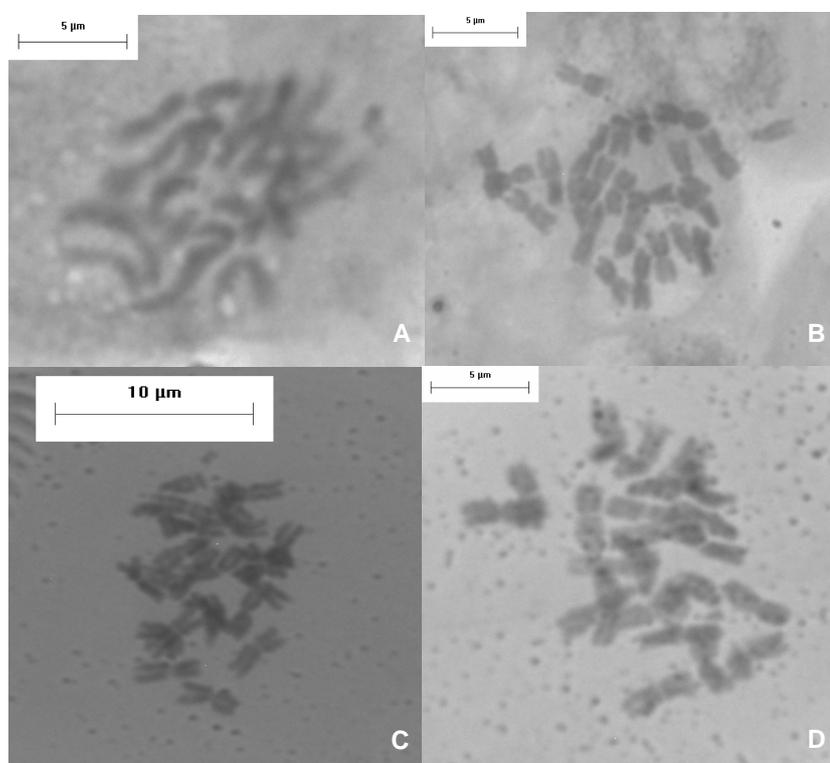


Figura 1 - Cromossomos metafásicos dos acessos de *C. chinense*, (A) UENF1753, (B) UENF1759, (C) UENF1749 e (D) UENF1708.

Tabela 4 - Dados morfométricos dos cromossomos metafásicos do acesso UENF1749 (*C. chinense*)

Par cromossômico	Comprimento (μm)			r	ic	classe
	Braço		Total			
	curto	longo				
1	1,92	2,13	4,05	1,10	47,4	M
2	1,87	2,00	3,87	1,06	48,3	M
3	1,77	2,01	3,78	1,13	46,8	M
4	1,73	1,96	3,69	1,14	46,8	M
5	1,65	1,94	3,59	1,17	45,9	M
6	1,59	1,92	3,51	1,20	45,2	M
7	1,55	1,88	3,43	1,22	45,1	M
8	1,55	1,83	3,38	1,22	45,8	M
9	1,52	1,80	3,32	1,18	47,7	M
10	1,44	1,79	3,23	1,24	44,5	M
11	1,35	1,74	3,09	1,28	43,6	M
12	1,13	1,85	2,98	1,63	37,9	SM

Tabela 5 - Dados morfométricos dos cromossomos metafásicos do acesso UENF1753 (*C. chinense*).

Par cromossômico	Comprimento (μm)			r	ic	classe
	Braço		Total			
	curto	longo				
1	1,83	2,20	4,03	1,20	45,4	M
2	1,78	2,22	4,00	1,24	44,5	M
3	1,75	2,09	3,84	1,19	45,5	M
4	1,81	1,95	3,76	1,07	48,1	M
5	1,72	1,97	3,68	1,14	46,7	M
6	1,70	1,85	3,55	1,08	47,8	M
7	1,48	1,94	3,42	1,31	43,2	M
8	1,34	1,96	3,30	1,46	40,6	M
9	1,30	1,91	3,21	1,47	40,4	M
10	1,27	1,85	3,12	1,45	40,7	M
11	1,23	1,79	3,02	1,44	40,7	M
12	0,70	2,14	2,84	3,05	26,6	A

r = razão entre os braços longo e curto

ic = índice centromérico

M = metacêntrico

SM = submetacêntrico

A= acrocentrico

Tabela 6 - Dados morfométricos dos cromossomos metafásicos do acesso UENF1759 (*C. chinense*).

Par cromossômico	Comprimento (μm)			r	ic	Classe
	Braço		Total			
	curto	longo				
1	1,94	2,18	4,12	1,12	47,0	M
2	1,89	2,01	3,90	1,06	48,4	M
3	1,87	1,98	3,85	1,05	48,5	M
4	1,88	1,90	3,78	1,01	48,7	M
5	1,75	1,85	3,60	1,05	48,6	M
6	1,57	1,95	3,52	1,24	44,6	M
7	1,52	1,89	3,41	1,24	44,5	M
8	1,50	1,80	3,30	1,20	45,4	M
9	1,42	1,78	3,20	1,25	44,3	M
10	1,38	1,74	3,12	1,26	44,2	M
11	1,28	1,73	3,01	1,35	42,5	M
12	0,63	1,96	2,59	3,11	24,3	A

Tabela 7 - Dados morfométricos dos cromossomos metafásicos do acesso UENF1708 (*C. chinense*).

Par cromossômico	Comprimento (μm)			r	ic	Classe
	Braço		Total			
	curto	longo				
1	1,90	2,18	4,08	1,14	46,5	M
2	1,88	2,08	3,96	1,10	47,4	M
3	1,89	2,01	3,90	1,06	48,4	M
4	1,85	1,99	3,84	1,07	48,1	M
5	1,77	1,94	3,71	1,09	47,7	M
6	1,74	1,88	3,62	1,08	48,0	M
7	1,69	1,80	3,49	1,06	48,4	M
8	1,51	1,75	3,26	1,15	46,3	M
9	1,48	1,72	3,20	1,16	46,2	M
10	1,42	1,70	3,12	1,19	45,5	M
11	1,39	1,70	3,09	1,22	44,9	M
12	0,70	2,12	2,82	3,02	24,8	A

r = razão entre os braços longo e curto

ic = índice centromérico

M = metacêntrico

SM = submetacêntrico

A = acrocentrico

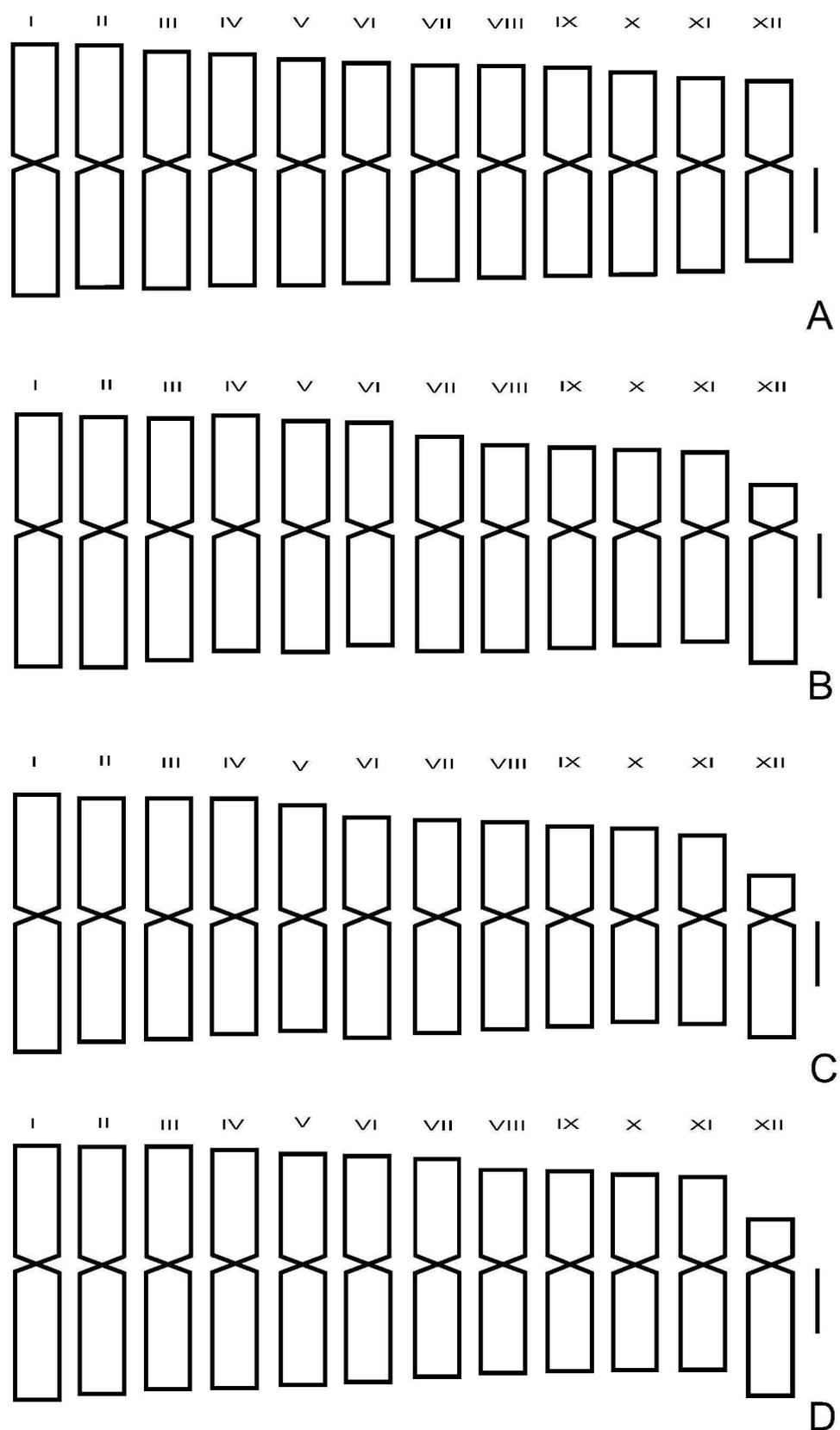


Figura 2 - Ideograma dos acessos de *C. chinense* referente às médias obtidas do cromossomos metafásicos. (A) UENF1749, (B) UENF1753, (C) UENF1759 e (D) UENF1708. Barra 1 μm.

4.2. Viabilidade polínica

Quanto à viabilidade polínica dos acessos, a média geral de viabilidade foi de 95%, independente da sua procedência geográfica, indicando que os acessos de *C. chinense* utilizados no estudo apresentam uma alta viabilidade e, conseqüentemente, uma meiose normal (Tabela 8). Esses dados corroboram os obtidos por Campos (2006), que, ao realizar uma caracterização reprodutiva com base na viabilidade polínica, utilizando a coloração tripla de Alexander, encontrou em média 98% de viabilidade polínica em *C. chinense*. Porém, os resultados não demonstraram diferenças em relação à procedência geográfica dos acessos. Lanteri e Pickergill (1993), Tong e Bosland (2003) e Yoon (2003) observaram que as espécies *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* e *C. baccatum* apresentaram viabilidade polínica alta, provenientes de diferentes regiões geográficas.

O elevado percentual de grãos de pólen viáveis nesses acessos pode estar relacionado à regularidade meiótica desses genótipos. De acordo com Techio *et al.* (2006), acessos com uma divisão meiótica normal resultam em grãos de pólen viáveis, portanto, capazes de germinar no estigma da flor, fertilizar e gerar frutos viáveis. Alta viabilidade polínica em acessos representantes de espécies do gênero *Capsicum* também foi relatada por Monteiro (2006) e Martins (2007), que encontraram uma média de 98 e 96% respectivamente, ao analisarem a viabilidade polínica utilizando a mesma metodologia do presente estudo.

É válido ressaltar que a coleta dos botões florais foi realizada pela parte da manhã entre 8 e 10 horas, o que leva a crer que a viabilidade deva atingir sua plenitude nesse momento existindo assim uma maior disponibilidade de pólen levando assim a uma alta percentagem de polens viáveis. Esses dados estão de acordo com Techio *et al.* (2006) que, ao analisarem a viabilidade polínica de acessos de capim-elefante, observaram que a viabilidade dos grãos de pólen atingia seu ponto máximo quando as anteras eram coletadas na parte da manhã entre, 8 h e 30min e 10 horas, enquanto que Oliveira *et al.* (2001), em estudos sobre a viabilidade polínica de açaizeiro, verificaram que a viabilidade era mais elevada em botões florais coletados pela manhã no período entre 10 e 12 horas.

Tabela 8 - Viabilidade polínica (%) de 52 acessos de *C. chinense* de diferentes procedências geográficas, pertencentes à coleção de *Capsicum* da UENF

Genótipo	Média	Intervalo de confiança ($\alpha = 5\%$)	
		LI*	LS**
4	0,979	0,967	0,981
6	0,978	0,966	0,981
18	0,976	0,967	0,981
22	0,974	0,966	0,981
24	0,974	0,966	0,981
51	0,973	0,966	0,981
10	0,973	0,965	0,980
12	0,972	0,965	0,980
50	0,971	0,965	0,980
16	0,971	0,965	0,980
30	0,970	0,965	0,980
34	0,973	0,965	0,980
36	0,973	0,965	0,980
42	0,973	0,965	0,980
1	0,972	0,964	0,979
13	0,972	0,964	0,979
28	0,972	0,964	0,979
40	0,972	0,964	0,979
46	0,972	0,964	0,979
7	0,971	0,963	0,978
19	0,971	0,963	0,978
25	0,971	0,963	0,979
31	0,971	0,963	0,979
43	0,971	0,963	0,979
3	0,970	0,961	0,977
15	0,970	0,962	0,978
37	0,970	0,962	0,978
9	0,969	0,961	0,977
11	0,969	0,961	0,977
21	0,969	0,961	0,977
23	0,969	0,960	0,976
27	0,969	0,960	0,976
29	0,969	0,960	0,976
33	0,969	0,961	0,977
41	0,969	0,960	0,976
45	0,969	0,960	0,976
5	0,968	0,960	0,976
17	0,968	0,960	0,976
35	0,968	0,960	0,976
39	0,968	0,960	0,976
47	0,968	0,960	0,976
14	0,966	0,957	0,974
2	0,965	0,956	0,973
8	0,965	0,956	0,973
20	0,965	0,956	0,973
26	0,965	0,956	0,973
32	0,965	0,956	0,973
44	0,965	0,956	0,973
38	0,964	0,955	0,972
52	0,963	0,955	0,972
49	0,960	0,953	0,970
48	Nd	Nd	nd

* LI: limite inferior

** LS: limite superior

nd: não determinado

Kearnes e Inouye (1993) demonstram que, para a maioria das espécies a disponibilidade de grãos de pólen pela antera é maior na parte da manhã, indicando assim uma alta viabilidade destes nesse intervalo de tempo.

O corante utilizado no estudo demonstrou ser eficaz para o teste de viabilidade polínica em acessos de *C. chinense* (Figura 2). A coloração tripla de Alexander diferencia-se dos corantes nucleares, pois esses possuem uma aplicação limitada, coram somente polens funcionais, enquanto que os inviáveis são identificados como não-corados; nesse caso, não são adequados para espécies que apresentam paredes espessas, camadas mucilaginosas ou presença de espículas, que dificultam a coloração.

A coloração tripla de Alexander, que tem como base o verde malaquita e fucsina ácida, e devido às suas propriedades químicas básica e ácida, respectivamente, cora polens viáveis e não viáveis, mostra-se eficiente para o pólen de inúmeras espécies.

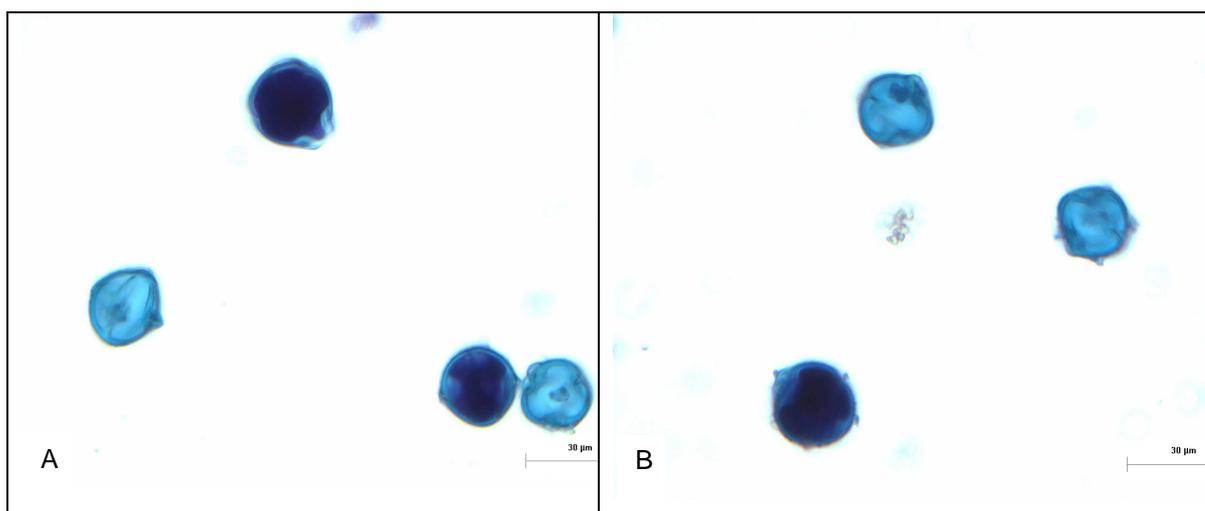


Figura 3 - Viabilidade polínica obtida por meio de coloração tripla de Alexander, em que se observam pólen viável (coloração púrpura) e inviável (coloração verde).

A viabilidade polínica depende também da sua composição celular, de acordo com Shivanna e Rangaswamy (1992), que descrevem que a maior limitação dos testes de viabilidade e germinação *in vitro* é a diferença entre as taxas respiratórias do grão de pólen de diferentes espécies, pois grãos de pólen tricelulares respiram mais rapidamente e, conseqüentemente, a sua longevidade

é menor, por sua vez o grão de pólen, possui uma taxa respiratória mais lenta e, portanto, apresentam uma viabilidade polínica mais acentuada.

De acordo com Auler *et al.* (2006), a taxa de viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento, conservação e cultivo de plantas, pois pode permitir o fluxo gênico, aumentando a possibilidade de formação de diferentes combinações genéticas.

A viabilidade polínica é considerada uma medida de fertilidade masculina, determinada por meio da utilização de várias técnicas, por exemplo, via coloração e germinação *in vitro*, de maneira a garantir a fertilidade e, com isso, tornar possível o cruzamento entre genótipos de importância econômica (Oliveira *et al.*, 2001).

4.3. Caracterização química

Diferenças significativas a 5% de probabilidade foram observadas nos dados referentes à caracterização química (^oBrix-TSS e vitamina C) nos acessos estudados (Tabelas 9 e 10). Essas diferenças foram validadas pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para a variável teor de sólidos solúveis (TSS-^oBrix) em 52 acessos de *C. chinense*

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Genótipo	51	8,300	6,014*
Resíduo	208	1,380	
Total	259		
Coeficiente de variação (%)	9,36%		

* significativo a 5% de probabilidade

A caracterização química dos frutos de *C. chinense* foi realizada mediante a análise do teor de sólidos solúveis, que é uma característica que tem sido utilizada como indicador da qualidade de frutos, e do conteúdo de vitamina C, visto que o ácido ascórbico é uma importante referência em estudos vitamínicos, pois é a vitamina mais termolábil, e sua presença no fruto indica que,

provavelmente, os demais nutrientes também estão sendo preservados (Chitara e Chitara, 1990).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a variável teor de vitamina C em 52 acessos de *C. chinense*

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F
Genótipo	51	1417,021	4,874*
Resíduo	208	290,684	
Total	259		
Coeficiente de variação(%)	10,78%		

* significativo a 5% de probabilidade

O teor de sólidos solúveis variou de 5,07 °Brix para o acesso 24 (UENF1764) a 17,80 °Brix para o acesso 49 (UENF1795) (Tabela 11). Pelo teste de Scott-Knott, os acessos foram reunidos em três grupos. O grupo A, formado pelos acessos 5 (UENF1749), 14 (UENF1757) e 47 (UENF1786), apresentou um valor médio de 16,65 °Brix. Oito acessos ficaram alocados no grupo B:2 (UENF1706), 12 (UENF1726), 15 (UENF1758), 19 (UENF1748), 31 (UENF1743), 37 (UENF1708), 44 (UENF1792) e 50 (UENF1796), que apresentou um valor médio de 11,2 °Brix. Os demais acessos, que correspondem a 75%, ficaram no grupo c, demonstrando um valor médio de 6,98 °Brix. Lannes (2005), ao realizar uma análise química em 48 acessos de *C. chinense* encontrou valores de teor de sólidos solúveis que variaram de 5,37 °Brix a 12,90 °Brix. Rego (2001), em uma caracterização química da espécie *C. baccatum*, observou que esta espécie apresentava em média 8,5 °Brix de teor de sólidos solúveis. Esses dados confirmam que as espécies de *Capsicum* podem apresentar valores médios altos, de teor de sólidos solúveis, que é a representação da porcentagem em gramas dos sólidos que se encontram dissolvidos na polpa: esses sólidos são constituídos por açúcares e ácidos orgânicos.

Em relação à quantidade de vitamina C nos frutos de *C. chinense* analisados, observou-se que os valores variam de 70 mg por 100 gramas de polpa fresca para o acesso 10 (UENF1723) a 262,04 mg para o acesso 28 (UENF1768) (Tabela 9). O emprego do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, para essa característica, possibilitou a formação de cinco grupos,

Tabela 11 - Médias de teor de sólidos solúveis (TSS) e de vitamina C de 52 acessos de *C. chinense* de diferentes procedências geográficas, pertencentes à coleção de *Capsicum* da UENF

Genótipo	TSS (°Brix)	Vitamina C (mg/100 g de polpa)
1	7,14 c*	146,68 c
2	12,50 b	245,16 a
3	6,04 c	177,57 b
4	7,42 c	184,28 b
5	17,11a	133,57 c
6	5,24 c	73,00 e
7	7,77 c	149,37 c
8	5,72 c	128,50 c
9	5,70 c	130,00 c
10	6,71 c	70,00 e
11	6,15 c	72,38 e
12	10,40 b	121,00 c
13	7,33 c	120,00 c
14	15,40 a	256,94 a
15	10,06 b	160,34 c
16	6,80 c	125,60 c
17	7,70 c	125,00 c
18	8,95 c	137,54 c
19	11,40 b	177,77 b
20	6,50 c	132,88 c
21	6,91c	152,10 c
22	7,56 c	105,70 c
23	5,30 c	219,48 a
24	5,07 c	75,00 e
25	5,49 c	140,00 c
26	6,29 c	147,73 c
27	9,50 c	149,35 c
28	6,94 c	262,04 a
29	5,80 c	232,83 a
30	8,32 c	140,00 b
31	11,00 b	107,80 d
32	5,82 c	114,00 d
33	5,40 c	112,00 d
34	9,00 c	229,58 a
35	8,00 c	173,53 b
36	9,50 c	148,26 c
37	11,00 b	120,00 d
38	5,48 c	120,34 d
39	8,10 c	175,58 b
40	7,00 c	170,00 b
41	5,50 c	107,09 d
42	9,47 c	160,34 b
43	8,51 c	126,67 d
44	12,40 b	132,27 d
45	10,00 c	95,60 d
46	6,04 c	130,36 d
47	17,45 a	175,78 b
48	nd	nd
49	17,80 a	151,63 c
50	11,14 b	85,00 e
51	6,29 c	65,00 e
52	6,20 c	62,00 e

nd: não determinado

*médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a $\alpha=0,05$ pelo teste de Scott-Knot

dos quais 36,5% estavam alocados no grupo três, variando de 105,70 mg (UENF1762) a 160,34 mg (UENF 1758) por 100 gramas de polpa.

O grupo um reuniu os acessos que apresentaram um maior teor de vitamina C, com variação de 262,04 mg (UENF 1768) a 219,48 mg (UENF 1763) por 100 gramas de polpa. Esses dados corroboram aos Yahia *et al.* (2001) e Simonne *et al.* (1997) que, ao estudarem as características químicas de *C. annuum*, verificaram que a grande maioria dos acessos analisados apresentou teores de vitamina C superiores a 95 mg por 100 gramas de polpa fresca. O acesso 14 (UENF 1757), que ficou alocado no primeiro grupo, tanto para o teor de sólidos solúveis como para o teor de vitamina C, pode ser utilizado na indústria farmacêutica e destinado ao consumo, visto que altos índices de sólidos solúveis conferem ao fruto aroma e sabor agradáveis.

Os resultados mostram a potencialidade dos acessos de *C. chinense*, que podem ser utilizados em programas de melhoramento, pois apresentam uma grande quantidade de vitamina C. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2000), os índices diários de vitamina C para uma pessoa adulta é de 75 a 90 mg por dia; dessa forma, a maioria dos acessos utilizados no estudo apresenta uma potencialidade de emprego em programas de melhoramento genético visando a variedades com características desejáveis.

4.4. Caracterização molecular

Na caracterização molecular, via marcadores RAPD, do total de 16 *primers* utilizados, 12 foram polimórficos (Tabela 12) (Figura 3), o que representa 75% de polimorfismo. Do total de 89 bandas amplificadas, 73 (82,02%) foram polimórficas quanto aos *loci* identificados. Para Colombo *et al.* (2000), intervalo entre 50 a 100 bandas polimórficas é considerado suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de espécies vegetais. Como neste estudo, o número ideal de bandas encontrado está nesse intervalo, pode-se inferir que as estimativas da diversidade genética entre os acessos estudados apresentam uma boa precisão.

Costa *et al.* (2006), ao estudarem a diversidade genética entre várias espécies de *Capsicum*, encontraram cerca de 90% de bandas polimórficas. Lannes (2005), ao analisar a diversidade genética entre 45 acessos *C. chinense*, via marcadores moleculares RAPD, utilizou 67 *primers* e encontrou apenas 13

iniciadores polimórficos Luz (2007), utilizando fAFLP, em estudos para a caracterização molecular de *C. chinense*, verificou que a dissimilaridade entre os 52 acessos utilizados, variou entre 2 e 44%. Esses dados sugerem que os acessos de *C. chinense* apresentam alta variabilidade, mesmo sendo uma espécie autógama. Contudo, Paran *et al.* (1998) e Rodriguez *et al.* (1999) não encontraram alto polimorfismo ao analisarem, respectivamente, a diversidade em *C. annum* e entre várias espécies cultivadas de *Capsicum*.

As dissimilaridades entre os acessos variaram de 0,04 a 0,42 com média de 0,40. Os menores valores foram encontrados para os acessos 37 (UENF1708) e 45 (UENF1793), ambos procedentes de São Luís-MA. Os maiores valores foram encontrados para os acessos 1 (UENF1703) procedente de Viçosa-MG, e 23 (UENF1763), de Belém-PA. Esses resultados ressaltam uma alta variabilidade que há entre os acessos de *C. chinense*.

Tabela 12 - *Primers* de RAPD que amplificaram fragmentos polimórficos no DNA genômico dos acessos de *Capsicum chinense*

Primer	Seqüência	Número de fragmentos polimórficos
A-05	AGGGGTCTTG	06
A-08	GTGACGTAGG	05
A-15	TTCCGAACCC	09
A-18	AGGTGACCGT	07
A-19	CAAACGTCGG	07
AA-02	GAGACCAGAC	04
AA-17	GAGCCCGACT	06
AB-05	CCCGAAGCGA	05
AB-11	GTGCGCAATG	05
AB-17	TCGCATCCAG	06
AF-02	CAGCCGAGAA	05
B-12	CCTTGACGCA	08

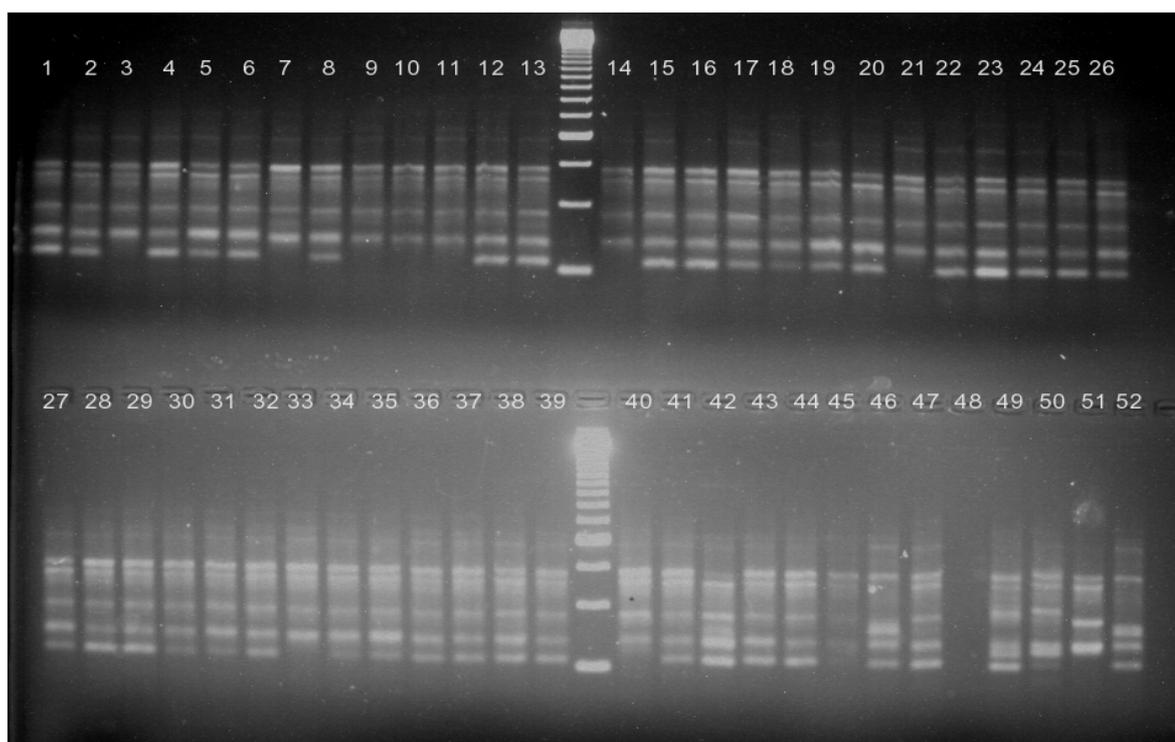


Figura 4 - Polimorfismo dos 52 acessos de *C. chinense* obtido com o *primer* A-15. M= marcador de peso molecular

Pelo método de agrupamento de Tocher, os acessos foram distribuídos, inicialmente, em seis grupos, sendo que o grupo 1 reuniu 47 dos 52 analisados, ou seja, 90,4%. Assim, os dados foram reanalisados, obtendo-se 6 grupos, sendo o grupo 1 constituído por 11 subgrupos (Tabela 13).

O grupo 1 inicial foi subdividido em 11 subgrupos cujo o subgrupo 1a reuniu 29 dos 47 acessos, o que corresponde a 62%. Quanto aos demais subgrupos 1b foi constituído por quatro acessos; subgrupo 1c a 1g, por dois acessos; e um único acesso formaram-se os subgrupos 1h a 1k. Ainda assim essa reclassificação em subgrupos não reuniu acessos com a mesma procedência, sendo que o subgrupo a reuniu acessos provenientes do Maranhão, Bahia e Pará bem como um acesso proveniente de Minas Gerais. Apenas os subgrupos 1f e 1g reuniram acessos de mesma procedência sendo o primeiro constituído pelos acessos 7 (UENF 1753) e 15 (UENF 1758), oriundos de Ilhéus-Ba, e o segundo reuniu os acessos 20 (UENF 1759) e 26 (UENF 1766), provenientes de Belém-PA. O restante dos grupos, (2, 3, 4, 5 e 6) não apresentou um agrupamento de acordo com a origem geográfica.

Esses resultados mostram que há variabilidade genética dentro da espécie *C. chinense*, em contrapartida, os resultados obtidos por Rodriguez *et al.* (1999),

ao analisarem a diversidade genética entre e dentro acessos de *Capsicum*, indicam uma maior diversidade entre espécies do que dentro delas. Lannes (2005), avaliando a diversidade genética de *C. chinense* de diferentes regiões geográficas do Brasil, também observou uma variabilidade baixa nos acessos da espécie em estudo, em que encontrou um único grupo que reuniu 75,51% dos acessos enquanto que Luz (2007), ao analisar acessos de *C. chinense* de diferentes procedências geográficas utilizando fAFLP, observou também que os resultados obtidos não permitiram uma associação entre a diversidade genética e a procedência dos acessos.

Tabela 13 - Agrupamento de 52 acessos de *C. chinense* pelo método de Tocher (Rao, 1952), obtido pelo coeficiente de similaridade de Jaccard

Grupo	Acessos																			
1a	37	45	29	35	43	27	36	39	51	41	33	18	32	42	12	50	11	38	40	34
	17	46	3	30	44	28	52	31	1											
1b	5	21	13	48																
1c	8	16																		
1d	6	14																		
1e	2	10																		
1f	7	15																		
1g	20	26																		
1h	4																			
1i	47																			
1j	25																			
1k	19																			
2	9																			
3	49																			
4	22																			
5	23																			
6	24																			

O método hierárquico UPGMA possibilitou a distribuição dos acessos dentro dos grupos ao formar o dendrograma (Figura 4), mas não semelhante ao agrupamento formado pelo método de agrupamento de Tocher (Tabela 12), em um ponto de corte de 40%, o qual corresponde ao valor médio da dissimilaridade, evidenciou-se uma diversidade genética entre os acessos de *C. chinense*, pois ocorreu a formação de vários grupos. Em contrapartida, alguns autores como Rodriguez *et al.* (1999) e Lannes (2005), relatam que a elevada concentração de

acessos em apenas um único grupo indica que a técnica de RAPD não é eficiente para detectar a diversidade, uma vez que o número de *loci* polimórficos não permite abranger todo o genoma em estudo.

O acesso 48 (UENF 1751), procedente de Parintins-AM, que tem como característica diferenciadora dos demais acessos o fato de apresentar plantas com coloração totalmente roxa, sendo assim o único acesso que apresenta uma diferença morfológica contrastante em relação aos demais, entretanto, essa diferença não foi suficiente para proporcionar que acesso fosse geneticamente diferente dos demais. Esses resultados contrastam com os de Buso *et al.* (2001), que observaram que acessos muito diferentes morfológicamente podem ser um espécime silvestre, apresentar baixa similaridade genética com as espécies cultivadas de *Capsicum*.

Por outro lado, o acesso 24 (UENF 1764), proveniente de Belém-PA, foi o mais divergente entre todos eles, pois formou um grupo isolado pelo método de Tocher e também permaneceu isolado pelo método de UPGMA.

Os dados de agrupamento com base no DNA genômico dos acessos demonstraram que a distribuição geográfica (Tabela 1) não foi o melhor parâmetro estabelecido de agrupamento, pois acessos de diferentes procedências estão alocados em um mesmo grupo, mesmo não sendo de regiões fronteiriças, impossibilitando assim qualquer tipo de cruzamento natural entre eles.

Considerando que *C. chinense* tenha sido domesticada nas terras baixas da Bacia Amazônica (IBPGR, 1983) e de lá dispersa para outras regiões do país e ainda que é autógama, os resultados aqui observados não são inesperados, pois essas duas condições devem contribuir para uma similaridade genética entre os acessos e, assim, uma variabilidade genética baixa dentro da espécie. Provavelmente, os acessos utilizados no presente estudo podem não ter passado por um processo de domesticação, evidenciando desta maneira a diversidade encontrada entre eles.

A importância da diversidade genética na determinação de cruzamentos entre os acessos mais divergentes visando explorar a heterose entre eles mostra que os acessos foram os acessos mais divergentes.

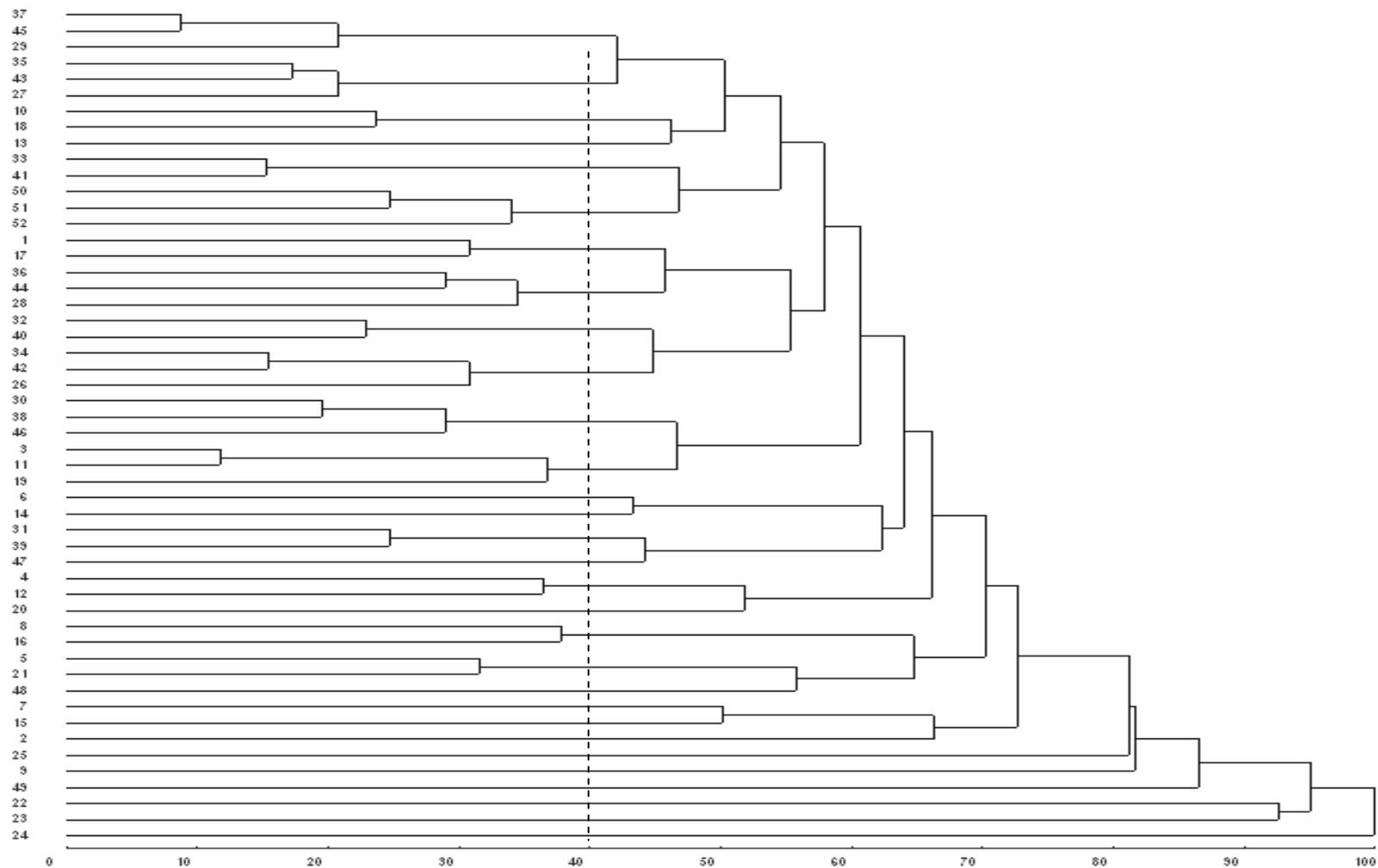


Figura 5 - Dendrograma obtido a partir das medidas de dissimilaridade quantificado, pelo método de UPGMA, de 52 acessos de *C. chinense*

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os estudos de caracterização e avaliação de germoplasma são essenciais para o uso e conservação dos recursos genéticos, sendo realizados em nível morfológico, agrônômico, bioquímico, citogenético, químico e molecular. A caracterização citogenética de espécies tropicais, como *C. chinense*, amplia as perspectivas da conservação da diversidade vegetal de espécies comumente utilizadas em programas de melhoramento genético. Estudos químicos são de suma importância econômica, como teor de sólidos solúveis (TSS), vitaminas e acidez. A avaliação molecular é uma forma eficiente de se estudar a variabilidade genética entre as espécies cultivadas e seus parentes silvestres, esclarecendo suas relações filogenéticas, promovendo estratégias racionais para o melhoramento, coleta de germoplasma, conservação e utilização de recursos genéticos.

A caracterização citogenética demonstrou que o acesso (UENF1740) apresentou, no par 12, cromossomos submetacêntricos, diferindo dos demais acessos analisados, que apresentaram cromossomos acrocêntrico no mesmo par, evidenciando, assim, presença de citótipos entre eles.

Os acessos utilizados neste estudo apresentam uma taxa de viabilidade polínica alta, demonstrando uma potencialidade para a utilização em cruzamentos intra e interespecíficos.

Os melhores acessos com grande quantidade de vitamina C foram: 2 (UENF1706), 14 (UENF1757), 23 (UENF1763), 28 (UENF1768), 29 (UENF1770)

e 34 (UENF1778); e uma maior quantidade de TSS foram 5 (UENF1749), 14 (UENF1757), 47 (UENF1786) e 49 (UENF1795). Assim, esses acessos apresentam características desejáveis para a indústria alimentícia.

De acordo com os resultados obtidos, os acessos analisados apresentaram certo grau de diversidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, J.R. (2001) *Análise morfológica dos cromossomos de pimentão *Capsicum annum* L.* Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 143p.
- Adolfo Lutz-Instituto (1985) *Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos.* 3. ed. São Paulo, 533p.
- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and noaborted pollen. *Stain Tech.* 44:117-122.
- Alexander, M.P. (1980) A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.*, Baltimore, 55 (1) 13-18.
- Akamine, E.K.E., Girolami, D.G. (1957) Problems in fruit set in yellow passion fruit Hawaii. *Farm Science*, 2 (2): 3-5.
- Auler, N.M.F., Battistin, A., Reis, M.S. (2006). Número de cromossomos, microesporogenese, viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8 (2):55-63.

- Bertão, M.R. (1993) *Evolução cariotípica no gênero Capsicum (Solanaceae)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo - USP, 79p.
- Bianchetti, L.B. (1996) *Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de Capsicum (Solanaceae) ocorrentes no Brasil*. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Brasília – DF, Universidade de Brasília – UNB, 174p.
- Bosland, P.W. (1992) Chiles: A diverse Crop. *HortTechnology*, 2 (1):7-10.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (1999) *Peppers: vegetable and spice Capsicums*. Oxon, UK and New York: CABI publishing, 5 (1) 66-83.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2000) *Peppers: Vegetable and spice Capsicums*. Oxon, UK and New York: CABI Publishing, 204p.
- Buso, G.S.C., Lourenço, R.T., Bianchetti, L.B., Lins, T.C.L., POZZOBON, M.T., AMARAL, Z.P.S., FERREIRA, M.E. (2001) *Espécies silvestres do gênero Capsicum coletadas na mata atlântica brasileira e sua relação genética com espécies cultivadas de pimenta: uma primeira abordagem genética utilizando marcadores moleculares*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 22p.
- Campos, K.P. (2006) *Obtenção, caracterização molecular, morfológica e reprodutiva de híbridos entre espécies de Capsicum*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 126p.
- Carvalho, I.C.C., Bianchetti, L.B., Bustamante, P.G., Silva, D.B. (2003) *Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (Capsicum spp.) da Embrapa Hortaliças*. Brasília documentos, 49p.
- Casali, V.W., Couto, F.A.A. (1984) Origem e botânica de *Capsicum*. *Informe Agropecuário*, 10 (11):8-10.

- Cachoran, W.G. (1995) *Técnicas de Amostragem*. Rio de Janeiro. Fundo de Cultura, 555p.
- Carluccio, F., Saccardo, F. (1977) Karyotype studies in *Capsicum*. In: Pochard, E. (ed.) *Capsicum 77*. Compte Rendues 3ème Congrès Eucarpia Piment. Montfavet-Avignon: INRA, p. 39-50.
- Chaparro, J.X., Werner, D.J., Malley, D.O., Sederoff, R.R. (1994) Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theoretical and Applied Genetics*, 87:805-815.
- Chitarra, M.I.F., Chitarra, A.B. (1990) *Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: ESAL-FAEPE, 320p.
- Cid, R., Palomino, G. (1996) Cytotypes and meiotic behavior in Mexican populations of *Myrtillocactus geometrizans* var. *geometrizans* (Cactaceae). *Cytologia*, 61:343-348.
- Colombo, C., Second, G., Charrier, A. (2000) Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 23 (1):189-199.
- Corona-Torres, T., García-Velázquez, A., Castillo-Gonzalez, F., Montero-Tavera, V., Azpiroz-Rivero, H.S. (2000) Caracterización isoenzimática de la diversidad genética de colectas de Chile (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 6 (1):5-17.
- Costa, F.R. (2004) *Diversidade genética entre acessos de Capsicum spp. com base em marcadores RAPD*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 62p.

- Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Vitória, A.P., Campos, K.P., Rodrigues, R., Silva, D.H., Pereira, M.G. (2006) Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6:18-23.
- Cristofani, M., Machado, M.A., Grattapaglia, D. (1999) Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. *Euphytica*, Wageningen, 109 (1):25-32.
- Cronquist, A. (1998) *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden, 555p.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v. 2, Viçosa: UFV, 585p.
- Cruz, C.D. (2001). *Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística*. Visoça: UFV, 442p.
- Data, P.C. (1968) Karyology of indian varieties of *Capsicum annum* L. (Solanaceae). *Caryologia*, 21 (2):121-126.
- Dafni, A. (1992) *Pollination ecology: a practical approach (the practical approach series)*. New York, Oxford: University press, 250p.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull.* 19:11-15.
- Ferreira, M.A.M.M. (1998) *Determinação do padrão de regiões heterocromáticas no gênero Capsicum através de métodos de bandeamento*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo - USP, 89p.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 220p.

- Filgueira, F.A.R. (2000) *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: UFV, 402p.
- Guerra, M.S. (1986) Reviewing the chromossome nomenclature of Levan *et al*. *Revista Brasileira de Genética*, 9 (4):741-743.
- Guerra, M.S., Souza, M.J. (2001) *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto, 131p.
- Guerra, N.A. (2001) Estudios cromosómicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. *Revista UDO Agrícola*, 6 (2) 34-41.
- Heiser, C.B.Jr. (1979) Peppers – *Capsicum* (Solanaceae). *In*: Simmonds, N.W. (ed.) *Evolution of crop plants*. Longman, p. 265-273.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Conner, P., Brown, S.K. (1997) *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122:347- 349.
- Henz, G.P. (2004) Perspectivas e potencialidades do mercado de pimentas. Anais do I Encontro Nacional de Agronegócio de Pimentas (*Capsicum spp*). I mostra nacional de pimentas e produtos derivados. Brasília: Embrapa hortaliças, 45p.
- Heslop-Harrison, J.S. (2000) RNA, genes, genomes and chromossomes: repetitive DNA sequences in plants. *Chromossome today*, 13:45-57.
- IBPGR (1983) *Genetic resources of Capsicum: a Global Plan of Action*. IBPGR Executive Secretariat, Italy, Rome.
- Kashkush, K., Jinggui, F., Tomer, E., Hillel, J., Lavi, U. (2001) Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). *Euphytica*, 122 (1):129-136.
- Kelly, J.K., Rasch, A., Kalisz, S. (2002) A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany*, 89 (6):1021-1023.

- Kearns, C.A., Inouye, D. (1993) *Techniques for pollinations biologists*. Niwot: University Press of Colorado.
- Konstantinov, K., Drinic, S.M., SIJACIC, M., Isajev, V., Mataruga, M. (2005) Molecular markers application for genetic resources characterization of different plant species. *Italia*, 21 (3) 179-180.
- Konchieva, E.Z., Ryzhova, N.N. (2003) Molecular AFLP analysis of the genotypes of pepper *Capsicum annuum* cultivars. *Russian Journal of Genetics*, 39 (12):1345-1348.
- Kuriachan, P. (1981) A cytogenetic estudy of the wild and cultivated varieties of *Capsicum baccatum* L. *Indian Journal Botany*, 4:27-32.
- Lanteri, S., Pickersgill, B. (1993) Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. e *Capsicum chinense* Jacq. *Euphytica*, 67 (1-2):155-160.
- Lefebvre, V., Palloix, A., Caranta, C., Pochard, E. (1995) Construction of an intraespecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome*, 3 (8):112-121.
- Lewis, W.H., Elvin-Lewis, M.P. (1995) Medical plants as sources of new therapeutics. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 82 (1):16-24.
- Limaye, V.A., Patil, V.P. (1989) Karyomorphological studies in the genus *Capsicum* Linn. *Cytologia*, 54:455-463.
- Luz, F.J.F. (2007) *Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (Capsicum chinense Jacq.)*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Planas) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 81p.

- Martins, K.C. (2007) *Análise meiótica em espécies do gênero Capsicum*. Monografia (Licenciatura em Biologia) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 51p.
- Martinsen, P., Schaare, P. (1998) Measuring soluble solids distribution using infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 14:271-281.
- Mayeda, L.Y. (1997) *Estudo citogenético em dez táxons do gênero Passiflora L. (Passifloraceae)*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP, 89p.
- McLeod, M.J., Guttman, S.L., Eshbaugh, W.H. (1982) Early evolution of chille peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36 (4):361-368.
- Monteiro, C.E.S. (2007) *Viabilidade polínica de híbridos interespecíficos e acessos do gênero Capsicum L. (Solanaceae)*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 50p.
- Moscone, E.A. (1990) Chromosome studies on *Capsicum* (Solanaceae). In: Karyotype analysis in *C. chacoense*. *Brittonia*, 42 (2):147-154.
- Moscone, E.A. (1993) Estudios cromosómicos en *Capsicum* (Solanaceae). In: Analisis cariotípico de *C. parvifolium* y *C. annum* var. *annuum*. *Kurtziana*, 22 (2): 9-18.
- Moscone, E.A., Loidl, J., Ehrendorfer, F., Hunziker, A.T. (1995) Analysis of active nucleolus organizing regions in *Capsicum* (Solanaceae) by silver staining. *American Journal of Botany*, 82:276-287.
- Moscone, E.A., Lambrou, M., Ehrendorfer, F. (1996) Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). *Plant system evolution*, 20:37-63.

- Nass, L.L., Miranda Filho, J.B., Santos, M. (2001) Uso de germoplasma exótico no melhoramento. *In: Nass, L.L., Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Ingliš, M.C. (eds.) Recursos genéticos no melhoramento-plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, p. 101-122.
- Nuez-Viñals, F.N., Ortega, R.G., Costa, J.C. (2003) El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Madri: Mundi-Prensa, 607p.
- Ohta, Y. (1962) Karyotype Analysis of *Capsicum* Species. *Seiken Ziho*, 13:93-99.
- Oliveira, M.S.P., Maues, M.M., Kalume, M.A.A. (2001) Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* de genótipos de açaizeiro. *Acta Botânica Brasileira*, 15 (1):27-33.
- Paran, I., Aftergoot, E., Shifriss, C. (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and RFLP markers. *Euphytica*, 99:167-173.
- Peñaloza, A.P.S. (2005) *II Curso de citogenética aplicada ao melhoramento genético vegetal*. Documentos 154. Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Brasília, 89p.
- Pereira, L.P., Luz, L.P., Tedesco, S.B., Silva, A.C.F.S. (2006) Número de cromossomos em populações de *Achyrocline satureioides* Lam. *Ciência rural*, 36 (2):678-681.
- Pickersgill, B. (1971) Relationships between Weedy and Cultivated forms in some Species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 25:683-691.
- Pickersgill, B. (1977) Chromosomes and evolution in *Capsicum*. *In: Pochard, E. (ed.) Capsicum 77. Comptes Rendues 3ème Congrès Eucarpia Piment*. Montfavet-Avignon: INRA, p. 27-37.
- Pickersgill, B. (1991) Citogenetics and evolution of *Capsicum* L. *In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) Chromosome Engineering in Plants: Genetic Breending, Evalution*. Amsterdam part 3, p. 139-160.

- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T.E., Bianchetti, L.B. (2006) 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*, 151:259-269.
- Prince, J.P., Lackney, V.K., Angeles, C., Blauth, J.R., Kyle, M.M. (1995) A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. *Genome*, 38:224-231.
- Rao, C.R. (1952) *An advanced statistical method in biometric research*. New York, 390p.
- Rego, E.R. (2001) *Diversidade, herança e capacidade combinatória em pimenta (Capsicum annum L.)*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 82p.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum pimentas e pimentões no Brasil*. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças, 113p.
- Rigamoto, R.R., Tyagi, A.P. (2002) Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 20:30-33.
- Rodriguez, J.M., Berke, T., Engle, L., Nienhuis, J. (1999) Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:147-156.
- Rodriguez-Riano, T., Dafni, A. (2000) A new procedure to asses pollen viability. *Sex Plant Reprod.* 12:241-244.
- Santos, O.C. (2002) Caracterização cromossômica de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex. Spreng.) Shum (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia.). Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 92p

- Shivanna, K.R., Rangaswamy, N.S. (1992) *Pollen biology*. A laboratory manual. Berlin/New York: Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 210p.
- Silva, J., Silva, E.S., Silva, P.S.L. (2002) Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis nas diferentes partes do fruto da pinheira. *Revista brasileira de fruticultura*, 24 (2):562-564.
- Simonne, A.H., Simonne, E.H., Eitenmiller, R.R., Mills, H.A., Grren, N.R. (1997) Ascorbic acid and provitamin A contents in unusually colored bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Jornal food composition and analysis*, 10:299-311.
- Smith, P.G., Heiser, C.B. (1957) Taxonomy of *Capsicum chinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. *Bulletim of the Torrey Botanical Club*, 84 (6):413-420.
- Stace, C.A. (2000) Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21th centuries. *Taxon*, 49:451-477.
- Stone, J.L., Thomson, J.D., Dent-Acosta, S.J. (1995) Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. *Am. J. Bot.* 82:1186-1197.
- Sudré, C.P., Rodrigues, R., Riva, E.M., Karasawa, M., Amaral Júnior, A.T. (2005) Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. *Horticultura Brasileira*, 23 (1):22-27.
- Tanksley, S.D. (1984) High rates of cross-pollination in chile pepper. *Hortscience*, 19 (4):580-582.
- Techio, V.H., Lisete, C.D., PEREIRA, A.V. (2006) Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2):35-42.

- Teixeira, R. (1996) *Diversidade em Capsicum: análise molecular, morfoagronômica e química*. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa – UFV, 84p.
- Testolin, R., Huang, W.G., Lain, O., Messina, R., Vecchione, A., Cipriani, G. (2001) A kiwifruit (*Actinidia spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 203:30-36.
- Tong, N., Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovari*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica*, 109:71-77.
- Valois, A.C.C., Nass, L.L., Góes, M. (2001) Conservação *ex situ* de recursos vegetais. In: Nass, L.L., Valois, A.C.C., Melo, I.S., Valadares-Iglis, M.C. (eds.) *Recursos genéticos e melhoramento – plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, p. 123-149.
- Vieira, R.L., Nodari, R.O. (2007) Diversidade genética em cultivares de alho avaliadas por marcadores RAPD. *Ciência Rural*, 37 (1):51-57.
- Vos, P. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research*, 23 (1):4407-4414.
- Yoon, J.B. (2003) Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding pepper (*Capsicum annuum* resistant to anthracnose).
- Yahia, E.M., Gonzales-Aguilar, G. (2001) Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruit during development, maturation and senescence. *Lebens Technology*, 18:452-457.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531.