

CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE  
LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO  
(*Capsicum annuum* var. *annuum*)

**ARLYSSON BARROS ULHOA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO - 2013

CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE  
LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO  
(*Capsicum annuum* var. *annuum*)

**ARLYSSON BARROS ULHOA**

“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: Telma Nair Santana Pereira  
Coorientador: Francisco José Becker Reifschneider

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JUNHO – 2013

CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA E MOLECULAR DE  
LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO  
(*Capsicum annuum* var. *annuum*)

**ARLYSSON BARROS ULHOA**

“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 21 de junho de 2013.

Comissão Examinadora:

---

Profª. Rosana Rodrigues (D.Sc. Produção Vegetal/Melhoramento Genético) – UENF

---

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

---

Dr. Francisco J. B. Reifschneider (Ph.D. Fitopatologia) – Embrapa

---

Profª. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D. Melhoramento Genético) – UENF  
(Orientadora)

Aos meus pais Arlindo e Silvania

À minha irmã Suelaine

À minha namorada

A todos os familiares,

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por abençoarem e possibilitarem sabedoria e discernimento nos momentos de aflição.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela oportunidade concedida para a realização do curso de pós-graduação em nível de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), pelas bolsas concedidas.

Ao Dr. Francisco Reifschneider, por ser o incentivador e possibilitar conhecimento e experiência acadêmica e profissional.

À professora Telma Pereira, pela orientação, dedicação, ensinamentos e pelo incentivo na busca de conhecimento.

Aos professores Messias Gonzaga Pereira e Rosana Rodrigues, pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa e pelos ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela grande contribuição para meus conhecimentos durante o mestrado.

Ao amigo Raimundo Nonato, pela ajuda no decorrer do desenvolvimento da pesquisa e pela amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Hortaliças Dr. Geovani Amaro, Dra. Sabrina Carvalho, Dr. Luciano Bianchetti, Dr. Luciano Nass, Dra. Alice Nagata e Dra. Cláudia Ribeiro, que contribuíram para conclusão do meu mestrado.

Ao técnico de campo da Embrapa Hortaliças Athayde Garcia e a seus colaboradores Deusimar Lima e Jacinto Pereira.

À Vitoria, técnica do Setor de Genética Aplicada do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelo auxílio e ensinamentos práticos laboratoriais.

Ao secretário do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas José Daniel Valle de Almeida, pelo empenho em atender às necessidades burocráticas.

À minha mãe Silvania Barros Ulhoa e ao meu pai Arlindo José Ulhoa, pelo esforço que fizeram para que eu alcançasse mais esse objetivo, à minha irmã, por estar ao meu lado dando força, e ao meu afilhado, por momentos de descontração.

E em especial à minha namorada Cinthia Queiroz, que aceitou e me fortificou durante o curso.

Aos meus avós que sempre rezaram por mim, em especial minha vó Maria.

Aos meus tios e primos, pelo companheirismo.

Aos meus amigos da universidade e da vida.

Muito obrigado a todos!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	4
3.CAPÍTULOS .....	5
<b>3.1.OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>7</b>
Aspectos gerais da cultura .....	7
Caracterização e avaliação de pimentas <i>Capsicum</i> .....	9
Descritores.....	11
Melhoramento Genético .....	13
<b>3.1.3.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
Características morfoagronômicas .....	29
<b>3.1.5.CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>

<b>3.2.CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO</b> .....	34
<b>3.2.1.INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>3.2.2.REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	36
Marcadores moleculares .....	36
Marcadores moleculares em <i>Capsicum</i> .....	37
<b>3.2.3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>3.2.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>3.2.5.CONCLUSÕES</b> .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXO .....	66



## RESUMO

ULHOA, Arlysson Barros; M. Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Junho de 2013; Caracterização morfoagronômica e molecular de linhagens de pimenta do tipo Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*). Orientadora: Profa. Telma Nair Santana Pereira. Coorientador: Dr. Francisco José Becker Reifschneider. Comitê Orientador: Profa. Rosana Rodrigues e Prof. Messias Gonzaga Pereira.

O gênero *Capsicum*, que tem grande importância mundial, ocorre tanto nos países tropicais como em países de clima temperado. De um total de 31 espécies, cinco são consideradas domesticadas, as demais, semidomesticadas ou silvestres. Nos últimos anos, as pimentas passaram a ter maior demanda pelo mercado e, com isso, os trabalhos relacionados à caracterização, melhoramento e obtenção de novas cultivares ganharam espaço dentro de instituições públicas de ensino e de pesquisa, assim como no setor privado. Este trabalho, desenvolvido por uma parceria entre a Embrapa Hortaliças e a Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, objetivou a caracterização morfoagronômica e molecular de linhagens de pimenta do tipo Jalapeño amarelo, atividades essenciais para o desenvolvimento de novas cultivares. Primeiramente foram identificadas plantas segregantes de uma cultivar comercial de Jalapeño vermelho, que se encontrava em um ensaio de comparação, e que apresentou três plantas com frutos de coloração amarela. Com base nesse material, o trabalho foi desenvolvido em três fases: a primeira foi a obtenção de linhagens

homozigotas pelo método de Descendência de Uma Única Semente (do inglês *Single Seed Descent*); a segunda fase foi a caracterização das linhagens obtidas através de cinco descritores morfológicos de *Capsicum* propostos pelo IPGRI (1995) e posterior avaliação qualitativa das linhagens em campo, sendo usado o teste Scott-Knott para a análise estatística; e a terceira fase foi constituída por uma análise molecular, utilizando 15 iniciadores selecionados entre 60 previamente avaliados. Com base nos resultados, conclui-se que o método de melhoramento utilizado foi satisfatório, visto que, em 30 meses de trabalho, as linhagens avançaram cinco gerações ( $S_5$ ). A caracterização morfológica e a avaliação qualitativa permitiram identificar diferenças significativas entre as linhagens. A análise molecular mostrou-se eficiente ao identificar as linhagens que se encontravam em homozigose, além de demonstrar que há diversidade entre as linhagens, o que possibilita selecionar genitores para hibridação. As linhagens promissoras identificadas neste trabalho foram CNPH 25.368, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375 e CNPH 25.377.

## ABSTRACT

ULHOA, Arlysson Barros; M. Sc.; Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro; June 2013; Morphoagronomic and molecular characterization of yellow Jalapeño lines of chili pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*). Advisor: Prof. Telma Nair Santana Pereira. Co-advisor: Dr. Francisco José Becker Reifschneider. Committee Members: Prof. Rosana Rodrigues and Prof. Messias Gonzaga Pereira.

The genus Capsicum, of great worldwide importance, is found in tropical as well as in temperate countries. Currently five species are considered domesticated, out of a total of 31, and the others are considered semi-domesticated or wild. In recent years, the market has demanded more peppers and, therefore, the work related to the characterization, breeding and obtaining new cultivars gained ground in public education and research institutions, as well as in the private sector. This work, developed through a partnership between Embrapa Vegetables and Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro had as objective the morphoagronomic and molecular characterization of yellow Jalapeño pepper lines. These are essential activities for development of new cultivars. This work initiated with the identification of segregating plants in a red Jalapeno cultivar, commercially available in Brazil, which was being used in comparison trials. This cultivar presented three plants with yellow fruits. Based on this material, the work was developed in three phases: the first phase aimed to obtain homozygous inbred lines, obtained through SSD (Single Seed Descent); the second phase

characterized the inbred lines obtained by using five morphological *Capsicum* descriptors with subsequent qualitative field assessment of the inbreds, with the Scott-Knott test used for statistical analysis; and the third phase aimed at the molecular characterization with the screening using 15 primers. Based on the results it was possible to conclude that the breeding method used was satisfactory and S<sub>5</sub> inbred lines were obtained in 30 months. Morphological characterization and qualitative evaluation have identified significant differences between inbreds. Molecular analysis was effective in identifying the homozygous inbreds, and demonstrates that there were differences between inbreds, which allow selecting parents for hybridization. The promising inbreds identified in this study were CNPH 25.368, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375 and CNPH 25.377.

## 1.INTRODUÇÃO

O cultivo de pimenta (*Capsicum* spp.) no Brasil é de grande importância pelas suas características de rentabilidade, principalmente pela agregação de valor ao produto e pela importância social por empregar elevado número de mão de obra, principalmente na época da colheita e processamento. Além disso, incentiva a agricultura familiar como alternativa de diversificação da produção, aumentando a fonte de renda, o que, por sua vez, contribui para a redução do êxodo rural (Vilela, 2004; Pinto e Silva, 2006; Reifschneider et al., 2008). O cultivo de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) alcança uma produção de aproximadamente 270.000 toneladas com um rendimento próximo dos 210.000,00 milhões reais (IBGE, 2006).

O melhoramento genético de pimentas teve início com os primeiros agricultores que, ao selecionarem e preservarem tipos de pimentas que se mostravam mais atrativas e interessantes estavam involuntariamente praticando o melhoramento por seleção em massa, conhecido como seleção massal (Reifschneider, 2000). A seleção massal é muito comum no processo de domesticação de espécies, sendo as plantas menos produtivas e ou defeituosas eliminadas e as remanescentes, que apresentam as melhores características quanto à adaptabilidade e produtividade, mantidas (Allard, 1971). Com isso, os próprios agricultores faziam e fazem melhoramento sem necessidade de técnicas elaboradas de experimentação.

O melhoramento de pimentas não se diferencia dos praticados para as demais solanáceas (tomate, berinjela, pimentão). Em sendo, na sua grande maioria, espécies autógamas, o melhoramento de pimentas e pimentões segue as metodologias empregadas para espécies que se autofecundam. Os principais métodos de melhoramento usados no desenvolvimento de cultivares de pimenta são: Método Genealógico ou *Pedigree*; Método de Descendente de Uma Única Semente - SSD (*Single Seed Descent*); Retrocruzamento; e Retrocruzamento de Linhagens (IBLS, do inglês "*Inbred Backcross Line System*")(Ribeiro & Reifschneider, 2008).

Reifschneider (2000) relata que o melhoramento do gênero *Capsicum* no Brasil ainda não atingiu a devida relevância que as pimentas têm na cadeia produtiva. A maioria dos programas de melhoramento em *Capsicum* é direcionada a cultivares de pimentão com ampla resistência a patógenos (virose e doenças). Porém, esse cenário tem sido modificado, levando em conta a preocupação dos melhoristas em desenvolver cultivares com foco principal nas características dos frutos como tamanho, forma, teor de capsaicina, cor, firmeza, teor de vitaminas e uniformidade (Luz, 2007).

Como regra geral, as pimentas têm sido usadas em programas de melhoramento de *Capsicum* como fontes de genes importantes, porém ausentes na forma mais cultivada, o pimentão (Pickersgill 1997; Yoon et al. 2006). No Brasil, existem poucas cultivares de pimenta e a maioria delas é de polinização aberta, sendo as cultivares do tipo híbrido ainda pouco comercializadas.

A Embrapa Hortaliças, em seu programa de melhoramento genético, iniciou uma nova linha de pesquisa visando ao desenvolvimento de um produto novo para o mercado, cultivares com frutos de cor amarela. Essa pesquisa foi iniciada com a identificação de um material híbrido do tipo Jalapeño (cultivar híbrida Jalapeño Plus F<sub>1</sub>), cujos frutos maduros são de coloração vermelha. Esta cultivar estava segregando seus frutos para coloração amarela. Três plantas com frutos amarelos foram identificadas e seus frutos, colhidos individualmente. Dando continuidade a esta pesquisa, foi estabelecida uma colaboração entre a Embrapa Hortaliças e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, com o objetivo de caracterizar as linhagens obtidas, utilizando descritores

morfoagronômicos e marcadores moleculares SSR (*Single Simple Repeats*). Assim, esta dissertação compreende dois capítulos: o primeiro se refere à obtenção e caracterização morfoagronômica das linhagens e o segundo, à caracterização, utilizando marcadores moleculares SSR.

## 2.OBJETIVOS

O objetivo geral dessa pesquisa foi obter linhagens de Jalapeño amarelo desenvolvidas a partir de plantas segregantes e indicar as mais promissoras para serem incluídas no programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças.

Os objetivos específicos foram:

- a)Obter linhagens de Jalapeño amarelo;
- b)Caracterizar linhagens de Jalapeño amarelo utilizando descritores morfológicos;
- c)Avaliar agronomicamente as linhagens visando a selecionar as melhores para o desenvolvimento de uma nova cultivar ; e
- d)Analisar molecularmente as linhagens utilizando marcadores microssatélites, visando a identificar o grau de homozigidade entre as linhagens.



### **3.CAPÍTULOS**

#### **3.1.OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOAGRONÔMICA DE LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO**

##### **3.1.1.INTRODUÇÃO**

O cultivo de pimenta (*Capsicum* spp.) no Brasil é de grande importância, tanto pelas suas características de rentabilidade (principalmente quando há agregação de valor ao produto), quanto por sua importância social (por empregar elevado número de mão de obra), principalmente na época da colheita e processamento. Além disso, incentiva a agricultura familiar como alternativa de diversificação da produção, aumentando a fonte de renda, o que, por sua vez, contribui para a redução do êxodo rural (Vilela, 2004; Ribeiro e Reifschneider, 2008). O cultivo de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) alcança uma produção de aproximadamente 270 mil toneladas, com um rendimento próximo dos 210 milhões de reais (IBGE, 2006).

Um dos primeiros relatos com referência à caracterização de plantas de *Capsicum* foi feito por Dioszegi e Fazekas (1807), em relato de Csillery (2006), que utilizou a nomenclatura proposta por Linnaeus para descrever *C. annuum* e

*C. sinense*, mais tarde, denominada *C. chinense*. A descrição e/ou caracterização de espécies é de extrema importância para sua identificação e diferenciação.

O Brasil é considerado um importante centro de diversidade de *Capsicum* (Lourenço et al., 1999). Bianchetti (1996) estima que o Brasil apresente o maior número de espécies silvestres do gênero. Trabalhos de coleta desse gênero identificam a Bacia Amazônica como o centro de diversidade genética para algumas espécies. Para a correta identificação e o melhor conhecimento desse gênero, são necessárias não só a coleta, com o consequente enriquecimento dos Bancos de Germoplasma, mas também uma apropriada caracterização e avaliação dos acessos (Reifschneider et al., 2000).

O melhoramento genético de pimentas teve início com os primeiros agricultores que, ao selecionarem e preservarem tipos de pimentas que se mostravam mais atrativas e interessantes, estavam, involuntariamente, praticando o método de melhoramento conhecido como seleção massal (Reifschneider, 2000). A seleção massal é muito comum no processo de domesticação de espécies, sendo as plantas menos produtivas e as defeituosas eliminadas e as remanescentes, que apresentam as melhores características quanto à adaptabilidade e produtividade, mantidas (Allard, 1971). Com isso, os próprios agricultores faziam e fazem melhoramento sem a necessidade de técnicas mais sofisticadas de experimentação.

O melhoramento de pimentas é similar àquele praticado para as outras solanáceas como o tomate, a berinjela e o pimentão. Em sendo, na sua grande maioria, espécies autógamas, o melhoramento de pimentas e pimentões segue as metodologias empregadas para espécies que se autofecundam. Os principais métodos de melhoramento usados no desenvolvimento de cultivares de pimenta são: Método Genealógico ou *Pedigree*, Método Descendente de Uma Única Semente - SSD (*Single Seed Descent*), Retrocruzamento de Linhagens - IBLS (do inglês "*Inbred Backcross Line System*") e Retrocruzamento (Ribeiro & Reifschneider, 2008).

As pimentas têm sido usadas em programas de melhoramento de *Capsicum* como fontes de genes importantes, porém ausentes na forma mais cultivada, o pimentão (Pickersgill, 1997). No Brasil, existem poucas cultivares de

pimenta registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), e apenas duas são protegidas ('BRS Garça' e a 'BRS Sarakura'), as quais têm frutos vermelhos. Recentemente, a Embrapa Hortaliças (CNPq) iniciou um programa de melhoramento de pimenta, visando ao desenvolvimento de um produto novo para o mercado: cultivares com frutos de cor amarela. Em um experimento de VCU (Valor de Cultivo e Uso), no campo experimental da Embrapa Hortaliças (CNPq), havia entre as testemunhas uma cultivar híbrida do tipo Jalapeño (Jalapeño Plus F<sub>1</sub>), cujos frutos maduros eram de coloração vermelha. Esta cultivar estava segregando para frutos de coloração vermelha e amarela. Três plantas com frutos amarelos foram identificadas e seus frutos, colhidos individualmente. Assim, esta pesquisa se iniciou com a estratégia de avançar gerações utilizando o método de Descendência de Uma Única Semente (SSD) e obter linhagens uniformes e adaptadas às condições brasileiras de Jalapeño com cor de fruto amarelo quando maduro.

O objetivo desse trabalho foi obter e caracterizar morfológicamente as linhagens em S<sub>5</sub> do programa de melhoramento de Jalapeño amarelo (*Capsicum annum* var. *annuum*) da Embrapa Hortaliças, utilizando os descritores elaborados pelo *Bioversity International* (ex-IPGRI), com o intuito de verificar aquelas que apresentam as melhores características, associando essa caracterização a avaliações agronômicas, para, posteriormente, serem selecionadas linhagens promissoras.

### 3.1.2. REVISÃO DE LITERATURA

#### *Aspectos gerais da cultura*

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae, tribo Solaneae, subtribo Capsicina (Hunziker, 2001), apresentando 31 espécies, apenas cinco delas consideradas domesticadas: *Capsicum annum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens*

Ruiz & Pav. De acordo com Eshbaugh (1970), a Bolívia é considerada o país de origem do gênero *Capsicum*, tendo as espécies *C. annuum* e *C. frutescens* sido domesticadas na Mesoamérica, enquanto *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens* foram domesticadas na América do Sul (Pickersgill, 1997).

Essas cinco espécies formam três complexos que têm por base a cruzabilidade entre elas e a fertilidade de seus híbridos, sendo, portanto, um complexo formado por espécies que podem ser cruzadas, embora algumas vezes com dificuldade, para conseguir progênie híbrida fértil. O complexo *C. annuum* inclui três espécies e suas formas botânicas *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, sendo este o complexo mais amplamente distribuído nas Américas e no mundo inteiro; o complexo *C. baccatum* consiste de pelo menos três espécies, *C. baccatum*, *C. praetermissum* e *C. tovarii*; e o complexo *C. pubescens*, formado por *C. pubescens* Ruiz & Pav., *C. cardenasii* Heiser & Smith e *C. eximium* Hunz (Eshbaugh, 1970; Pickersgill, 1997; Ibiza et al., 2011).

*Capsicum annuum* inclui a maioria das pimentas mexicanas, pimentas pungentes da África e Ásia e muitas das cultivares de pimenta doce cultivadas em países temperados. No entanto, ela não é bem adaptada às planícies úmidas dos trópicos, onde, ao menos na América Latina, ela é substituída por *C. frutescens* e *C. chinense* (Pickersgill, 1997). *C. annuum* tem duas formas botânicas: *C. annuum* var. *annuum*, que inclui pimentas e pimentões, e *C. annuum* var. *glabriusculum*, representada por pimentas ornamentais. As pimentas podem ser classificadas em doces ou não pungentes e pungentes, pela presença de capsaicina, substância que causa a ardência. A presença de pungência é devida a um gene de maior dominância, *Pun1* ou *C*, porém, sua expressão varia entre espécies e cultivares pela presença de genes modificadores e condições ambientais (Paran e Knaap, 2007).

As plantas de *Capsicum* têm flores hermafroditas, com número de pétalas variável, prevalecendo as pentâmeras. O caule é herbáceo e geralmente precisa ser tutorado quando conduzido para fins agronômicos; os frutos são do tipo baga (Reifschneider, 2000). *C. annuum* var. *glabriusculum* apresenta corola sem a presença de manchas, brancas com borda roxa ou totalmente arroxeadas, além de anteras roxas. *C. annuum* var. *annuum* (representada por pimentas e

pimentões) apresenta como características flores solitárias, corola branca, anteras azuis, ausência de manchas na corola e de constrição anular na junção do cálice com o pedicelo.

Entre as pimentas, destaca-se a do tipo Jalapeño, que apresenta uma grande variabilidade. É a pimenta mais popular da América do Norte, considerada uma das melhores pimentas para a produção de molhos. Seu nome homenageia a cidade de Xalapa, capital de Vera Cruz, México, país considerado seu centro primário de diversidade (Carvalho et al., 2006). Os centros secundários dessa espécie abrangem uma pequena área dos continentes Europeu, Africano, Asiático e da América Latina (Ribeiro et al., 2008). Os frutos têm tamanhos que variam de 5 a 8 centímetros de comprimento e 2,5 a 3 centímetros de largura, a coloração varia de verde claro a verde escuro quando imaturos, passando a vermelhos quando maduros. As paredes dos frutos são grossas, com evidentes estrias na epiderme. Seus frutos geralmente apresentam formas cônicas, com uma pungência média e aroma acentuado, sendo consumida fresca, desidratada ou em pó (Carvalho et al., 2006).

No cenário brasileiro, ressalta-se que em sua maioria as cultivares são importadas, ou seja, pouco adaptadas às condições edafoclimáticas do Brasil. Não existem cultivares de Jalapeño amarelo desenvolvidas para o Brasil. Existem poucas cultivares de Jalapeño com frutos amarelos que são importadas de distintos países e particularmente dos Estados Unidos da América. É interessante observar que existe demanda inicial e crescente de Jalapeño com frutos amarelos, principalmente para a indústria de molhos (Reifschneider, comunicação pessoal). Com isso, há uma demanda que deve ser atendida, seja pelo setor público seja pelo setor privado, e interpretada como uma boa oportunidade de desenvolvimento de nova cultivar pela Embrapa.

#### *Caracterização e avaliação de pimentas Capsicum*

A caracterização botânica e as avaliações agronômicas são normalmente as formas mais acessíveis para avaliar a diversidade genética, e seu uso potencial tem sido bastante utilizado nas coleções de germoplasma de *Capsicum*

mantidas pelo setor público brasileiro. As principais instituições públicas com coleções de *Capsicum* são: Embrapa Hortaliças (Carvalho et al., 2003), Embrapa Clima Temperado (Büttow et al., 2010), Embrapa Roraima (Luz, 2007), Instituto Agrônomo de Campinas, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Sudré et al., 2010), Universidade Federal do Piauí (Monteiro et al., 2010), Universidade Federal do Amazonas (Fonseca et al., 2008), Universidade Federal da Paraíba (Sapucay et al., 2009), Universidade Federal de Viçosa (Finger et al., 2010) e Universidade Federal de Roraima (Rêgo et al., 2011).

Informações a respeito da caracterização de genótipos dos Bancos de Germoplasma servem para aumentar a eficiência dos trabalhos de melhoramento de espécies cultivadas, conhecer a variabilidade existente, gerar informações úteis para preservação e uso dos genótipos, além de possibilitar a identificação de possíveis duplicatas (Geleta et al., 2005). Essa atividade de caracterização tem alto custo e envolve muitas áreas do conhecimento e só é justificável se esses recursos genéticos caracterizados forem utilizados ou, ainda, se houver expectativa de uso futuro (Nass, 2001).

A caracterização tem por base dados botânicos de alta herdabilidade, de detecção ou mensuração fácil e que sofram pouca interação genótipo x ambiente. Aspectos morfológicos e fenológicos devem ser notados de forma metódica, utilizando lista de descritores (Sudré, 2003).

Vários autores têm caracterizado suas coleções de *Capsicum*, tendo essas caracterizações possibilitado a identificação da divergência entre acessos desse gênero. Bento et al. (2007) descrevem que as características que mais possibilitam verificar essas divergências são: números de frutos por plantas, número de sementes por fruto, diâmetro de copa e o comprimento da folha. Adicionalmente, concluíram que a análise de variáveis multicategóricas se mostrou eficiente no agrupamento dos acessos de pimenta no estudo, indicando que seu emprego na quantificação da divergência fenotípica e na identificação de grupos heteróticos pode auxiliar no manejo do Banco de Germoplasma e na seleção de acessos para programas de melhoramento.

Ramos et al. (2001) caracterizaram 22 acessos de *Capsicum* utilizando 12 descritores de frutos. Desses acessos caracterizados, nove foram identificados

como *C. frutescens*, oito como *C. chinense*, dois como *C. baccatum* e três não puderam ser identificados com base nesses descritores.

Büttow et al. (2010) caracterizaram 20 acessos de *C. annuum* com base em 36 descritores morfológicos, tendo a moda de cada descritor sido utilizada para a análise feita. Os autores observaram que os descritores que apresentaram as maiores diferenças de classes entre os acessos foram “espessura da parede do fruto” e “ombro do fruto”.

Medeiros (2012), utilizando 12 descritores, avaliou dez híbridos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* e verificou, com base no teste de médias de Scott-Knott, que dois descritores apresentaram maior variação para determinação dos grupos: o primeiro foi o descritor de comprimento de frutos e em seguida o de diâmetro do fruto, enquanto os que apresentaram menor variação foram diâmetro da copa, altura de planta e massa dos frutos por parcela, sendo esses últimos descritores responsáveis por formar um único grupo.

Diferentemente da caracterização morfológica, a avaliação agrônômica, quantitativa, é aplicada a caracteres de baixa herdabilidade. Portanto, para que os dados possam ser mais confiáveis, é necessária a adequação a um modelo experimental que obedeça aos princípios básicos da experimentação agrícola (Valls, 1988).

### *Descritores*

As listas de descritores são desenvolvidas conjuntamente pelo IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*, atualmente *Bioversity International*) e FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), de modo a estabelecer padrões internacionais, o que facilita o intercâmbio de informação de dados de passaporte do germoplasma, com base nos descritores do IPGRI e com aqueles usados pelo WIEWS (FAO - *World Information and Early Warning System*) sobre recursos genéticos vegetais (IPGRI, 1995).

Para cada descritor é dada uma breve explicação do conteúdo, do esquema de codificação e sugeridos nomes de campo, de forma a facilitar o intercâmbio. Reconhece-se que redes ou grupos de utilizadores podem querer

expandir esta lista de descritores para responder às suas necessidades específicas.

Usualmente, descritores morfológicos são influenciados pela ação do ambiente e por fatores genéticos, o que pode limitar seu uso na diferenciação de genótipos. Desta forma, os caracteres utilizados devem apresentar variação intercultivar suficientemente alta e serem suficientemente constantes em distintos ambientes (Cavalli, 2003).

O gênero *Capsicum* apresenta uma grande importância mundial, tanto relacionada à produção, quanto à pesquisa para diversas áreas (farmacológica, médica, entre outras). Essas pesquisas e estudos geram dados que podem ser comparados e utilizados por diversos pesquisadores e instituições. Levando em consideração essa importância, foram elaborados pelo IPGRI mais de 100 descritores para o gênero. Os 116 descritores de maior relevância para esse gênero são divididos em: 64 descritores de resistência a fitopatógenos; 32 descritores para insetos; 10 descritores para nematoides; e 10 descritores para estresses abióticos.

Com o objetivo de simplificar a caracterização do uso dos descritores desenvolvidos, eles foram agrupados em cinco categorias (IPGRI, 1995):

**Descritores de passaporte:** proporcionam informações básicas como origem do acesso, local de coleta, entre outras, relacionadas à identificação;

**Descritores de manejo:** fornecem dados de manejo do acesso como data de multiplicação e/ou regeneração;

**Descritores ambientais:** relacionados às condições ambientais dos locais quando as etapas de caracterização e avaliação foram realizadas, sendo muito importantes na interpretação de resultados;

**Descritores de caracterização:** permitem uma discriminação fácil e rápida entre os fenótipos. Geralmente são características altamente herdáveis, podendo ser facilmente detectadas através da simples observação a campo e que se expressam igualmente em ambientes diversos; e

**Descritores de avaliação:** são descritores sensíveis às diferenças ambientais, porém muito úteis para o melhoramento das culturas, e envolvem a determinação de desempenho agrônômico.



De acordo com as categorias descritas e com o número de descritores existentes, torna-se praticamente inviável utilizar todos os descritores para caracterizar um grande número de acessos. A lista de descritores é muito extensa e vários deles não são discriminantes. Por esta razão, a tendência é utilizar primeiramente os descritores discriminantes tanto para caracterização quanto para avaliação (Valls, 1988). Com o estabelecimento desses descritores, a caracterização da espécie tem sido mais confiável, possibilitando uma linguagem padronizada entre os pesquisadores de vários países, denotando uma linguagem científica, o que facilita a troca de informações.

### *Melhoramento Genético*

As espécies cultivadas de *Capsicum* são todas diploides, com  $2n = 2x = 24$  cromossomos, sendo os cariótipos variáveis dependendo da espécie; entretanto, há um grupo de espécies silvestres diploides, com  $2n = 2x = 26$  cromossomos (Pozzobon et al., 2006).

Programas de melhoramento de *Capsicum* são conduzidos tanto por empresas públicas como privadas e por universidades. Atualmente, os programas de melhoramento em *Capsicum* são alicerçados em procedimentos, com princípios e métodos científicos, que permitem precisão e ganho de tempo, os grandes entraves a serem ultrapassados pelos melhoristas de plantas. A obtenção de novas variedades (cultivares) pode alcançar até oito anos de intenso trabalho de melhoramento até se obter a excelência exigida pelo mercado.

De acordo com Ribeiro e Reifschneider (2008), os principais métodos de melhoramento usados no desenvolvimento de cultivares de pimenta são: Método Genealógico ou *Pedigree*, que se baseia na seleção individual de plantas superiores, sendo mantido um registro de todas as relações entre os genitores e as respectivas progênes. A seleção é iniciada na geração  $F_2$ , na qual, segundo o julgamento do melhorista, são escolhidos os indivíduos que deverão dar as melhores progênes; Método dos Descendentes de Uma Única Semente - SSD (do inglês "*Single Seed Descent*") em que as gerações são avançadas, tomando-se uma única semente de cada indivíduo em cada geração, até se chegar a um

nível satisfatório de uniformidade; Retrocruzamento, que envolve o cruzamento de uma cultivar selecionada com um genitor que apresenta uma ou poucas características de grande interesse e o cruzamento da geração filial com o progenitor recorrente; Retrocruzamento de Linhagens - IBLS (do inglês "*Inbred Backcross Line System*"), que é uma mistura dos métodos de Retrocruzamento e SSD;

Entre os trabalhos de melhoramento de grande relevância histórica para o gênero *Capsicum*, estão aqueles desenvolvidos no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), sob a orientação do Dr. Hiroshi Nagai, visando ao desenvolvimento de cultivares resistentes ao vírus do mosaico. O trabalho verificou o efeito da combinação híbrida entre quatro variedades de pimentas e pimentões disponíveis naquela época. A hibridação entre essas quatro cultivares foi definida de acordo com avaliações preliminares realizadas em nível de campo (inoculação mecânica da estirpe viral), em que essas quatro (entre 100 avaliadas) demonstraram melhor desempenho quanto à resistência ao vírus do mosaico. Em sucessivas avaliações durante o avanço das gerações (via SSD) e retrocruzamentos realizados com o objetivo de que os frutos tivessem as características desejáveis do mercado, foram desenvolvidas duas variedades, a 'Agrônomo 7' e a 'Agrônomo 8', que tinham como características a produtividade e a resistência ao vírus do mosaico (PVY), que satisfaziam plenamente a exigência e as necessidades do mercado produtor e consumidor (Nagai, 1968). Seis anos foram necessários até a obtenção dessas duas variedades. Verificando que as características dos frutos poderiam ser melhoradas quanto à aparência, Nagai fez o cruzamento entre 'Agrônomo 8' e a variedade 'Ikeda', o que possibilitou obter a mais importante cultivar de pimentão da época, o 'Agrônomo 10', que proporcionou o cultivo em grande parte dos países latino-americanos que estavam sendo dizimados pelo mosaico (causado pelo vírus Y). Os frutos desta cultivar apresentam forma cônica, preferência do mercado consumidor da época.

Entre os mais recentes trabalhos de importância para esse gênero, merece destaque o programa de melhoramento de *Capsicum* (programa iniciado em 1980), desenvolvido por pesquisadores da Embrapa Hortaliças, Brasília - DF.

Diversas cultivares foram lançadas nos últimos dez anos. Entre elas, estão duas cultivares de *C. annuum*, a 'BRS Sarakura' (pimenta do tipo jalapeño vermelha) e a 'BRS Garça' (pimenta do tipo jalapeño vermelha); duas *C. chinense*, a 'BRS Moema' (pimenta do tipo biquinho) e a 'BRS Seriema' (pimenta do tipo bode); e uma *C. baccatum*, 'BRS Mari' (pimenta do tipo dedo-de-moça). A 'BRS Sarakura' foi obtida pelo método genealógico ou *pedigree*, e suas principais características são: hábito de crescimento intermediário, porte baixo, cerca de 30 a 50 cm de altura; frutos com formato triangular, coloração vermelho escuro quando maduros, com estrias na superfície; e conteúdo de capsaicina (picância) de 58.000 SHU (Unidade de Calor Scoville). Fora observadas alta uniformidade das plantas em campo e homogeneidade para os descritores avaliados. Essa cultivar hoje se destaca entre as pimentas do tipo Jalapeño, por ser uma das mais importantes cultivares utilizadas para a fabricação de molhos de pimenta no Brasil (Carvalho et al., 2009).

Entre as instituições públicas de ensino, merecem destaque os trabalhos conduzidos pela Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, que direciona seu programa de melhoramento em *Capsicum* para o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças relacionadas à bactéria (mancha bacteriana), vírus (*Pepper yellow mosaic virus*) e fungos (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Costa et al., 2002; Riva et al., 2007; Bento et al., 2009; Moreira et al., 2009; Gonçalves et al., 2011; Silva et al., 2011). Os trabalhos de melhoramento que utilizam o método SSD para desenvolvimento de cultivares geralmente têm por objetivo a obtenção de linhagens (geração  $S_6$  com valor médio de homozigose de 98,4%), que são selecionadas para a produção de híbridos  $F_1$ . Essa metodologia fortalece a importância do método SSD na obtenção de cultivares e no ganho de tempo para se obter genótipos com as características fixadas. Moreira et al. (2009) relatam o uso do método SSD para avanço das gerações de uma população  $F_2$  do cruzamento entre o acesso UENF 1421 (pimentão suscetível à mancha bacteriana) e o acesso UENF 1381 (resistente à mancha bacteriana), em que as gerações avançaram até a  $F_6$ . Após atingir esse nível de homozigose, foram feitos os testes de resistência à mancha

bacteriana. Como conclusões do trabalho, foram recomendadas duas linhagens com alta capacidade de produção e resistência à mancha bacteriana.

Villalón et al. (1994) trabalharam com uma população de Jalapeño resistente a viroses (população F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>, progenitores 'PI 264280' pimenta do tipo serrana x 'AC 2207' tipo pimentão), em que foi selecionado o genótipo TAES 71136, que é amplamente utilizado em diversos programas de melhoramento de *Capsicum* nos Estados Unidos. O TAES 71136 foi cruzado com o Jalapeño 1158 (origem desconhecida) e desse cruzamento foi obtido o TAES 73116, que foi cruzado mais uma vez com a cultivar Jalapeño L, originando J 76064, que foi submetido à hibridação com a cultivar 'Caloro' (pimentão amarelo e pequeno) - desenvolvido pela Universidade da Califórnia. Essa última hibridação teve por objetivo transferir a cor de fruto (amarelo), o sabor, a pungência, a precocidade e a produtividade dessa cultivar. A população dessa hibridação foi então conduzida por seis gerações (F<sub>6</sub>), sendo então selecionada uma das linhagens. Após cinco ciclos de autofecundação, foi obtido como produto final a cultivar 'Jaloro', que tem como características principais frutos de coloração amarelo ouro e resistência a seis vírus. Essa foi a primeira cultivar de Jalapeño com essas características desenvolvida para as condições norte-americanas.

### 3.1.3.MATERIAL E MÉTODOS

#### *Material genético*

Este trabalho teve início no ano de 2008, durante o período de estágio de graduação do autor. No início, foi possível acompanhar o processo de obtenção dessas novas linhagens.

O desenvolvimento deste trabalho foi feito utilizando plantas segregantes de uma cultivar comercial do tipo Jalapeño. O plantio da parcela foi feito no 2º semestre de 2008, no campo experimental da Embrapa Hortaliças, localizada no km 09 da BR 060 - rodovia Brasília/Goiânia, a 15°55'59.8" de latitude sul,

48°08'34.2" de longitude oeste e altitude de 973 metros. De um total de dez plantas de uma parcela da 'Jalapeño Plus F<sub>1</sub>', foram identificados três indivíduos produzindo frutos amarelos. Foi colhido um fruto de cada uma das plantas, e as sementes desses frutos foram extraídas e beneficiadas de acordo com a RAS (Regra de Análise de Sementes; Brasil, 2009). Posteriormente, foram catalogados no Banco de Melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. A cultivar 'Jalapeño Plus F1' se caracteriza por apresentar planta compacta, com excelente cobertura foliar, frutos com coloração vermelha, tamanho 10,2 x 3,5 cm, uniformidade e ciclo de 125 dias. Essa cultivar estava sendo utilizada como testemunha em experimento conduzido na Embrapa Hortaliças (Figuras 1A e 1B).

O fruto da planta 1 foi registrado como CNPH 25.000, o fruto da planta 2, como CNPH 25.001, e o fruto da planta 3, como CNPH 25.002. O fruto CNPH 25.000 deu origem a uma progênie de 17 indivíduos (CNPH 25.003 a CNPH 25.019); o CNPH 25.001, a 13 genótipos (CNPH 25.020 a CNPH 25.032); e o CNPH 25.002 deu origem a sete genótipos (CNPH 25.033 a CNPH 25.039), perfazendo um total de 37 genótipos.

Esses genótipos foram semeados em bandejas de poliestireno expandido com 72 células, com substrato Plantmax<sup>®</sup>, mantidas em uma casa de vegetação - sementeira - com cobertura plástica. Após aproximadamente 25 dias, as plântulas foram transplantadas para vasos de 10 litros, com solo devidamente adubado de acordo com as normas internas da Embrapa Hortaliças, e transportadas para casa de vegetação (Figuras 1C e 1D).

Na casa de vegetação, os genótipos foram dispostos em fileiras duplas com espaçamento de 1,0 m entre fileiras e 0,7 m entre vasos. Foram adotados o sistema de irrigação por gotejamento e o manejo fitotécnico e sanitário recomendado para o cultivo protegido de *Capsicum* (Embrapa, 2010).



**Figura 1 - 1A** - Plantas segregantes de *C. annuum* var. *annuum*, da cultivar Jalapeño Plus F<sub>1</sub>; **1B** – Planta com frutos amarelos e outra planta com frutos vermelhos; **1C** e **1D** – Perspectiva do telado, com as linhagens de Jalapeño amarelo para autofecundação.

#### *Método de Melhoramento*

As gerações foram avançadas seguindo a metodologia *Single Seed Descent*, (SSD) ou Descendente de Uma Única Semente, com modificação (SSD-M). A modificação feita nesse trabalho foi alicerçada no uso de um fruto para o avanço da nova geração, e a cada nova geração eram semeadas cinco sementes, mas somente uma plântula era conduzida até a fase de maturação dos frutos, as demais eram desbastadas ainda na fase de plântula.

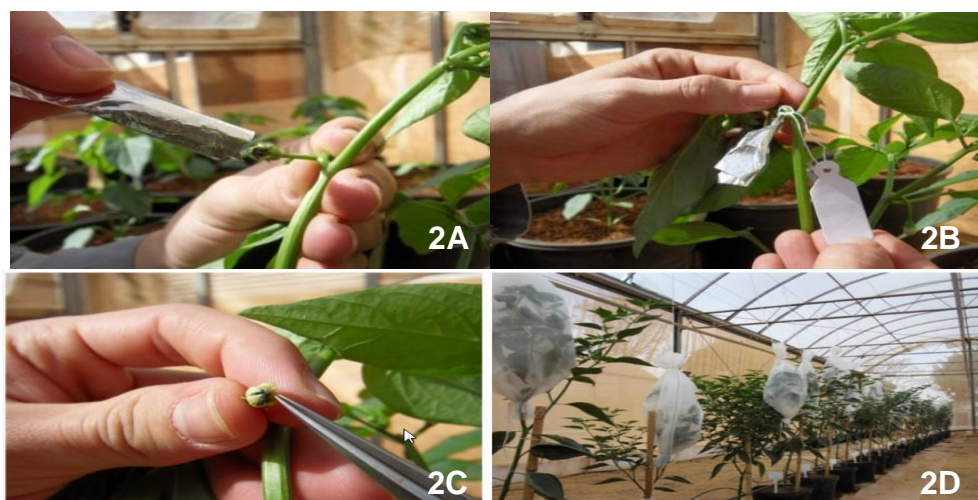
Para a realização do método (SSD-M), os botões florais de cada genótipo foram protegidos por um copinho de papel alumínio antes da antese, Figuras 2A e 2B, evitando que quando o estigma estivesse viável ele recebesse pólen de outros genótipos, impedindo, assim, a possibilidade de fecundação cruzada.

Para garantir a autofecundação, foi também feita a polinização manual de botões, e com uma pinça, os grãos de pólen foram retirados das anteras e, em seguida, depositados no estigma da mesma flor. Após esse procedimento, o botão floral polinizado foi protegido com um copinho de papel alumínio e no decorrer de 15 dias verificou-se se houve a fertilização pela existência de fruto.

Outro procedimento também utilizado foi a proteção das flores com gaiolas com telas antiafídicas, método utilizado em último caso, em que um galho da planta foi selecionado, feita a limpeza das flores já polinizadas ou frutos e colocada essa gaiola cobrindo esse galho e os frutos ali gerados, apresentaram menor possibilidade de polinização cruzada (Figuras 2C e 2D).

Durante o avanço de gerações, foi feita a eliminação de plantas com frutos de coloração vermelha, visto ter ocorrido segregação para cor de fruto variando de amarelo a vermelho, tendo sido mantidos apenas os genótipos que apresentavam frutos de coloração amarela. Os genótipos foram autofecundados por cinco ciclos consecutivos e, pelas condições em que as plantas eram cultivadas, foi possível avançar cerca de duas gerações (autofecundação) por ano.

A simbologia utilizada neste estudo é a seguinte:  $F_{(1-n)}$  é utilizado para identificar o número de gerações avançadas a partir de uma população original, enquanto  $S_{(0-n)}$  é utilizado para identificar gerações obtidas por autofecundação.



**Figura 2 - 2A** – Proteção do botão floral (*C. annuum* var. *annuum*) com copinho de papel alumínio; **2B** – Identificação do botão floral; **2C** – Polinização por pinça; e **2D** – Proteção com tela antiafídica.

### *Condução do experimento*

O experimento foi instalado de dezembro de 2012 a março de 2013, no campo experimental da Embrapa Hortaliças, localizada no km 09 da BR 060 - rodovia Brasília/Goiânia, a 15°55'58.2" de latitude sul, 48°08'27.4" de longitude oeste e altitude de 970 metros.

Foram utilizadas 27 linhagens ( $S_5$ ), além de duas testemunhas introduzidas para fins comparativos; uma se caracteriza por ser a genitora das linhagens de Jalapeño amarelo, CNPH 3836, e a outra foi a cultivar 'BRS Garça' (*C. annuum*). As linhagens testadas foram: CNPH 25.361, CNPH 25.368, CNPH 25.369, CNPH 25.370, CNPH 25.371, CNPH 25.372, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375, CNPH 25.376, CNPH 25.377, CNPH 25.378, CNPH 25.379, CNPH 25.380, CNPH 25.381, CNPH 25.382, CNPH 25.383, CNPH 25.384, CNPH 25.385, CNPH 25.386, CNPH 25.387, CNPH 25.388, CNPH 25.389, CNPH 25.390 e CNPH 25.391.

Foram semeadas 30 sementes de cada linhagem em bandejas de poliestireno expandido com 72 células, com substrato Plantmax<sup>®</sup>, mantidas em uma casa de vegetação - sementeira - com cobertura plástica. Após aproximadamente 45 dias, as plântulas foram transplantadas para o campo experimental. Foram transplantadas cinco plantas de cada genótipo por parcela, sendo que a parcela útil do experimento foi constituída pelas três plantas centrais. O espaçamento utilizado foi de 1,0 m entre linhas e 0,5 m entre plantas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com três repetições. Durante o desenvolvimento das plantas, foram feitos os tratamentos culturais recomendados para a cultura (Embrapa, 2013). A condução do experimento foi feita de janeiro a abril, fora da época propícia ao cultivo de pimentas no Planalto Central.

### *Descritores utilizados*

Para a caracterização das linhagens, foram considerados cinco descritores (IPGRI, 1995).



- **Produção de frutos por parcela (PF)** – Soma da massa fresca de todos os frutos da parcela útil, mensurada por balança de precisão, em gramas.
- **Comprimento do fruto (CF)** – Mensurado no maior comprimento, em milímetros, quando o fruto estava maduro, utilizando paquímetro digital. Foram avaliados cinco frutos por parcela, totalizando 15 frutos, tomados ao acaso.
- **Largura Basal do fruto (LBF)** – Mensurada na parte superior do fruto (após o pedúnculo), em milímetros, quando o fruto estava maduro, utilizando paquímetro digital. Foram avaliados cinco frutos por parcela, totalizando 15 frutos, tomados ao acaso.
- **Largura Mediana do fruto (LMF)** – Mensurada no meio do fruto, em milímetros, quando o fruto estava maduro, utilizando paquímetro digital. Foram avaliados cinco frutos por parcela, totalizando 15 frutos, tomados ao acaso.
- **Espessura de polpa do fruto (EPF)** – Mensurada a partir de um corte transversal no meio do fruto, em milímetros, quando o fruto estava maduro, utilizando paquímetro digital. Foram avaliados cinco frutos por parcela, totalizando 15 frutos, tomados ao acaso.

#### *Avaliação agronômica qualitativa preliminar*

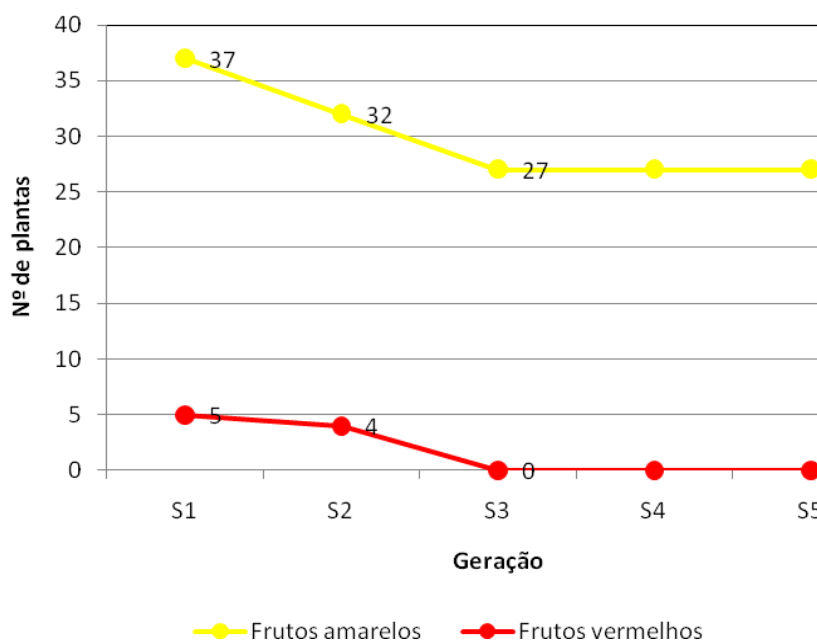
Adicionalmente, foi feita uma avaliação qualitativa preliminar, levando em consideração o porte da planta (verificado visualmente nas parcelas, classificado em alto ou baixo), a cor das folhas (verificado visualmente pela tonalidade das folhas das plantas, verde claro ou verde escuro) e a incidência de doenças (presença ou não de sintomas das doenças foliares). Esta avaliação foi feita por dois avaliadores independentes no final do ciclo (maio de 2013).

### Análise estatística do experimento

Os dados obtidos no experimento foram analisados, utilizando o programa R (*R Development Core Team, 2010*), com o qual se fez o agrupamento de médias de Scott-Knott (1974), em nível de significância de 1%.

### 3.1.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cada novo ciclo de avanço das gerações, os genótipos passaram por seleção visual e, gradativamente, as plantas com frutos vermelhos foram sendo reduzidas (Figura 3). A partir da terceira geração ( $S_3$ ), não houve mais surgimento de frutos vermelhos, apenas de frutos amarelos, e a população se estabilizou quanto à segregação na cor do fruto e isso provavelmente está associado ao nível de homozigose (cerca de 87,5%) que as plantas atingiram nessa geração.



**Figura 3** - Número de plantas de *C. annuum* var. *annuum* com frutos de cor amarela e vermelha, a cada geração de autofecundação.

O método de melhoramento SSD-M possibilitou o avanço rápido das gerações de autofecundação dos genótipos. Em 30 meses de trabalho, foi possível obter cinco gerações de autofecundação ( $S_5$ ) dos genótipos, devido ao avanço de gerações ter sido conduzido em casa de vegetação.

O método foi considerado viável e simples porque é de fácil condução, com baixo requerimento de mão de obra, já que exclui sucessivas avaliações durante o avanço das gerações. Considerando a escassez de mão de obra técnica nas instituições públicas e privadas e a baixa utilização deste recurso por este método quando comparado aos demais métodos de melhoramento, esta metodologia é interessante para os programas de melhoramento.

A avaliação preliminar das linhagens na geração  $S_3$ , Tabela 1, possibilitou ganho de tempo com relação ao objetivo final do trabalho, visto terem sido eliminadas linhagens que não correspondiam ao desejado. As características das linhagens permitiram identificar algumas com potencial para atender à demanda do mercado, tais como: CNPH 25.196, que apresentou comprimento de fruto de 92 mm; CNPH 25.180, com largura mediana dos frutos de 28 mm; CNPH 25.192, que se destacou pela largura basal do fruto (29 mm) e pela espessura de polpa (4,6 mm); e CNPH 25.182, que apresentou o maior valor para altura de planta, com 44 cm, que poderia ser de interesse para colheita mecânica. Com o objetivo de permitir comparação com cultivar brasileira de frutos vermelhos 'BRS Garça', apresenta os seguintes valores: comprimento do fruto de 90 mm, diâmetro do fruto 30 mm e altura de planta 65 cm.

**Tabela 1** - Características avaliadas nas 28 linhagens de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*), na geração S<sub>3</sub>. Média de cinco frutos e de três plantas. Brasília, Embrapa, 2010.

CNPH	Frutos				Planta
	Comprimento (mm)	Largura (mm)		Espessura de polpa (mm)	Altura de planta (cm)
		Mediana	Basal		
25.180	73	28	29	4,1	36
25.181	71	24	26	3,7	31
25.182	82	25	26	4,0	44
25.183	67	23	26	3,6	33
25.184	67	26	28	4,2	33
25.185	70	24	26	3,4	34
25.187	66	23	25	3,0	30
25.188	72	27	29	3,8	40
25.189	62	26	27	3,5	31
25.190	75	25	28	4,0	28
25.191	71	24	26	3,2	40
25.192	74	26	29	4,6	40
25.193	73	26	28	3,9	42
25.194	77	22	24	3,4	25
25.195	80	21	22	2,4	28
25.196	92	18	19	2,3	39
25.197	80	16	17	2,0	32
25.198	85	21	21	2,2	26
25.199	66	21	22	2,4	30
25.200	91	24	24	3,2	44
25.201	79	22	22	2,5	34
25.202	76	21	21	2,8	28
25.203	73	22	22	2,5	35
25.204	80	27	29	3,9	24
25.205	76	24	24	2,8	26
25.206	83	27	26	4,0	30
25.207	64	24	26	3,5	19
25.208	96	26	27	4,3	24

### *Avaliação das linhagens S<sub>5</sub>*

Pela utilização de descritores para caracterização, foi possível detectar variação entre as 24 linhagens avaliadas (Figura 4). Devido à implantação do experimento em época de alta precipitação (janeiro), dois genótipos (CNPH 25.380 e CNPH 3836) foram perdidos. Essas perdas foram ocasionadas pela alta incidência de doenças foliares, principalmente mancha bacteriana e antracnose (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D).



**Figura 4** - Variação observada entre três frutos (*C. annuum* var. *annuum*) representativos de três linhagens de Jalapeño amarelo (colhidas ao acaso) e a testemunha 'BRS Garça' (vermelha).



**Figura 5** – **5A** e **5B** -Plantas com sintomas de mancha bacteriana; **5C** - Folha com sintoma de antracnose; e **5D** - Fruto com sintoma de antracnose.

Houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre os tratamentos para os cinco descritores morfológicos produção de frutos por parcela, comprimento do fruto, largura basal do fruto, largura mediana do fruto e espessura de polpa do fruto (Tabela 2). Silva et al. (2011) propuseram uma escala que divide os coeficientes de variação (CVs) obtidos para pimenta em quatro grupos (baixo, médio, alto e muito alto), para seis descritores morfológicos (peso médio do fruto, comprimento do pedúnculo, comprimento do fruto, maior e menor diâmetro do fruto e espessura do pericarpo). Segundo esse estudo, os CVs obtidos na presente pesquisa se enquadram em: muito alto ( $CV > 29,59$ ) para produção de frutos; médio ( $8,23 < CV \leq 14,57$ ) para comprimento do fruto; médio ( $6,61 < CV \leq 11,63$ ) para largura basal e mediana do fruto; e médio ( $12,29 < CV \leq 24,73$ ) para espessura de polpa do fruto.

Sudré (2003), fazendo a caracterização agronômica de uma população de *Capsicum* spp., encontrou valores de coeficiente de variação para comprimento do fruto (8,55%), diâmetro do fruto (6,93%) e peso de frutos por planta (41,45%), próximo aos apresentados neste trabalho. Monteiro et al. (2010) encontraram

coeficiente de variação de 8,9% para largura de fruto. Moreira (2010) apresentou o coeficiente da variação para produção de 23%; para diâmetro de fruto, o coeficiente de variação foi de 17,04%. Sousa e Maluf (2003) registraram um coeficiente de variação de 45,54% para produção total de fruto de pimenta; para comprimento de fruto e diâmetro de fruto, o coeficiente de variação foi de 8,05 e 12,06%, respectivamente.

As médias das linhagens para os cinco descritores foram agrupadas pelo teste de comparação múltipla Scott-Knott (1974) (Tabela 3).

**Tabela 2** - Análise de variância de cinco características avaliadas em 24 linhagens de Jalapeño amarelo e uma testemunha (cultivar “BRS Garça”) *Capsicum annuum* var. *annuum*. Brasília, Embrapa, 2013.

F.V	G.L	Quadrados Médios				
		PF	CF	LBF	LMF	EPF
Blocos	2	573,88	87,09	7,26	13,44	1,05
Genótipos	24	216,38**	214,91**	22,18**	11,29**	0,82**
Resíduo	48	69,47	34,80	3,52	2,93	0,27
Média Geral		749,60	66,56	25,61	23,38	2,92
C.V (%)		33,46	8,6	7,33	7,32	17,93

PF = produção total de frutos (g); CF = comprimento de fruto (mm); LBF = largura basal dos frutos (mm); LMF = largura mediana dos frutos (mm); EPF = espessura de polpa dos frutos (mm).

**Tabela 3** - Avaliação de 24 linhagens de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*) e uma testemunha comercial com relação a cinco descritores. Médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a P= <0,01%. Brasília, Embrapa, 2013.

Genótipo	Produção		Fruto							
			Comprimento (mm)	Largura Basal (mm)	Largura Mediana (mm)	Espessura (mm)				
CNPH 25.368	1619,33	a	63,8	b	27,1	a	23,2	b	2,9	b
CNPH 25.361	1591,33	a	71,7	b	24,6	b	23,3	b	2,9	b
CNPH 25.377	1268,00	a	65,9	b	25,9	a	22,7	b	2,9	b
CNPH 25.391	1238,67	a	67,8	b	24,9	b	24,5	a	3,2	a
CNPH 25.369	1221,33	a	65,1	b	29,2	a	25,0	a	4,0	a
CNPH 25.374	1135,33	a	65,0	b	27,7	a	23,9	a	2,8	b
CNPH 25.371	1009,33	a	64,0	b	29,1	a	25,5	a	3,7	a
CNPH 25.373	972,67	a	66,7	b	27,5	a	23,0	b	3,3	a
CNPH 25.389	901,00	a	64,6	b	28,4	a	27,8	a	3,4	a
CNPH 25.376	848,00	a	61,1	c	27,0	a	23,7	b	3,3	a
CNPH 25.375	822,67	a	50,4	c	30,7	a	26,0	a	3,5	a
CNPH 25.390	674,00	b	68,6	b	22,7	b	23,1	b	2,7	b
CNPH 25.379	639,00	b	57,0	c	24,9	b	21,9	b	2,6	b
CNPH 25.385	610,00	b	77,1	b	23,4	b	22,2	b	2,6	b
CNPH 25.372	592,00	b	59,6	c	26,7	a	22,4	b	3,0	a
CNPH 25.378	586,67	b	58,4	c	25,0	b	22,3	b	2,8	b
CNPH 25.386	478,67	b	71,3	b	23,8	b	24,3	a	2,7	b
CNPH 25.383	452,00	b	70,8	b	21,7	c	20,9	c	2,2	b
BRS Garça	438,67	b	96,8	a	27,9	a	26,2	a	3,4	a
CNPH 25.370	414,00	b	60,9	c	26,7	a	22,3	b	3,3	a
CNPH 25.384	258,00	b	70,1	b	26,7	a	25,3	a	2,8	b
CNPH 25.381	238,67	b	67,3	b	20,0	c	19,5	c	1,9	b
CNPH 25.382	189,67	b	72,4	b	19,5	c	18,8	c	1,9	b
CNPH 25.388	176,33	b	60,8	c	25,5	a	25,1	a	2,7	b
CNPH 25.387	160,67	b	68,7	b	23,7	b	23,1	b	2,2	b



### *Características morfoagronômicas*

**1) Produção total de frutos:** as linhagens foram reunidas em dois grupos. O primeiro grupo, letra **a**, foi composto por 11 linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.368, CNPH 25.369, CNPH 25.371, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375, CNPH 25.376, CNPH 25.377, CNPH 25.389 e CNPH 25.391). A linhagem que apresentou maior valor deste grupo foi a CNPH 25.368 (1619,33 g) e a que apresentou menor valor foi a CNPH 25.375 (822,67 g). O segundo grupo, letra **b**, foi composto pela BRS Garça e por 13 linhagens (CNPH 25.370, CNPH 25.372, CNPH 25.378, CNPH 25.379, CNPH 25.381, CNPH 25.382, CNPH 25.383, CNPH 25.384, CNPH 25.385, CNPH 25.386, CNPH 25.387, CNPH 25.388 e CNPH 25.390). A linhagem que apresentou o maior valor deste grupo foi a CNPH 25.390 (674,0 g) e o menor valor foi encontrado na linhagem CNPH 25.387 (160,67 g). Possivelmente, o baixo desempenho de 'BRS Garça' neste quesito tenha sido causado pelo plantio fora da época ideal para a produção desta cultivar, que foi desenvolvida para plantio no período seco do Planalto Central (abril a setembro).

**2) Comprimento de fruto:** as linhagens foram agrupadas em três grupos. O primeiro grupo, letra **a**, foi composto apenas pela cultivar 'BRS Garça', com valor de 96,8 mm. O segundo grupo, letra **b**, foi composto por 17 linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.368, CNPH 25.369, CNPH 25.371, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.377, CNPH 25.381, CNPH 25.382, CNPH 25.383, CNPH 25.384, CNPH 25.385, CNPH 25.386, CNPH 25.387, CNPH 25.389, CNPH 25.390 e CNPH 25.391). A linhagem que apresentou o maior valor deste grupo foi a CNPH 25.385 (77,1 mm) e o menor valor foi encontrado na linhagem CNPH 25.368 (63,8 mm). O terceiro grupo, letra **c**, foi composto pelas linhagens CNPH 25.370, CNPH 25.372, CNPH 25.375, CNPH 25.376, CNPH 25.378, CNPH 25.379 e CNPH 25.388. A linhagem que apresentou o maior valor desde grupo foi a CNPH 25.376 (61,1 mm) e o menor valor foi encontrado na linhagem CNPH 25.375 (50,4 mm). A 'BRS Garça', cultivar protegida no Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), apresenta comprimento de fruto de 90 mm, e a linhagem com frutos mais compridos, a CNPH 25.385, teve frutos com 77,1 mm.

**3) Largura basal do fruto:** as linhagens foram agrupadas em três grupos. O primeiro grupo, letra **a**, foi composto pela 'BRS Garça' e por 13 linhagens (CNPH 25.368, CNPH 25.369, CNPH 25.370, CNPH 25.371, CNPH 25.372, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375, CNPH 25.376, CNPH 25.377, CNPH 25.384, CNPH 25.388 e CNPH 25.389). A linhagem que apresentou maior valor foi a CNPH 25.375, com 30,7 mm. O segundo grupo, letra **b**, foi composto por oito linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.378, CNPH 25.379, CNPH 25.385, CNPH 25.386, CNPH 25.387, CNPH 25.390 e CNPH 25.391). Neste grupo, a linhagem que apresentou o maior valor foi a CNPH 25.378 (25 mm) e o menor valor foi encontrado na linhagem CNPH 25.390 (22,7 mm). O terceiro grupo, letra **c**, foi composto por três linhagens, CNPH 25.381, CNPH 25.382 e CNPH 25.383, sendo os valores encontrados 20,0 mm, 19,5 mm e 21,7 mm, respectivamente. Moreira et al. (2010) trabalharam com 12 híbridos de *C. annuum* e verificaram o diâmetro de fruto variando de 12,4 a 23,55 mm. Segundo estes autores, em alguns híbridos há ocorrência de características comparáveis às das pimentas do tipo Jalapeño. Este resultado nos possibilita referenciar que as linhagens avaliadas apresentaram valores satisfatórios para essa característica.

**4) Largura mediana do fruto:** as linhagens foram agrupadas em três grupos. O primeiro grupo, letra **a**, foi composto pela 'BRS Garça' (26,2 mm) e por mais nove linhagens (CNPH 25.369, CNPH 25.371, CNPH 25.374, CNPH 25.375, CNPH 25.384, CNPH 25.386, CNPH 25.388, CNPH 25.389 e CNPH 25.391). A linhagem que apresentou o maior valor deste grupo foi a CNPH 25.389 (27,8 mm) e a que apresentou menor valor foi a CNPH 25.374 (23,9 mm). O segundo grupo, letra **b**, foi composto por 12 linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.368, CNPH 25.370, CNPH 25.372, CNPH 25.373, CNPH 25.376, CNPH 25.377, CNPH 25.378, CNPH 25.379, CNPH 25.385, CNPH 25.387 e CNPH 25.390). A linhagem que apresentou o maior valor deste grupo foi a CNPH 25.376 (23,7 mm) e o menor valor foi encontrado na linhagem CNPH 25.379 (21,9 mm). O terceiro grupo, letra **c**, foi composto por três linhagens (CNPH 25.381, CNPH 25.382 e CNPH 25.383). Os valores apresentados por essas linhagens foram 19,5 mm, 18,8 mm e 20,9 mm, respectivamente.

**5) Espessura de polpa:** as linhagens foram reunidas em dois grupos. O primeiro grupo, letra **a**, foi composto pela cultivar 'BRS Garça' (3,4 mm) e por mais nove linhagens (CNPH 25.369, CNPH 25.370, CNPH 25.371, CNPH 25.372, CNPH 25.373, CNPH 25.375, CNPH 25.376, CNPH 25.389 e CNPH 25.391). A linhagem que apresentou maior valor deste grupo foi a CNPH 25.369 (4 mm) e a que apresentou o menor valor foi a CNPH 25.372 (3 mm). O segundo grupo, letra **b**, foi composto por 15 linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.368, CNPH 25.374, CNPH 25.377, CNPH 25.378, CNPH 25.379, CNPH 25.381, CNPH 25.382, CNPH 25.383, CNPH 25.384, CNPH 25.385, CNPH 25.386, CNPH 25.387, CNPH 25.388 e CNPH 25.390). Três linhagens (CNPH 25.361, CNPH 25.368 e CNPH 25.377) apresentaram o maior valor (2,9 mm) deste grupo e os menores valores foram encontrados em duas linhagens, com 1,9 mm de espessura de polpa (CNPH 25.381 e CNPH 25.382).

A característica espessura de polpa é particularmente importante na produção de polpa usada na fabricação de molhos. A cultivar 'BRS Garça', genótipo de interesse da agroindústria, não diferiu estatisticamente das dez linhagens neste quesito.

#### *Avaliação agronômica*

Levando em consideração o resultado da caracterização morfoagronômica assim como os dados qualitativos preliminares obtidos pelos avaliadores independentes, foram identificadas cinco linhagens promissoras – CNPH 25.368, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375 e CNPH 25.377, por terem porte médio (que poderia eventualmente ser de utilidade quando da mecanização do cultivo), coloração verde escura da folhagem (desejável pela maior parte dos agricultores) assim como pela baixa incidência de doenças foliares, particularmente mancha bacteriana e antracnose (Tabela 4).

**Tabela 4** - Médias das cinco linhagens promissoras selecionadas, com os valores dos cinco descritores e respectivo agrupamento pelo método Scott-Knott.

	PF	CF	LBF	LMF	EPF
<b>CNPH 25.368</b>	1619,33a	63,8b	27,1a	23,2b	2,9b
<b>CNPH 25.373</b>	972,670a	66,7b	27,5a	23,0b	3,3a
<b>CNPH 25.374</b>	1135,33a	65,0b	27,7a	23,9a	2,8b
<b>CNPH 25.375</b>	822,670a	50,4c	30,7a	26,0a	3,5a
<b>CNPH 25.377</b>	1268,00a	65,9b	25,9a	22,7b	2,9b

PF – Produção de Frutos por parcela; CF – Comprimento do Fruto; LBF – Largura Basal do Fruto; LMF – Largura Mediana do Fruto; e EPF – Espessura da Polpa do Fruto.

#### *Avaliação qualitativa*

A linhagem CNPH 25.368 apresentou boa arquitetura de planta e alta produtividade. Já na linhagem CNPH 25.373, além de ser produtiva, também apresentou alta espessura de polpa, duas características essenciais para o desenvolvimento de uma cultivar para ser utilizada na produção de molho. A linhagem CNPH 25.374 possui um fruto típico de pimenta Jalapeño e baixa incidência de mancha bacteriana. A linhagem CNPH 25.375 se destacou por apresentar frutos com maior largura basal (30,7 mm), cônicos e espessos e também baixa incidência de antracnose. Finalmente, a linhagem CNPH 25.377 apresentou alta uniformidade das plantas e não apresentou sintoma algum de mancha bacteriana e de antracnose.

### **3.1.5.CONCLUSÕES**

Os resultados da caracterização e avaliação das linhagens em estudo permitiram as seguintes conclusões:

- O método SSD, com ligeiras modificações, possibilitou a rápida obtenção de linhagens a nível S<sub>5</sub> (cinco ciclos de autofecundação) em curto espaço

de tempo (30 meses), já que foi possível conduzir o trabalho em casa de vegetação.

- As 27 linhagens  $S_5$  obtidas apresentaram alta variabilidade entre elas, fazendo com que deva ser possível a seleção de pelo menos uma para testes de campo e eventual liberação como nova cultivar.
- Há diferenças significativas entre as linhagens  $S_5$  com base nos cinco descritores utilizados – produção de frutos por parcela, comprimento do fruto, largura basal do fruto, largura mediana do fruto e espessura de polpa do fruto - apesar de terem sido obtidas de uma única população.
- A caracterização morfoagronômica possibilitou identificar linhagens  $S_5$  promissoras, que poderão, após validação em campos de produção, ser liberadas como novas cultivares. As principais linhagens promissoras são: CNPH 25.368, CNPH 25.373, CNPH 25.374, CNPH 25.375 e CNPH 25.377.
- Pode ser interessante dar continuidade ao trabalho também avaliando a eventual existência de heterose entre as linhagens obtidas, visando à futura liberação de híbrido  $F_1$  que apresente características e vigor demandados pelo mercado.

É recomendável, antes do lançamento e registro de nova cultivar de Jalapeño amarelo, que se avalie, sob condições controladas assim como a campo, em múltiplos locais, o comportamento dos genótipos com relação aos principais patógenos em distintas regiões ecogeográficas.

## **3.2.CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LINHAGENS DE PIMENTA DO TIPO JALAPEÑO AMARELO**

### **3.2.1.INTRODUÇÃO**

O genoma de um organismo é único, diferenciando-o de qualquer outro organismo, inclusive daqueles propagados vegetativamente. A análise do DNA de um conjunto de indivíduos que apresentam características fenotípicas idênticas ou muito próximas tem possibilitado a identificação de diferenças a nível de genes (Reifschneider et al., 2000).

A caracterização molecular tem sido uma ferramenta útil para a avaliação da diversidade genética de diferentes espécies vegetais. O uso de marcadores moleculares apresenta características vantajosas, como, por exemplo: são distribuídos por todo o genoma, são neutros, podem ser obtidos em grande número e são menos suscetíveis aos efeitos ambientais. Marcadores moleculares têm sido usados com sucesso na caracterização de germoplasma, auxiliando em processos de coleta, conservação e intercâmbio de acessos em Bancos de Germoplasma de espécies vegetais, bem como na seleção de genitores a serem utilizados em programas de melhoramento (Ferreira et al., 2007).

A caracterização molecular tem permitido, além da determinação mais precisa da variação genética quando comparada aos métodos tradicionais de caracterização, a identificação da estrutura genética de uma população.

Ainda hoje se discute sobre o uso prático de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. Alguns creem que o uso de marcadores moleculares, aliado às técnicas de engenharia genética e ao sequenciamento de genomas, possibilita aos melhoristas o desenvolvimento de genótipos superiores de uma maneira mais eficaz, rápida, concisa e a custos mais baixos. Vários tipos de marcadores moleculares estão hoje disponíveis e se diferenciam entre si quanto à capacidade em detectar polimorfismo, custo, facilidade de uso e consistência de resultados. Entre os diversos marcadores moleculares disponíveis, há os do tipo microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). Uma das vantagens desses marcadores é que eles são codominantes, ou seja, em cada loco analisado é possível distinguir homozigotos e heterozigotos, assim como identificar o genótipo específico de cada indivíduo de acordo com os alelos presentes na população estudada. Além disso, são multialélicos e estáveis (Borém e Caixeta, 2009).

Apesar das vantagens dos marcadores SSRs, seu uso ainda é restrito, porque a grande limitação é a obtenção dos '*primers*' de elevado custo e intensiva mão de obra considerando todas as etapas de seu desenvolvimento. No entanto, uma vez obtidos os '*primers*' específicos para uma espécie, os custos e a demanda de mão de obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (Ferreira et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente através do uso de marcadores SSR as linhagens avançadas de pimentas amarelas do tipo Jalapeño do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças com o fim de verificar a variabilidade entre elas. Estas linhagens S<sub>4</sub>, em número de 24, foram obtidas em programa iniciado em 2008 na Embrapa Hortaliças, com o objetivo de desenvolver uma cultivar de pimenta do tipo Jalapeño amarelo. O fato de se terem '*primers*' desenvolvidos para *Capsicum* possibilitou ganho de tempo para essa análise molecular, ressaltando-se a importância de bancos genômicos que possuam informações e acesso aberto a distintas instituições de pesquisa e ensino.

### 3.2.2.REVISÃO DE LITERATURA

#### *Marcadores moleculares*

Durante as duas últimas décadas, o uso de marcadores moleculares tem sido incorporado com sucesso a vários programas de melhoramento genético, em diversas culturas, e esses métodos estão sendo cada vez mais utilizados para gerar informações genômicas e apoiar os programas de melhoramento (Gupta e Rustgi, 2004; Rudd et al., 2005).

As análises realizadas com marcadores de DNA, tais como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e SSR (*Simple Sequence Repeats*) são menos suscetíveis aos efeitos ambientais (Paran et al., 1998; Rodriguez et al., 1999; Ben-Chaim et al., 2001; Lanteri et al., 2003; Rao et al., 2003; Toquica et al., 2003; Portis et al., 2004; Geleta et al., 2005; Minamiyama et al., 2006; Oyama et al., 2006). Isso potencializa o uso dessas técnicas para a verificação da dissimilaridade entre genótipos em diversas espécies (Gilbertetal., 1999). Porém, é necessário aumentar o número de bases de dados moleculares para as culturas de maior interesse (culturas essenciais para alimentação humana). Esse aumento das bases de dados tem elevado o processo de maximização na análise por meio desses marcadores, proporcionando ganho de tempo e custo (Varshney et al., 2005).

Entre esses marcadores citados acima, os microssatélites (SSR) apresentam numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores, pois eles são: altamente polimórficos e informativos; a herança é codominante, o que permite a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são multialélicos; ocorrem abundantemente em genomas eucariotos; têm por base o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e, portanto, necessitam de pequena quantidade de DNA; são altamente reproduzíveis; não requerem radioatividade; estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras ou não codificadoras; e os locos são frequentemente conservados entre espécies relacionadas (Salles e Buso, 2003). Esses marcadores consistem de pequenos trechos exatos ou não de



*motifs* em tandem, que podem variar de 1 a 6 pares de bases de comprimento. A maioria dos locos de SSR é definida por apenas um par de iniciadores, o que facilita a troca de informação entre os laboratórios (Lee et al., 2004).

### *Marcadores moleculares em Capsicum*

A pimenta é uma cultura de grande importância no cenário nacional e a maioria dos trabalhos relacionados a ela tem como objetivos: caracterização dos frutos, produtividade, resistência a doenças e teor de capsaicina (ardor). No entanto, a maioria dessas características é de caráter quantitativo, e a seleção dessas características tem sido baseada no fenótipo (Minamiyama et al., 2006).

Porém, esse cenário tem sido alterado, pois o número de trabalhos relacionados à detecção de marcadores moleculares para a pimenta tem sido crescente. O aumento desse tipo de informação (Bancos de sequências) torna-se importante, visto que a associação do melhoramento clássico - que é amplamente utilizado para desenvolvimentos de novas cultivares - com a seleção assistida por marcadores (SAM), tem sido considerada uma grande aliada, indispensável na elucidação de locos quantitativos.

Ryzhova et al. (2004) estudaram a diversidade intraespecífica de 28 acessos de *C. annuum*. Através dos marcadores microssatélites, foi possível identificar, na população, a existência de uma variedade silvestre (variedade de ocorrência espontânea num determinado habitat), mesmo os locos não apresentando alto polimorfismo para os demais acessos do estudo, demonstrando a eficiência dos marcadores moleculares em distinguir diferentes variedades e até mesmo a distância existente entre acessos da mesma espécie.

Kwon et al. (2005) estudaram 66 variedades de *C. annuum* por marcadores microssatélites. Foram verificados mais de 300 '*primers*' desenvolvidos para *Capsicum* na literatura, dos quais, apenas 27 foram polimórficos para a população em estudo. Com base nesses 27 '*primers*', foi possível distinguir 66 variedades em que os valores da distância genética variaram de 0,65 a 1,00, resultado obtido pelo método de agrupamento de UPGMA.

Marques et al. (2006), trabalhando com híbrido F<sub>1</sub> de *C. annuum*, testando 275 'primers', constataram que os locos microssatélites estão distribuídos ao longo de todo o genoma, porém verificaram que apenas 50 'primers' apresentaram polimorfismo, o que é considerado baixo, indicando a necessidade de desenvolvimento de mais marcadores microssatélites para maior aprofundamento no estudo desse genoma.

### 3.2.3.MATERIAL E MÉTODOS

#### *Material genético*

Vinte e quatro linhagens S<sub>4</sub> de pimenta do tipo Jalapeño amarelo do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, Tabela 1, foram caracterizadas, utilizando os 'primers' CAMS 024, CAMS 117, CAMS 191, CAMS 207-2, CAMS 358, CAMS 309, CACCEL1i, SLM6 49, CM 0011, CA 514272, CA 847580, CA 523715, CA 515649, CM 0008 e CM 0005.

Dois genótipos, UENF 1775 (*C. frutescens*) e UENF 1381 (*C. annuum*), ambos obtidos do Banco de Germoplasma da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), foram usados como testemunhas. As linhagens utilizadas foram CNPH 25.237, CNPH 25.240, CNPH 25.241, CNPH 25.242, CNPH 25.243, CNPH 25.244, CNPH 25.245, CNPH 25.246, CNPH 25.247, CNPH 25.248, CNPH 25.249, CNPH 25.250, CNPH 25.252, CNPH 25.253, CNPH 25.254, CNPH 25.255, CNPH 25.256, CNPH 25.257, CNPH 25.259, CNPH 25.260, CNPH 25.261, CNPH 25.262, CNPH 25.263 e CNPH 25.265.

**Tabela 1** - Avaliação de 24 linhagens de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*) em S<sub>5</sub>, com respectiva numeração da geração S<sub>4</sub> para os cinco descritores. Médias para características do fruto, relacionadas a cinco frutos com três repetições, e para produção total, colheita das três plantas centrais das parcelas (três parcelas). Brasília, Embrapa, 2013.

Genótipos CNPH		Produção	Fruto			
Geração			Comprimento	Largura	Largura	Espessura
S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>					
25.237	25.368	1619,33	63,8	27,1	23,2	2,9
25.262	25.361	1591,33	71,7	24,6	23,3	2,9
25.248	25.377	1268,00	65,9	25,9	22,7	2,9
25.265	25.391	1238,67	67,8	24,9	24,5	3,2
25.240	25.369	1221,33	65,1	29,2	25,0	4,0
25.245	25.374	1135,33	65,0	27,7	23,9	2,8
25.242	25.371	1009,33	64,0	29,1	25,5	3,7
25.244	25.373	972,67	66,7	27,5	23,0	3,3
25.261	25.389	901,00	64,6	28,4	27,8	3,4
25.247	25.376	848,00	61,1	27,0	23,7	3,3
25.246	25.375	822,67	50,4	30,7	26,0	3,5
25.263	25.390	674,00	68,6	22,7	23,1	2,7
25.250	25.379	639,00	57,0	24,9	21,9	2,6
25.257	25.385	610,00	77,1	23,4	22,2	2,6
25.246	25.372	592,00	59,6	26,7	22,4	3,0
25.249	25.378	586,67	58,4	25,0	22,3	2,8
25.258	25.386	478,67	71,3	23,8	24,3	2,7
25.255	25.383	452,00	70,8	21,7	20,9	2,2
25.241	25.370	414,00	60,9	26,7	22,3	3,3
25.256	25.384	258,00	70,1	26,7	25,3	2,8
25.253	25.381	238,67	67,3	20,0	19,5	1,9
25.254	25.382	189,67	72,4	19,5	18,8	1,9
25.260	25.388	176,33	60,8	25,5	25,1	2,7
25.259	25.387	160,67	68,7	23,7	23,1	2,2

### *Extração de DNA*

A extração do DNA das 24 linhagens de Jalapeño amarelo foi feita no Laboratório de Virologia da Embrapa Hortaliças, em Brasília (DF), e o DNA das duas testemunhas foi cedido pela Professora Rosana Rodrigues, cuja orientanda Monique Moulin estava desenvolvendo trabalho molecular com as amostras.

Para obtenção das amostras de DNA das linhagens, foram semeadas três sementes de cada genótipo em bandejas de poliestireno expandido com 72 células, com substrato Plantmax<sup>®</sup>, mantidas em uma casa de vegetação. Quando as plântulas apresentaram cinco folhas, foram retiradas duas a três folhas de cada linhagem para a extração do DNA, feita de acordo com o protocolo descrito pela Embrapa SPI/Cenargen (1998). Coletou-se aproximadamente 0,1g de folha, o qual foi acondicionado em um tubo de 2mL, onde foram adicionados cinco *beads* (pequenas esferas), seguido de 750µL de CTAB mais β-mercaptoetanol (0,2%). As amostras foram levadas ao equipamento *Precllys 24*, com a programação 2 (2:5000 - 2x 30 - 005), no qual ocorreu a maceração com o auxílio dos *beads*. Em seguida, os tubos foram submetidos a banho-maria (65°C) por 5 min e, logo após, adicionados 750µL de clorofil. As amostras foram agitadas em "vortex" por 1 min para homogeneização, em seguida, centrifugadas por 10 min a 9.000 rpm. As fases foram separadas, das quais foram subtraídos 600µL do sobrenadante, que foram transpostos para um tubo de 1,5mL, ao qual foram adicionados 400µL de isopropanol. As amostras ficaram em repouso por 10 min para que ocorresse a precipitação e logo após foram centrifugadas em rotação máxima (13.000 rpm) por 10 min. Em outra etapa, o líquido foi vertido permanecendo apenas o *pellet* (DNA) e adicionados 400µL de etanol gelado. As amostras foram centrifugadas por 10 min em rotação máxima, quando foi feito então o descarte do etanol sem que o *pellet* fosse descartado. O tubo ficou exposto por 2 horas à temperatura ambiente, para secagem. Ao final do processo, foi realizada a ressuspensão do *pellet*, utilizando 300µL de água *milli-Q* (água pura), obtendo-se uma amostra de 300µL do DNA, de cada um dos 24 acessos de jalapeño amarelo.

Após a conclusão da extração do DNA, as amostras foram transportadas para a Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em caixa de isopor

com gelo, para evitar sua deterioração. No Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, foi feita a leitura do volume de DNA de cada genótipo. Para essa leitura, foi utilizado o equipamento Nano Drop 2000c. Para o procedimento, foi utilizada uma amostra de 0,2µL de cada genótipo. As concentrações obtidas são mostradas na Tabela 2. Devido à alta concentração de DNA nas amostras, a diluição se torna importante, pois possibilita utilizar um menor volume da concentração do DNA, evitando desperdício do material genético. A diluição do DNA foi feita para a concentração de 5ng/µL em 100µL, e a fórmula utilizada para obter esse volume de amostra foi:

$$C \cdot V = C' \cdot V'$$

Sendo C, concentração do DNA (leitura NanoDrop 2000c);

V, volume do DNA;

C', concentração do DNA desejada (5ng/µL); e

V', volume final (100µL).

**Tabela 2** -Leitura do volume de DNA das 24 linhagens de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum* ) feita com o equipamento NanoDrop 2000c. Campos dos Goytacazes, UENF, 2012.

Número	CNPH	Conc. de Ácido Nucleico ng/μL	Quant. DNA ng/μL	Quant. Água ng/μL
1	25.237	235,9	2,12	97,88
2	25.240	328,6	1,52	98,48
3	25.241	268,6	1,86	98,14
4	25.242	116,7	4,28	95,72
5	25.243	190,8	2,62	97,38
6	25.244	218,9	2,28	97,72
7	25.245	355,1	1,41	98,59
8	25.246	304,9	1,64	98,36
9	25.247	259,9	1,92	98,08
10	25.248	242,5	2,06	97,94
11	25.249	245,3	2,04	97,96
12	25.250	314,2	1,59	98,41
13	25.252	323,8	1,54	98,46
14	25.253	239,8	2,09	97,91
15	25.254	235,9	2,12	97,88
16	25.255	177,2	2,82	97,18
17	25.256	228,9	2,18	97,82
18	25.257	158,5	3,15	96,85
19	25.259	315,2	1,59	98,41
20	25.260	227,3	2,20	97,80
21	25.261	190,3	2,63	97,37
22	25.262	257,9	1,94	98,06
23	25.263	141,4	3,54	96,46
24	25.265	220,1	2,27	97,73

Para o procedimento, foi utilizada uma amostra de 0,2μL de cada genótipo. A diluição do DNA foi feita para a concentração de 5ng/μL em 100μL, utilizando a unidade de ng/μL para os valores medidas pelo equipamento.

Foram selecionados preliminarmente na literatura 63 ‘primers’ microssatélites (SSR), desenhados tanto para a espécie *Solanum lycopersicum* quanto para *Capsicum* spp. A seleção de ‘primers’ para tomates foi levada em consideração visto pertencerem à mesma família das pimentas (Solanaceae) e apresentarem sintenia de mapa. Os ‘primers’ estavam disponíveis na UENF e foram cedidos pela Professora Rosana Rodrigues.

### Reações em Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram realizadas em placa de PCR de 96 poços para termocicladores, com volume final de 13µL, contendo, 1,5µL de 10 x PCR Buffer, 1,5µL de DNTPs, 1,0µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,6µL de 'primer' (*Forward* e *Reverse*), 0,12µL de Taq DNA Polimerase, 2,0µL de DNA e 6,28µL de H<sub>2</sub>O. As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Veriti 96 Well, programado em uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 4 min, seguido de 38 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 55°C (anelamento) e 3 min a 72°C (extensão). Na etapa final, foram programados 7 min a 72°C.

Para separação dos fragmentos, foi utilizada uma placa de PCR de 96 poços para sequenciadores com bordas inteiras. Na placa, foram adicionados 1µL das reações de PCR e 79µL de água pura, totalizando 80µL de amostra e, em um dos poços da placa, foi adicionado o '*Ladder*'.

Os fragmentos amplificados foram separados pelo equipamento AdvanCE FS96, desenvolvido pela Advanced Analytical. O equipamento faz a análise através de gel de eletroforese capilar. A separação das bandas foi feita pela Amplitude Gama, com sistema gel, apropriada para o tamanho dos fragmentos de DNA. Vestígios de electroferograma digitais foram recolhidos por monitorização da intensidade relativa de fluorescência (RFU) de acordo com o tempo de migração das bandas (peso molecular). O marcador 1Kb Plus DNA *ladder* foi utilizado como referência de peso molecular para estimar os tamanhos dos produtos da amplificação, gerando, assim, uma matriz de dupla entrada com os valores relativos aos pares de base de cada loco analisado, a partir do qual foram estimados (todas as equações foram obtidas do manual do programa *Power Marker*):

I) PIC - Conteúdo de Informação de Polimorfismo de cada marcador, estimado a partir da seguinte equação:

$$\widehat{PIC}_i = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{p}_{iu}^2 - \sum_{u=1}^{k-1} \sum_{v=u+1}^k 2\tilde{p}_{iu}^2 \tilde{p}_{iv}^2$$

II) He – Heterozigosidade esperada, estimada com base na seguinte equação:

$$\hat{D}_i = (1 - \sum_{u=1}^k \tilde{p}_{iu}^2) / (1 - \frac{1+f}{n})$$

III)  $H_o$  – Heterozigidade observada, estimada com base na seguinte equação:

$$\hat{H}_l = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{P}_{luu}$$

IV)  $f$ – Coeficiente de endogamia, estimado com base na seguinte equação:

$$\hat{D}_l = (1 - \sum_{u=1}^k \tilde{P}_{lu}^2)$$

V) Distância genética, com base na distância de *Shared Allele*, estimada com base na seguinte fórmula:

$$D_{sa} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^{a_j} \min(p_{ij}, q_{ij}) .$$

Com base na matriz de distância genética, foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento da distância média UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average*), utilizando o programa *Power Marker*, em associação com o programa *TreeView*, versão 1.6 (Roderic, 2001). A estabilidade dos agrupamentos foi computada pela análise de *Bootstrap* com 1000 repetições (Liu, 2004).

### 3.2.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 63 ‘*primers*’ selecionados para o trabalho, apenas 15 apresentaram múltiplos alelos para um loco – polimorfismo (23,1%), sendo os 48 restantes monomórficos. Essa taxa de polimorfismo possibilitou gerar informações sobre os parâmetros genéticos desejados para analisar as linhagens de Jalapeño amarelo. Os locos SSR, as sequências *forward* e *reverse* e o *motif* bem como as temperaturas de anelamento são mostrados na Tabela 3.

Sanwen et al. (2000), em um estudo com pimentões (*C. annuum*), observaram que 12 SSR eram polimórficos e, segundo os autores, esse número baixo de locos SSR foi devido, provavelmente, ao fato de o tipo de germoplasma utilizado no estudo, ou seja, dos oito genótipos estudados, quatro serem linhas



isogênicas (NILs), ou seja, apresentarem pouco polimorfismo. Kwon et al. (2005), investigando a aplicação dos SSR na análise de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) de 66 variedades de pimentão, observaram que dos 316 SSR testados apenas 27 foram polimórficos. A variabilidade genética de 41 acessos pertencentes à coleção de germoplasma do *Crop Research Institute* de Praga foi avaliada utilizando oito locos SSR, sendo que cinco eram polimórficos (Hanáček et al., 2009). Assim, os resultados encontrados neste trabalho estão dentro do que a literatura tem reportado para *C. annuum*.

**Tabela 3** - Locos microssatélites (SSR) com as sequências dos *primers* (*forward* e *reverse*), *motif* e temperatura de anelamento (TA) utilizados na caracterização molecular das 24 linhagens de *Capsicum annuum* var. *annuum* de pimenta do tipo Jalapeño amarelo. Campos dos Goytacazes, UENF, 2012.

<b>SSR</b>	<b>Sequência <i>forward</i></b>	<b>Iniciador <i>Reverse</i></b>	<b><i>Motif</i></b>	<b>TA</b>
CAMS 024 <sup>1</sup>	tggtgaggcttgggaaaaac	caagataatgggtagaaaggcaac	(tg)14tt(tg)3	55°C
CAMS 117 <sup>1</sup>	ttgtggaggaaacaagcaaa	cctcagcccaggagacataa	(tg)21(ta)3	55°C
CAMS 191 <sup>1</sup>	cccgaatccaagtcattgag	taaatccggttccctttcct	(ac)10a(ta)4	55°C
CAMS 207-2 <sup>1</sup>	ctcacgagccacttgaacac	gccttgttcctatcccaac	(ac)4at(ac)8(at)3	55°C
CAMS 358 <sup>1</sup>	gacccttctccccttttctt	cacatggacggatcctttt	(tg)7	55°C
CAMS 309 <sup>1</sup>	gaaaatcgaccggttttgaa	tcaattcggacaaaattagcaa	(ga)12	51°C
CACCEL1 <sup>2</sup>	ctctaataaggcaatagctcacatgc	gcagtctcccagaacggtgtcc	(at)16	51°C
SLM6 49 <sup>3</sup>	attgatggattggcggtctc	aaaatcaggggtgaatttaacg	(ta)24	51°C
CM 0011 <sup>2</sup>	tctgcttataaaacacatacat	cattcttaactgaaattgcatg	(ac)5(ta)8	51°C
CA 514272 <sup>5</sup>	atctattttcctccggcgac	cggttaagctgccttgatctc	(ccg)6	51°C
CA 847580 <sup>5</sup>	ggttttctcacaacttcggc	ttgcaaaaatataatcaacgcg	(tg)13(ta)4	55°C

Cont. Tabela 3.

<b>SSR</b>	<b>Sequência <i>forward</i></b>	<b>Iniciador <i>Reverse</i></b>	<b><i>Motif</i></b>	<b>TA</b>
CA 523715 <sup>5</sup>	catcatttctccccaattcc	gtgggggtggggtaaaaag	(tc)6(t)8	55°C
CA 515649 <sup>5</sup>	tctccaatttcattcggag	taatcgatttgcaactg	(cat)6	58°C
CM 0008 <sup>4</sup>	atagctcacatgccctataaa	aatcttgagcaataattggac	(atata)5	60°C
CM 0005 <sup>2</sup>	catgaccaccatgaggata	gatagccacgagcatagtatt	(cca)8	60°C

<sup>1</sup>Minamiyama et al., (2006); <sup>2</sup>Lee et al., (2004); <sup>3</sup>Geethanjali et al., (2010); <sup>4</sup>Sanwen et al. (2000); <sup>5</sup>USDA (2011).

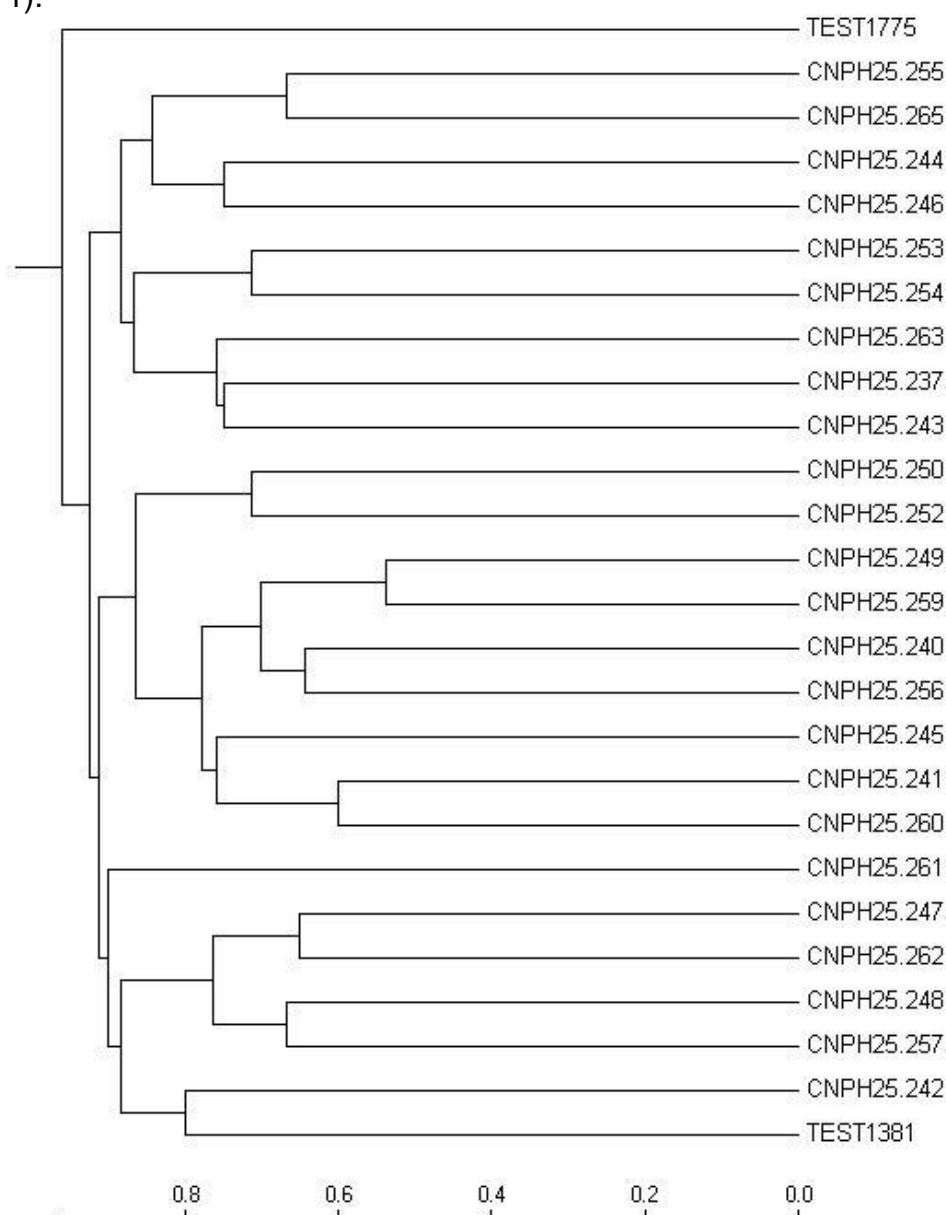
O número médio de alelos por loco foi 12,5 com uma variação de 6 (CA 515649) e 23 (CAMS 117). Esse resultado está acima do que tem sido reportado por outros autores como Minamiyama et al. (2006), Kwon et al. (2005) e Hanacek et al. (2000), que observaram 2,9; 3,2 e 3,5 alelos por loco polimórfico, respectivamente.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein et al. (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Os conteúdos de informações de polimorfismo (PIC) encontrados nos 15 '*primers*' utilizados nesse trabalho variaram de 0,75 (75% '*primer*' CA5 15649) a 0,94 (94% '*primer*' CAMS 117). A média geral entre os 15 '*primers*' utilizados foi de 85% de informação de polimorfismo. Foi possível verificar que aproximadamente 53% dos '*primers*' apresentaram valor de PIC superior à média geral, o que permite, de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), afirmar que todos os marcadores utilizados no trabalho apresentam alta informação polimórfica. A porcentagem de '*primers*' em homozigose foi de 73% (11 '*primers*'), os demais 27% (4 '*primers*') apresentaram valor entre 4% e 72% de heterozigidade, sendo o valor de 72% originado dos '*primers*' CAMS 024 e CAMS 117. Verificou-se também que a taxa de endogamia em porcentagem foi de 23% e 24%, respectivamente. Já os dois outros '*primers*' que também apresentaram valor de heterozigidade acima de zero apresentaram taxa de endogamia relativamente alta, 94% ('*primer*' CM 0011) e 84% ('*primer*' CA 847580), respectivamente (Tabela 4). Esse alto valor de endogamia pode ser explicado pelo fato de a população em estudo estar na 4<sup>o</sup> geração (S<sub>4</sub>) de autofecundação. Em uma população que se encontra em S<sub>4</sub>, a taxa de homozigose esperada é de 93,75%. Isso é observado, pois a cada geração de autofecundação, é esperado ao menos um incremento de 50% de endogamia nos seus descendentes.

**Tabela 4** - Tamanho esperado do alelo em pares de base (TEA – pb), número de alelos por microssatélite (NAL), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e coeficiente de endogamia (f) em *Capsicum annuum* var. *annuum*. Campos dos Goytacazes, UENF, 2012.

SSR	Alelo (pb)	NAL	He	Ho	PIC	f
CAMS 024	219	17	0,93	0,73	0,92	0,24
CAMS 117	223	23	0,94	0,73	0,94	0,25
CAMS 191	224	15	0,92	0,00	0,91	1,00
CAMS 207-2	243	10	0,85	0,00	0,83	1,00
CAMS 358	218	8	0,86	0,00	0,84	1,00
CAMS 309	235	9	0,84	0,00	0,82	1,00
CACCEL1i	243	9	0,87	0,00	0,86	1,00
SLM6 49	233	11	0,84	0,00	0,83	1,00
CM 0011	116	11	0,89	0,05	0,87	0,95
CA 514272	259	11	0,87	0,00	0,86	1,00
CA 847580	197	9	0,83	0,13	0,81	0,85
CA 523715	202	8	0,80	0,00	0,77	1,00
CA 515649	190	6	0,79	0,00	0,75	1,00
CM 0008	195	10	0,87	0,00	0,85	1,00
CM 0005	160	10	0,87	0,00	0,86	1,00
Média	-	12,5	0,92	0,11	0,92	0,89

A partir do padrão de bandas obtido com os 15 'primers' selecionados no estudo, obteve-se o dendrograma de dissimilaridade das linhagens S<sub>4</sub> (Figura 1).



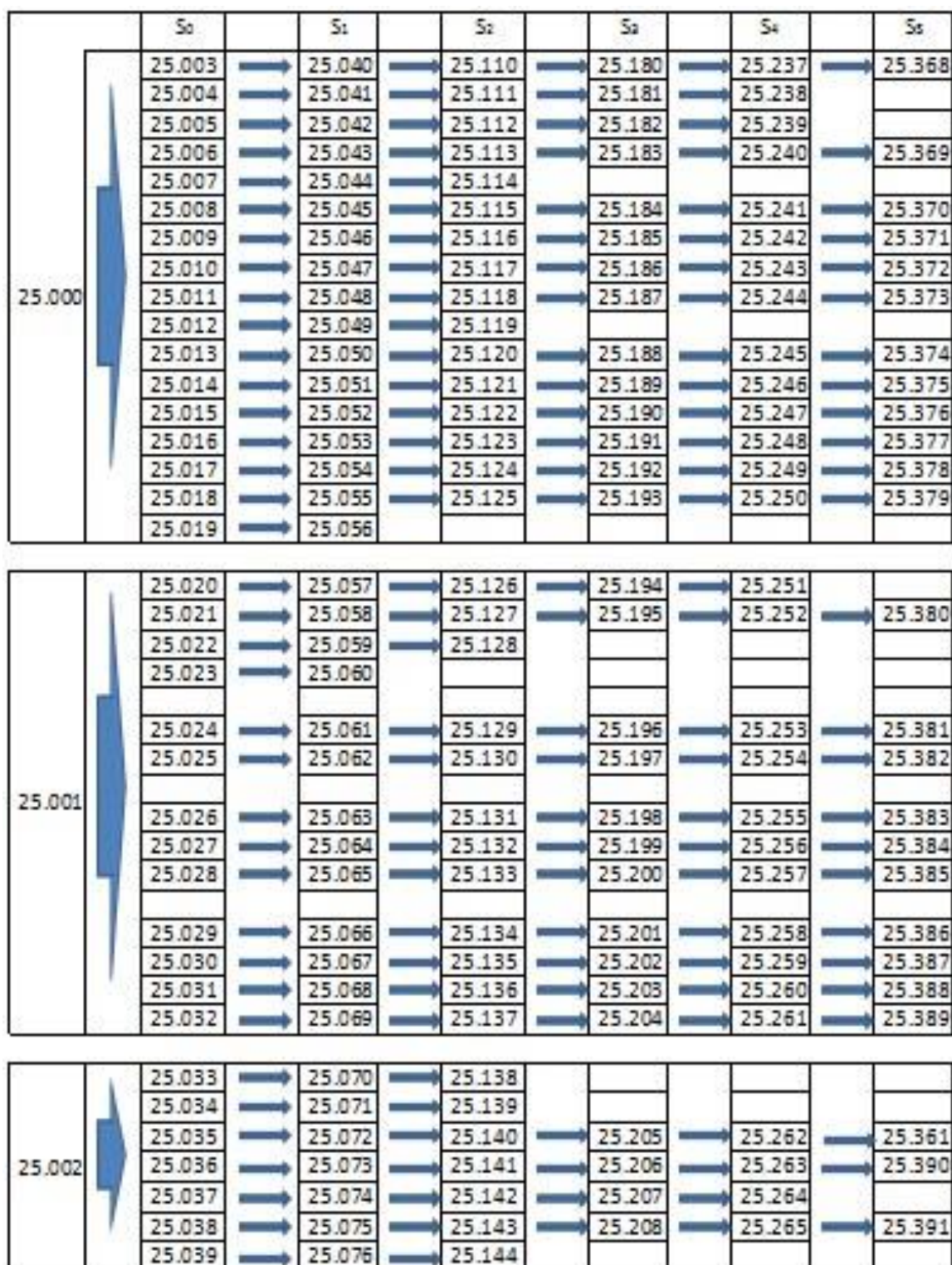
**Figura 1** - Dendrograma de dissimilaridade das 26 linhagens de *Capsicum* spp., obtidas pelo método UPGMA, medidas pelo cálculo da frequência dos alelos compartilhados, utilizando o programa Power Marker, versão 3.25. A testemunha TEST 1775 é uma pimenta do tipo Malagueta (*C. frutescens*) e a TEST 1381 é uma pimenta (*C. annuum*) que se assemelha a um mini-Jalapeño. Campos dos Goytacazes, UENF, 2012.

A comparação entre os materiais de Jalapeño amarelo e as duas testemunhas (TEST 1381 e TEST 1775), sendo uma *C. annuum* do tipo pimenta e outra *C. frutescens* (pimenta malagueta), permite verificar que os materiais de Jalapeño amarelo possuem alta diversidade genética entre si, cujo valor médio (0,9020) é próximo do valor verificado quando o grupo é comparado a uma espécie diferente (*C. frutescens*, com valor de dissimilaridade 0,9607). A partir do dendrograma, foram obtidos quatro grupos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Grupos formados a partir do dendrograma de dissimilaridade, das linhagens S<sub>4</sub> (*Capsicum annuum* var. *annuum*) e das duas testemunhas TEST 1381 (*C. annuum*) e TEST 1775 (*C. frutescens*). Campos dos Goytacazes, UENF, 2012.

<b>Grupo</b>	<b>Genótipos</b>
<b>I</b>	TEST 1775
<b>II</b>	CNPH 25.255, CNPH 25.265, CNPH 25.244, CNPH 25.246, CNPH 25.253, CNPH 25.254, CNPH 25.263, CNPH 25.237 e CNPH 25.243
<b>III</b>	CNPH 25.250, CNPH 25.252, CNPH 25.249, CNPH 25.259, CNPH 25.240, CNPH 25.256, CNPH 25.245, CNPH 25.241 e CNPH 25.260
<b>IV</b>	CNPH 25.261, CNPH 25.247, CNPH 25.262, CNPH 25.248, CNPH 25.257, CNPH 25.242 e TEST1381

O primeiro grupo formado é a testemunha referente a uma pimenta do tipo malagueta; os demais grupos formados são oriundos da população de Jalapeño amarelo. A formação desses três grupos de Jalapeño amarelo não tem relação com as três plantas que deram origem às 24 linhagens S<sub>4</sub>, conforme fluxograma de melhoramento apresentado na Figura 2.



**Figura 2** - Fluxograma das gerações das linhagens de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*), com os registros do CNPH (Embrapa Hortaliças). Brasília, Embrapa Hortaliças, 2013.



### 3.2.5.CONCLUSÕES

- A caracterização molecular se mostrou eficiente ao possibilitar a identificação dos genótipos em homozigose.
- Os genótipos avaliados possuem alta diversidade genética entre si.
- A análise de descendência das linhagens e o dendrograma gerado indicaram que não houve relação entre os três grupos formados e as plantas que deram origem a estas linhagens.
- A alta diversidade genética detectada entre as linhagens sugere que valeria a pena fazer, no futuro, um cruzamento dialélico para avaliar eventual heterose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blucher. 380p.
- Antonious, F.G.,Jarret, L.R.(2006) Screening *Capsicum* accessions for capsaicinoids content. *J. Environ. Sci. Health* 41:717–729p.
- Ben-Chaim, A.,Grube, R.C.,Lapidot, M.,Jahn, M.,Paran, I. (2001) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annum*. *Theor Appl Genet.* 102:1213-1220p.
- Bento, C. S., Rodrigues, R.,Zerbini, F.M.,Sudré, C.P. (2009) Sources of resistance against the *Pepper yellow mosaic virus in chili pepper*. *Horticultura Brasileira* 27:196-201p.
- Bento, C. S.; Sudré, C.P.; Rodrigues, R.; Riva, E.M.; Pereira, M.G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*. 149-156p.

- Bianchetti, L.B. (1996) *Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de Capsicum (Solanaceae) ocorrentes no Brasil*. Dissertação (Mestrado) – Brasília – DF, Universidade de Brasília – UnB, 174 - 179p.
- Borém, A.; Caixeta, E.T. (2009) Marcadores moleculares. 2 ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 103-115p.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolmick, H. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331p.
- Büttow, M.V.; Barbieri, R.L; Neitzke, R.S; Heiden, G.; Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40: (6) 1264-1269p.
- Carmo, M.G.F.; Macagnan, D.; Carvalho, A.O. (2001) Progresso da mancha bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não de oxiclureto de cobre. *Horticultura Brasileira*, 19(3):342-347p.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Bustamante, P.G.; Silva, D.B. (2003) Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. *Embrapa Hortaliças*. Documento, 49.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Reifschneider, F.J.B. (2009) Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. *Horticultura Brasileira*. 27: 135-138p.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Ribeiro, S. da C.; Lopes, C.A. (2006) Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. *Embrapa Hortaliças*. Documento, 94: 14 -15p.

- Cavalli, S.S. (2003) Polimorfismos moleculares. In: Freitas, L.B.; Bered, F. (org).  
Genética & evolução vegetal. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 311-332p.
- Csillery, G.(2006) Pepper taxonomy and the botanical description of the species.  
*Acta Agron Hungarica* (54):151-166p.
- Costa, R.A.; Rodrigues, R.; Sudré, C.P. (2002) Resistência genética à mancha bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, 20: 86-89p.
- Eshbaugh, W.H. (1970) Biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 22: (1) 31-43p.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) Food and agriculture organization of the united nations:<http://faostat.fao.org/default.aspx> 22/10/2012página mantida pela FAO.
- Ferreira, M.E.; Moretzsohn, M.C.; Buso, G.S. C. (2007) Fundamentos da caracterização molecular de germoplasma vegetal. In: Nass, L.L. (org) *Recursos genéticos vegetais*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 377-420p.
- Finger, F.L.; Lannes, S.D.; Schuelter, A.R.; Doege, J.; Comerlato, A.P.; Gonçalves, L.S.A.; Ferreira, F.R.A.; Clovis, L.R. ; Scapim, C.A. (2010) Genetic diversity of *Capsicum chinense* (Solanaceae) accessions based on molecular markers and morphological and agronomic traits. *Genetics and Molecular Research*, 9:(3) 1852-1864p.
- Flota, F.V.; Ham, M. de L.M.; González, M.M.; Carbajal, G.G.; Garcia, C.V.; Pelayo.(2007) La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante de Chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30:353-360p.

- Fonseca, R.M. (2006) Caracterização morfológica de genótipos de *Capsicum chinense* Jacq. do Alto Rio Negro – AM. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 51p.
- Fonseca, R.M.; Lopes, R.; Barros, W.S.; Lopes, M.T.G.; Ferreira, F.M. (2008) Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro – Amazonas. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8:187-194p.
- Geleta, L.F.; Labuschagne, M.T.; Viljoen, C.D. (2005) Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. *Biodiver. Conserv.* 14: 2361-2375p.
- Gilbert, J.E.; Lewis, R.V.; Wilkinson, M.J.; Caligari, P.D.S. (1999) Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in germplasm collection. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1125-1131p.
- Gomes, F.P. (2000). Curso de estatística experimental. Piracicaba: ESALQ, 477p.
- Gonçalves, L.S.A; Rodrigues, R.; Bento, C. dos S.; Robaina, R.R.; Amaral Júnior, A.T do. (2011) Herança de caracteres relacionados à produção de frutos em *Capsicum baccatum* var. *pendulum* com base em análise dialélica de Hayman. *Ciência Agronômica*, 42:(3) 662-669p.
- Govindarajan, V.S.; Sathyanarayana, M.N. (1991) *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 29:435–473p.
- Gupta, P.K.; Rustgi, S. (2004) Molecular markers from the transcribed expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomic*, 4:139–162p.

- Ha, S.H; Kim J.B; Park, J.S; Lee, S.W, & Cho, K.J. (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* 58:3135-3144p.
- Hanáček, P.; Vyhnánek, T.; Rohrer, M.; Cieslarová, J.; Stavelíkova, H. (2009) DNA polymorphism in genetic resources of red pepper using microsatellite markers. *Hort. Sci.* 36:127-132p.
- Hunziker, A.T. (2001) Genera Solanacearum: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. Liechtenstein: ARG *Gantner Verlag* K.G.
- IBGE. (2006) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: <http://www.sidra.ibge.gov.br/em> 11/12/2012 página mantida pelo IBGE.
- Ibiza, V.P., Blanca, J., Cañizares, J., & Nuez, F. (2011). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 286 – 291p.
- IPGRI (1995) Descriptors for *Capsicum*. *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome.
- Kwon, Y.S.; Lee J.M.; Yi, G.B.; Yi, S.I.; Kim, K.M.; Soh, E.H.; Bae, K.M.; Park, E.K.; Song, I.H.; Kim, B.D. (2005) Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of Pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Molecules and Cells*19:1-1p.
- Lannes, S.D.; Finger, F.L.; Schuelter, D.R.; Casali, V.W.D. (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulture* 112:266-270p.

- Lanteri, S.; Acquadro, A.; Quagliotti, L.; Portis, E. (2003) RAPD and AFLP assessment of genetic variation in a landrace of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-west Italy. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:723-735p.
- Lee, J.M.; Nahm, S.H.; Kim, Y.M.; Kim, B.D. (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor Appl Genet* 108:619–627p.
- Liu, J. (2004) Programa Power Marker (versão 3.25): <http://www.powermarker.net>
- Lourenço, R.T.; Bianchetti, L.D.; Lins, T.C. L.; Silva, N.J.M.L; Buso, G.C.S.; Pozzobon, M.; Ferreira, M.E. (1999) New putative *Capsicum* species collected in the Brazilian Atlantic Forest and their genetic relationship with cultivated peppers: a first genetic view using molecular markers. In: Anais do Congresso Nacional de Genética, Resumos. Gramado: Sociedade Brasileira de Genética.
- Luz, F.J.F. (2007) Caracterizações morfológica e moleculares de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq). Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- Marques, J.M; Ferreira, M.A.; Ribeiro, C.S.C.; Moretzsohn, M.C.; Amaral, Z.P.S.; Buso, G.S.C. (2006) Construção de um mapa genético preliminar para *Capsicum annuum* utilizando marcadores microssatélites. Boletim de pesquisa e desenvolvimento 121. Brasília - DF.
- Medeiros, A.M. (2012) Capacidade combinatória e potencial agrônômico de híbridos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* nas condições da região Norte Fluminense. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes.

- Minamiyama, Y.; Tsuru, M.; Hirai, M. (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol Breeding*. 18:157-169p.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2009) Regras para análise de sementes. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA*. Brasília – DF. 31p.
- Moreira, S.O.; Rodrigues, R.; Araújo, M.L.; Sundré, C.P.; Riva-Souza, E.M. (2009) Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinantes de pimenta em dois sistemas de cultivo. *Ciência Rural*, 39:1387-1393p.
- Moreira, S.O.; Rodrigues, R.; Araújo, M.L.; Riva-Souza, E.M.; Oliveira, R.L. (2010) Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de *Capsicum annuum* L. em sistemas orgânico sob cultivo protegido. *Ciência Rural*, 34: (4)886 – 891p.
- Monteiro, E.R; Bastos, E.M.; Lopes, A.C.A.; Gomes, R.L.F; Nunes, J.A.R. (2010) Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. *Ciência Agrotécnica*. 34:(4)886-891p.
- Nagai, H. (1968) Obtenção de variedades de pimentão resistentes ao mosaico. *Bragantia* [on-line]. 27 (2) 311-353p.
- Nass, L.L. (2001) Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: Nass, L.L.; Valls, A.C.C.; Melo, I.C. de; Valadares-Inglis, M.C. (org) *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, 29-55p.
- Oyama, K.; Hernandez-Verdugo, S.; Sanchez, C.; Gonzales-Rodriguez, A.; Sanchez-Pena, P.; Garson-Tiznado, J.; Casas, A. (2006) Genetic Structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genet. Res. Crop Evol.* 53:553-562p.



- Paran, I.; Aftergoot, E.; Shifriss, C. (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99:167-173p.
- Paran, I; Knaap, E. (2007) Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*. 58:3841-3852p.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96:129 – 133p.
- Popovski, S. &Paran, I. (2000) Molecular genetics of the y locus in pepper: its relation to capsanthin-capsorubin synthase and to fruit color. *TAG* 101:86-89p.
- Portis, E.; Acquadro, A.; Comino, C.; Lanteri, S. (2004) Effect of farmer's seed selection on genetic variation of landrace population of pepper (*Capsicum annuum* L.), grown in North-west Italy. *Genet.Res. Crop Evol.* 51:581-590p.
- Pozzobon, M.T.; Schifino-Wittman; Bianchetti, L.B. (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species:  $x=12$  and  $x=13$  represent two evolutionary lines. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151:259-269p.
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: <http://www.R-project.org/> em 28/05/2013.
- Ramos, S.R.R.; Rodrigues, R.; Leal, F.C.; Sudré, C.P.; Pereira, T.N.S. (2001) Caracterização preliminar de acessos de *Capsicum* do Banco Ativo de Germoplasma da UENF. *Horticultura Brasileira*, Brasília. 19 (2): 270p.

- Rao, G.U.; Ben-Chaim, A.; Borovsky, Y.; Paran, I. (2003) Mapping of yield related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theor. Appl. Genet.* 106:1457-1466p.
- Rêgo, E.R.; Rêgo, M.M.; Cruz, C.D.; Finger, F.L.; Casali, V.W.D. (2011) Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genet. Res. Crop Evol.* 58:909-918p.
- Reifschneider, F.J.B. (2000) *Capsicum* Pimentas e pimentões no Brasil. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Embrapa. Brasília - DF. 58p.
- Ribeiro, C.S.C.; Reifschneider, F.J.B. (2008) Genética e melhoramento. *In*: Ribeiro, C.S.C.; Lopes, C.A.; Carvalho, S.I.C.; Henz, G.P.; Reifschneider, F.J.B (org). Pimentas *Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 55-69p.
- Riva-Souza E.M.; Rodrigues, R.; Sudré C.P.; Pereira, M.G.; Viana, A.P.; Amaral Júnior, A.T. (2007) Obtaining pepper F<sub>2:3</sub> lines with resistance to the bacterial spot using the pedigree method. *Horticultura Brasileira*, 25:567-571p.
- Roderic, D.M. (2001) Programa TreeView (versão 1.6.6): <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rodhtml> em 15/11/2012.
- Rodriguez, J. M.; Berke, T.; Engle, L.; Nienhuis, J. (1999) Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 99:147-156p.
- Rudd, S.; Schoof, H.; Mayer, K. (2005) Plant Markers a database of predicted molecular markers from plants. *Nucleic Acids Res*33:628–632p.

- Ryzhova, N.N.; Kochieva, E.Z. (2004) Analysis of microsatellite loci of the chloroplast genome in the genus *Capsicum* (Pepper). *Russian Journal of Genetics* 40 (8):892-896p.
- Salles, G; Buso, G.C. (2003) Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular técnica 20. Brasília - DF.
- Sanwen, H.; Baoxi, Z.; Milbourne, D.; Cardle, L.; Guimei, Y.; Jiaz-Hen, G. (2000) Development of pepper SSR marker from sequence databases. *Euphytica*. 117: 163-167p.
- Sapucay, M.J.L.C.; Araújo, E.R.; Rêgo, E.R.; Rêgo, M.M. (2009) Diversidade genética, importância relativa e correlação de caracteres quantitativos em pimenteiras. *Horticultura Brasileira*, 27: (2) (Suplemento - CD Rom).
- Scott, A.; Knott, M. (1974) Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics* 30:(3)507 – 512p.
- Silva, S. A. M.; Bento, C. S.; Medeiros, A.M.; Sudré, C.P.; Rodrigues, R. (2011) Identificação de fontes de resistência à antracnose em acessos de *Capsicum* spp. In: XI Mostra de Pós-Graduação UENF.
- Silva, A.R; Cecon, P.R; Rêgo, E.R; Nascimento, M. (2011) Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteira. *Rev. Ceres*. (58) 2:168-171p.
- Sudré, C.P. (2003) Divergência genética e avaliação da resistência à mancha bacteriana em *Capsicum* spp. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes, RJ. 38 – 42p.

- Sudré, C.P.; Gonçalves, L.S.A.; Rodrigues, R.; Amaral Júnior, A.T.; Riva-Souza, E.M.; Bento, C. S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research* 9 (1): 283-294p.
- Sousa, J.A.; Maluf, W.R. (2003) Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq). *Scientia Agricola*, Piracicaba 60:105-113p.
- Toquica, S.P.; Rodriguez, F.; Martinez, E.; Duque, M.C.; Tohme, J. (2003) Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon Department in Columbia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:639-647p.
- USDA - United States Department of Agriculture (2011) *Sol Genomics Network*. Disponível em <http://solgenomics.net/>
- Valls, J.F.M. (1988) Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. *Anais do Encontro sobre Recursos Genéticos*. Jaboticabal: FCAV, 106-115p.
- Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48–55p.
- Vilela, N.J. (2004) Sistema de produção de Pimentas (*Capsicum* spp): Coeficientes técnicos, custos, rendimentos e rentabilidade. Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/coeficientes.htm#tabela1> em 4/12/2012 mantido pela Embrapa.
- Villalón, B.; Dainello, F.J.; Bender, D.A. (1994) 'Jaloro' Hot yellow jalapeño pepper. *Hort Science* 29 (9): 1092 – 1093p.

Viñals, F.N.; Ortega, R.G.; Garcia, J.C. (1996) El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Madrid: *Mundi-Prensa*. 648-652p.

Wagner, C.M. (2003) Variabilidade e base genética da pungência e de características do fruto: Implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L. Tese de doutorado. ESALQ – Piracicaba, SP. 104p.

**ANEXO**

Dados originais de campo das linhagens em S<sub>5</sub> de Jalapeño amarelo (*Capsicum annuum* var. *annuum*). Brasília, Embrapa, 2013.

Registro	Repetição	PF <sup>1</sup>	Média dos 5 frutos			
			CF <sup>2</sup>	LBF <sup>2</sup>	LMF <sup>2</sup>	EPF <sup>2</sup>
CNPH 25.361	1	2162	71,2	24,6	22,8	3,4
	2	944	65,5	22,2	22,9	1,7
	3	1668	78,4	27,1	24,1	3,6
CNPH 25.368	1	1642	67,0	28,1	23,5	3,4
	2	1104	63,4	27,1	22,8	2,2
	3	2112	61,2	25,9	23,2	3,3
CNPH 25.369	1	1218	65,1	30,5	25,5	4,2
	2	1054	65,5	29,2	26,0	4,4
	3	1329	64,7	27,9	23,5	3,4
CNPH 25.370	1	442	59,8	27,0	22,8	3,6
	2	314	61,9	26,5	22,8	3,5
	3	486	61,1	26,6	21,4	2,9
CNPH 25.371	1	1454	64,1	29,6	26,4	3,8
	2	706	65,0	29,1	26,0	3,8
	3	868	63,1	28,5	24,2	3,5
CNPH 25.372	1	1240	62,0	27,4	23,8	3,6
	2	242	58,8	25,7	23,6	2,0
	3	294	58,0	27,0	19,7	3,5
CNPH 25.373	1	1254	68,9	28,3	23,9	3,7
	2	670	65,9	27,7	23,3	3,3
	3	994	65,4	26,6	21,8	3,0
CNPH 25.374	1	1964	64,7	27,3	22,0	2,6
	2	752	66,8	28,2	25,5	2,9
	3	690	63,6	27,7	24,1	3,1
CNPH 25.375	1	828	50,9	29,0	24,1	3,9
	2	1022	51,7	32,8	27,4	3,0
	3	618	48,7	30,3	26,4	3,7
CNPH 25.376	1	1472	62,5	26,8	23,9	3,4
	2	792	61,1	25,8	23,2	3,2
	3	280	59,6	28,4	23,9	3,4
CNPH 25.377	1	1220	66,1	27,8	24,0	3,4
	2	1840	68,7	26,8	23,4	2,7
	3	744	62,9	23,0	20,7	2,6
CNPH 25.378	1	1510	65,0	26,6	23,4	3,5
	2	154	50,3	24,6	22,6	2,4
	3	96	60,0	23,9	21,0	2,5

Registro	Repetição	PF <sup>1</sup>	Média dos 5 frutos			
			CF <sup>2</sup>	LBF <sup>2</sup>	LMF <sup>2</sup>	EPF <sup>2</sup>
CNPH 25.379	1	356	64,8	26,3	23,0	3,2
	2	1281	54,0	23,6	21,6	2,0
	3	280	52,2	24,8	21,2	2,5
CNPH 25.381	1	150	71,4	21,2	20,7	1,9
	2	362	72,1	22,4	21,6	2,3
	3	204	58,4	16,3	16,1	1,6
CNPH 25.382	1	58	71,0	17,8	17,8	1,9
	2	434	68,1	20,2	20,7	1,9
	3	77	78,0	20,6	17,9	1,8
CNPH 25.383	1	98	65,6	23,2	21,9	2,5
	2	*	*	*	*	*
	3	806	76,1	20,1	19,9	1,9
CNPH 25.384	1	448	77,8	31,2	30,3	3,7
	2	68	62,4	22,1	20,3	2,0
	3	*	*	*	*	*
CNPH 25.385	1	1250	89,4	24,6	21,5	2,6
	2	362	76,8	21,9	24,4	2,8
	3	218	65,1	23,6	20,7	2,3
CNPH 25.386	1	106	68,4	22,0	23,2	3,2
	2	106	74,1	26,6	26,8	2,5
	3	80	71,5	22,7	22,9	2,3
CNPH 25.387	1	256	69,4	25,2	23,6	2,4
	2	202	67,0	22,0	22,6	2,5
	3	24	69,6	23,8	23,1	1,8
CNPH 25.388	1	92	72,7	24,0	22,3	2,2
	2	356	60,6	26,0	27,2	3,5
	3	81	49,2	26,6	25,6	2,4
CNPH 25.389	1	1722	70,9	30,3	27,9	4,2
	2	*	*	*	*	*
	3	80	58,4	26,4	27,6	2,6
CNPH 25.390	1	1524	67,3	21,7	22,9	2,6
	2	144	70,2	22,9	23,3	2,8
	3	354	68,2	23,6	23,1	2,7
CNPH 25.391	1	1194	73,0	25,7	24,5	3,0
	2	1610	60,1	24,7	25,2	3,0
	3	912	70,3	24,3	23,9	3,7
BRS Garça	1	894	87,8	28,0	25,1	3,0
	2	320	110,1	30,3	28,6	4,3
	3	102	92,6	25,3	24,9	3,0

<sup>1</sup>PF - Produção total dos frutos das parcelas, em gramas; <sup>2</sup>CF – Comprimento do Fruto, LBF – Largura Basal do Fruto, LMF – Largura Mediana do Fruto, EPF – Espessura da Polpa do Fruto, medidas em milímetros. \* Parcela perdida.