



**MAPEAMENTO DE QTLs RELACIONADOS À
FACILIDADE DE ABSCISÃO DE FRUTOS E
ANATOMIA DE PECÍOLO, FLOR E FRUTO EM
*Capsicum chinense***

Tese de Doutorado

Nayara Carvalho

Brasília – DF

2022

**MAPEAMENTO DE QTLs RELACIONADOS À FACILIDADE
DE ABSCISÃO DE FRUTOS E ANATOMIA DE PECÍOLO,
FLOR E FRUTO EM *Capsicum chinense***

Tese apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do Grau de Doutora em Agronomia, Área de concentração: Produção Sustentável, Linha de Pesquisa: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas.

Orientadora: Prof. Dra. Nara Oliveira Silva Souza

Co-Orientadora: Dra. Glaucia Salles Cortopassi Buso

Brasília - DF

2022

**MAPEAMENTO DE QTL RELACIONADO À FACILIDADE
DE ABSCISÃO DE FRUTOS E ANATOMIA DE PECÍOLO,
FLOR E FRUTO EM *Capsicum chinense***

Tese apresentada à Universidade de Brasília como parte das exigências para obtenção do Grau de Doutora em Agronomia, Área de concentração: Produção Sustentável, Linha de Pesquisa: Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas.

APROVADA EM:

Prof. Dra. Nara Oliveira Silva Souza – UnB
(Presidente) Orientadora

Dra. Gláucia Salles Cortopassi Buso – Embrapa CENARGEN
Co-orientadora

Prof. Dra. Michelle Souza Vilela – UnB
Membro Titular

Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn – Embrapa CENARGEN
Membro Titular

Ph.D Claudia da Silva Costa Ribeiro
Membro Titular

DEDICATÓRIA

A Deus, meu companheiro SEMPRE.

Aos meus pais, minha admiração e meus exemplos para toda a vida. Tudo por vocês, tudo para vocês.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiro e sempre a Ele, que esteve ao meu lado e me deu forças para seguir adiante nessa fase árdua e esclarecedora de minha vida.

Aos meus pais Paulo e Anísia, pelo dom da vida, pela criação, pelos valores, amor e dedicação. A vocês e para vocês todas as minhas conquistas e alegrias!

À Universidade de Brasília (UnB), por ter me acolhido como aluna e ter possibilitado a realização da minha graduação, mestrado e doutorado. Pelo crescimento intelectual e pessoal.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional. Em especial, à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), por todo o apoio logístico e financeiro para a realização desta pesquisa.

À CAPES pela concessão da minha bolsa, que me manteve durante o período da minha pesquisa.

À FAP-DF pela concessão de auxílio financeiro para apresentação de trabalhos em congressos internacionais, que contribuíram significativamente para meu networking e agregaram conhecimentos muito importantes para o desenvolvimento da minha tese.

À minha orientadora Nara Oliveira Silva Souza, pela atenção, paciência, direcionamento e educação, sempre.

Ao professor e amigo Marcelo Fagioli, pela oportunidade de amadurecimento profissional na avaliação de tantos trabalhos de conclusão de curso.

À minha co-orientadora Glaucia Salles Cortopassi Buso, pela oportunidade profissional, pela condução e direcionamento deste trabalho, pelos esclarecimentos e ensinamentos pessoais.

À pesquisadora Claudia Silva da Costa Ribeiro, por ceder o material vegetal, dependências e serviços da Embrapa Hortaliças (CNPq) e pelo suporte intelectual para o desenvolvimento desta pesquisa. Igualmente ao técnico de campo Sr. Luiz Póvoa, que com gentileza e educação sempre esteve presente ajudando na condução das plantas em casa de vegetação.

Ao pesquisador Márcio de Carvalho Moretzsohn, por quem tenho grande estima, pela disposição em sanar dúvidas e pela perfeita condução no desenvolvimento do estudo. À Prof. Michelle Souza Vilela, pelo carinho e respeito e a ambos por aceitarem o convite para avaliação da minha tese.

Ao pesquisador Dario Grattapaglia, grande nome da biologia molecular, com quem tive o prazer de trabalhar, e que contribuiu significativamente para a conclusão desse estudo.

À Equipe do LGV - Cenargen (Laboratório de Genética Vegetal), por disponibilizar suas dependências e materiais para a realização deste trabalho e pela convivência diária.

À analista do LGV e amiga, Lorena Ramos da Mata, pela ajuda na concepção e desenvolvimento do terceiro capítulo deste trabalho, pela convivência, pelas conversas esclarecedoras e ensinamentos.

Ao colega de trabalho Wellington, pelos ensinamentos e contribuição intelectual, e pela ajuda considerável para a conclusão desse trabalho.

Aos colegas de profissão André Moreira e André Pinedo, pela disposição e contribuição na descrição anatômica da espécie em questão, desenvolvidas no capítulo 3 desse estudo.

Ao colega André Luís Xavier, por disponibilizar o uso de microscópio óptico do laboratório da Embrapa Cenargen para as fotografias anatômicas.

À minha “amiga soteropolitana” de profissão Pétala Ribeiro, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pelo desenvolvimento dos desenhos botânicos maravilhosos que serviram para melhor descrever e diferenciar os acessos utilizados no capítulo 3 deste trabalho. Pela energia positiva e disposição.

À minha melhor amiga e irmã de outras vidas, Cecília Capovilla, por 22 anos de amizade e cumplicidade, pelas horas de conforto, apoio, felicidade e o “querer bem”, mesmo que tão distante.

MEU MUITO OBRIGADA A TODOS!

RESUMO GERAL

As espécies do gênero *Capsicum*, pertencentes à família *Solanaceae*, são divididas em três categorias: domesticadas, semidomesticadas e silvestres, e botanicamente subdivididas em três complexos (*annuum*, *baccatum* e *pubescens*). Podem apresentar pungência atribuída à presença de alcaloides e são espécies de grande importância no agronegócio brasileiro, sendo apresentadas em diversas formas de consumo. A resistência do pedúnculo do fruto dificulta consideravelmente a colheita que atualmente é manual. A fácil abscisão de frutos possibilita, além da colheita manual, as colheitas semimecanizada e mecanizada e é uma característica de grande interesse no melhoramento genético da pimenta. Nesse sentido, o Programa de Melhoramento Genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças (CNPH) foi criado e contribuiu no desenvolvimento de novas cultivares que melhor se adequem às colheitas manual, semimecanizada e mecanizada. A utilização de marcadores moleculares em programas de melhoramento, como ferramenta da biotecnologia associada a estudos morfológicos e anatômicos, dentre outras áreas de grande importância, auxiliam no desenvolvimento de cultivares. Marcadores ligados à característica de interesse podem ser identificados por meio da construção de mapas genéticos em população F₂, e avaliação da população F₃ para mapeamento da característica. Marcadores microssatélites, SSR (Simple Sequence Repeats) ou ainda STR (Short Tandem Repeats) e marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphism), têm sido amplamente utilizados para a elaboração de mapas genéticos e identificação de QTLs. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o polimorfismo de *primers* SSR entre parentais de *Capsicum chinense*, selecionados do Programa de Melhoramento Genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças: CNPH 4337-4 (de fácil abscisão de frutos) e CNPH 40001-1 (de difícil abscisão de frutos) e o híbrido F₁ oriundo desse cruzamento (CNPH 40.491), bem como utilizar marcadores SSR e SNP para construção de um mapa genético de ligação e identificação de QTLs relacionados à fácil abscisão de fruto. Os locos SSR foram amplificados por meio de reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) e a separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%. Foram testados 478 primers SSR, desenvolvidos para *C. annuum* nos parentais, dos quais 128 mostraram-se polimórficos, 249 não apresentaram diferenças entre os genótipos e 101 não amplificaram, representando 26,8%, 52,1% e 21,1% dos primers testados, respectivamente. Dos 128 primers polimórficos, 116 com melhor resolução foram selecionados e marcados com fluorescência para genotipagem da população segregante F₂, composta de 156 indivíduos. Os marcadores SNP foram obtidos por meio da tecnologia Illumina Infinium II[®]. Foi realizada RT-PCR para obtenção dos fragmentos de

cDNA e posterior utilização no Microarray (chip) multiespécies. Os dados gerados por ambos os marcadores foram analisados e utilizados na construção de um mapa genético de ligação. Foi realizada a identificação de QTLs associados à fácil abscisão de frutos, de modo a implementar a seleção assistida no programa de melhoramento genético da cultura. Adicionalmente foi realizada análise anatômica de pedúnculo, flor e fruto afim de identificar alguma estrutura que pudesse estar diretamente relacionada à facilidade de abscisão de fruto, apresentando resultados negativos para este fim, mas que podem auxiliar estudos futuros de caracterização.

Palavras-Chave: SSR; SNP; Mapa de ligação; Abscisão de Fruto; Anatomia.

ABSTRACT

The species of the genus *Capsicum* belong to the Solanaceae family, and are divided into three categories: domesticated, semi-domesticated and wild, and botanically subdivided into three complexes (*annuum*, *baccatum* and *pubescens*). *Capsicum* species can present pungency attributed to the presence of alkaloids and they are species of great importance in Brazilian agribusiness, being presented in different forms of consumption. The resistance of the fruit's peduncle makes it considerably difficult the harvest, which is currently manual. The easy fruit abscission allows semi-mechanized and mechanized harvesting and is a characteristic of great interest in the genetic breeding of pepper. In this sense, the Embrapa Vegetables *Capsicum* Genetic Breeding Program (CNPV) was created and contributes significantly to creation of agronomic interest cultivars. The use of molecular markers in breeding programs, as a tool of biotechnology associated to morphological and anatomical studies, among other areas of great importance, helps the development of cultivars. Markers linked to the trait of interest can be identified through the construction of genetic maps in the F₂ population, and evaluation of the F₃ population to map the trait. Microsatellite markers (SSR - Simple Sequence Repeats) or even STR (Short Tandem Repeats) and SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers, have been widely used for the construction of genetic maps and identification of QTLs. Thus, the aim of this study was to evaluate the polymorphism of SSR primers between *Capsicum chinense* parents selected from the Embrapa Vegetables *Capsicum* Genetic Breeding Program: CNPV 4337-4 (easy fruit abscission) and CNPV 40001-1 (difficult fruit abscission) and the F₁ hybrid from this cross (CNPV 40.491), as well as using SSR and SNP markers for the construction of a genetic linkage map and identification of QTLs for easy fruit abscission. The SSR loci were amplified by PCR reactions (Polymerase Chain Reaction) and the separation of the fragments was performed by electrophoresis in 5% polyacrylamide gels. A total of 478 SSR primers, developed for *C. annuum*, were tested against the parents, of which 128 were polymorphic, 249 showed no differences between the genotypes and 101 did not amplify, representing 26.8%, 52.1% and 21.1% of the primers tested, respectively. Of the 128 polymorphic primers, 116 with good resolution were selected and fluorescence-labeled for genotyping the F₂ segregating population, composed of 156 individuals. SNP markers were obtained using Illumina Infinium II® technology. RT-PCR was performed to obtain the cDNA fragments for use in the multispecies Microarray (chip). The data generated by both markers were analyzed and used for the construction of a genetic linkage map. The identification of QTL associated with easy fruit abscission was performed, in order to use the marker-assisted selection on the genetic

breeding program of the crop. Anatomical analysis of peduncle, flower and fruit was also carried out in order to identify any structure that could be directly related to easy fruit abscission, presenting negative results for this purpose, but which may help future characterization studies.

Keywords: SSR; SNP; Linkage map; Fruit Abscission; Anatomy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista dos 116 primers SSR polimórficos selecionados em screening. Sequências Forward e Reverse, temperatura de anelamento (Ta) e fluorescência usada para marcação.	54
Tabela 2: Lista dos 30 primers SSR utilizados na elaboração de mapa genético de ligação de <i>Capsicum chinense</i>	57
Tabela 3: Lista dos 7 marcadores SNP utilizados na elaboração de mapa genético de ligação de <i>Capsicum chinense</i>	58
Tabela 4: Marcadores mapeados e posição em cada grupo de ligação.....	60
Tabela 5: Escala de notas atribuídas para avaliação de abscisão de fruto.	78
Tabela 6: Escala de notas atribuídas para avaliação de firmeza de fruto.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos componentes capsaicina e dihidrocapsaicina, principais alcaloides responsáveis pela pungência de frutos do gênero <i>Capsicum</i>	5
Figura 2: Diversidade de frutos <i>Capsicum chinense</i>	9
Figura 3: Screening de 478 primers SSR com os genótipos CNPH 4337-4 e CNPH 40001-1 de <i>C. chinense</i>	53
Figura 4: Mapa genético de ligação para <i>Capsicum chinense</i> gerado pela análise de 156 plantas F ₂ , resultante do cruzamento entre CNPH 40.001 e CNPH 4337-4, com marcadores SSR e SNP.	61
Figura 5: Semeadura das plantas utilizadas para fenotipagem – 3 plantas de cada parental (CNPH 40.001 e CNPH 4337), 3 plantas do híbrido F ₁ (CNPH 40.491) e 459 plantas da população segregante F ₃ . Brasília – DF, 2020.	73
Figura 6: Detalhe evidenciando 3 plântulas por vaso no transplante das mudas em vasos de 10 litros e irrigação por gotejamento. Brasília – DF, 2020.	74
Figura 7: Croquis de disposição dos genótipos F ₃ de <i>C. chinense</i> avaliados em casa de vegetação. Brasília – DF, 2020.	75
Figura 8: Tutoramento das plantas com amarrio em estacas para condução vertical. Brasília – DF, 2020.	76
Figura 9: Local de corte do pedúnculo para coleta dos frutos. Brasília – DF, 2020.	77
Figura 10: Coleta de frutos para avaliação fenotípica. Brasília – DF, 2020.	78
Figura 11: Avaliação de abscisão do fruto por destaque; i: Zona de destaque pedúnculo-fruto. Brasília – DF, 2020.	79
Figura 12: Pedúnculos extraídos na avaliação de abscisão. Brasília – DF, 2020.	79
Figura 13: Avaliação de firmeza de fruto. Brasília – DF, 2020.	80
Figura 14: QTL significativo presente no grupo de ligação 3.	83

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. CAPSICUM	4
2. CAPSICUM CHINENSE	6
3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	6
3.1 Complexo <i>annuum</i>	7
3.2 Complexo <i>baccatum</i>	8
3.3 Complexo <i>pubescens</i>	8
4. BOTÂNICA CAPSICUM CHINENSE	9
5. ORIGEM E CENTROS DE DIVERSIDADE	9
6. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	10
7. COLHEITA.....	12
8. RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO EM CAPSICUM.....	13
9. MARCADORES MOLECULARES	16
9.1 SIMPLE SEQUENCE REPEATS (SSR)	17
9.2 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)	18
10. MAPEAMENTO GENÉTICO.....	20
11. MORFOLOGIA E ANATOMIA.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 1	45
SELEÇÃO DE PRIMERS SSR E SNPs PARA MAPEAMENTO EM <i>Capsicum chinense</i>	45
RESUMO:	45
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
MATERIAL VEGETAL	49
EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	49
QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA.....	50
AMPLIFICAÇÃO, SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS E GENOTIPAGEM DE POPULAÇÃO F ₂ COM MARCADORES SSR.....	51
GENOTIPAGEM DE POPULAÇÃO F ₂ COM MARCADORES SNP.....	52

CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
MARCADORES SSR.....	53
MARCADORES SNP	58
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO 2	68
Mapeamento de QTL relacionado à facilidade de abscisão de fruto em <i>Capsicum chinense</i>	68
RESUMO:	68
ABSTRACT:	70
INTRODUÇÃO	71
MATERIAL E MÉTODOS	72
AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA POPULAÇÃO F ₃	72
MATERIAL VEGETAL	72
CONDUÇÃO E MANEJO	72
PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO FENOTÍPICA.....	77
ANÁLISE DE QTLs	80
RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
CAPÍTULO 3 - Caracterização morfológica e anatômica do pedúnculo, flor e fruto relacionada à fácil abscisão de frutos em genótipos de <i>Capsicum chinense</i> (Solanaceae).....	89
RESUMO:	89
ABSTRACT:	91
INTRODUÇÃO	92
MATERIAL E MÉTODOS	93
MORFOLOGIA.....	93
ANATOMIA	94
RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
MORFOLOGIA.....	95
ANATOMIA	103
Pedúnculo.....	104
Flor.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

INTRODUÇÃO GERAL

Pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* pertencem à família *Solanaceae* e possuem grande importância na cadeia produtiva de hortaliças como fruto fresco e, também, como condimento. Originária do continente americano, *C. chinense* tem a Amazônia como área de maior diversidade, sendo considerada a mais brasileira de todas as pimentas.

São assim denominadas para diferenciá-las da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), da pimenta rosa (*Schinus molle* L.) e da pimenta da jamaica (*Pimenta officinalis* Lindl.). Todas elas, embora chamadas de pimentas e utilizadas como condimento, não possuem parentesco entre si e cada qual apresenta propriedades químicas distintas (CARVALHO et al., 2006).

As pimentas, com sua gama de cores, formas e graus de pungência, representam valiosa parte do patrimônio genético da biodiversidade brasileira. A pungência ou picância, exclusiva do gênero *Capsicum*, é atribuída a um alcaloide denominado capsaicina, que se acumula na superfície da placenta (tecido localizado na parte interna do fruto), e é liberada quando o fruto sofre qualquer dano físico, podendo ser comumente medida em Unidades de Calor Scoville ('Scoville Heat Units-SHU') por meio de aparelhos específicos. O valor SHU pode variar de zero (pimentas doces) a 16 milhões (capsaicina pura) (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

As informações referentes à *Capsicum*, quando disponíveis, englobam pimentas e pimentões, de forma que, estudos no âmbito da caracterização e preservação da diversidade são de grande valia, principalmente para a obtenção de novas cultivares que agreguem características de interesse.

Um dos problemas enfrentados pelos produtores de pimenta é a forte ligação do fruto com o pedúnculo principalmente em cultivares e grupos varietais de frutos pequenos, o que torna a colheita manual um processo lento e penoso. Estudos sobre a fácil abscisão de frutos de pimentas têm sido alvos de programas de melhoramento genético da cultura, visando a obtenção de cultivares que apresentem facilidade de colheita. Nesse sentido, avanços na biotecnologia em estudos com marcadores moleculares para uso em seleção assistida podem ser de grande valia para o melhoramento genético de *Capsicum*, auxiliando na seleção precoce da característica de fácil abscisão de fruto, evitando-se ainda o manuseio de frutos com elevada pungência.

Marcadores moleculares SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido amplamente utilizados como uma eficiente ferramenta da biologia molecular para caracterização, análises de variabilidade, estudos de evolução e identificação de cultivares, e em construção de mapas

genéticos, pelo alto conteúdo de informação polimórfica. Enquanto que os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) surgiram nas últimas décadas como um grande avanço na área da biologia molecular, com geração de dados por meio do uso de chips de DNA capazes de genotipar milhares de marcadores em um único ensaio, propiciando estudos de rastreabilidade, e sendo bastante informativos na construção de mapas genéticos.

Dessa forma, o principal objetivo desse estudo foi selecionar primers SSR e SNPs em plantas F₂ de *C. chinense* do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, oriundas de parentais contrastantes para abscisão de fruto (CNP 4337-4, de fácil abscisão de frutos e CNPH 40.001, de difícil abscisão de frutos), para a construção de um mapa genético de ligação, identificação de QTLs associados à facilidade de abscisão de fruto, e posterior análise anatômica complementar dos parentais e híbrido F₁ oriundo desse cruzamento afim de encontrar estruturas relacionadas à essa característica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar a característica de facilidade de abscisão de fruto em *Capsicum chinense*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar primers SSR e SNPs para genotipagem de população F₂ de *C. chinense* do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, oriunda de parentais contrastantes para abscisão de fruto;
- Construir mapa genético de ligação e identificar QTLs relacionados à facilidade de abscisão de fruto em *Capsicum chinense*;
- Realizar caracterização morfológica e anatômica do pedúnculo, flor e fruto relacionada à fácil abscisão de frutos em genótipos de *Capsicum chinense*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CAPSICUM

O nome do gênero *Capsicum* deriva do grego: Kapso (picar) ou Kapsakes (cápsulas) e a palavra pimenta aparece na língua castelhana no século XIII, derivada do latim pigmenta, plural de pigmentum, corante (NUEZ et al., 1996).

As espécies de *Capsicum* podem ser separadas em três categorias: domesticadas, as quais já passaram por um processo de seleção e adaptação de certas características, consideradas úteis para suprir necessidades humanas, de tal modo que não são mais capazes de sobreviver em condições naturais; semidomesticadas, aquelas selecionadas, cultivadas, mas, ainda, não totalmente domesticadas e que não apresentam diferenças morfológicas significativas em relação às populações silvestres das quais se originaram, e silvestres, aquelas que podem ser exploradas pelo homem no seu ambiente natural, não ocorrendo, normalmente, em ambientes alterados (REIFSCHNEIDER, 2000).

As espécies domesticadas são autógamas (REIFSCHNEIDER, 2000), com taxa de polinização cruzada que pode ser baixa para algumas, porém, em espécies silvestres, é possível obter-se taxa de cruzamento maior (PICKERSGILL, 1997). Em ambiente aberto, os pássaros são o principal meio de dispersão das sementes, que se alimentam dos frutos e promovem a disseminação por meio das fezes. Além disso, a passagem pelo sistema digestivo das aves parece melhorar a germinação de sementes, notadamente daquelas com dormência (TEWKSBURY et al., 2006).

Uma característica exclusiva do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de capsaicinoides. Diferente da substância picante da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), a piperina, que também tem ação distinta no organismo (LOPES, 2008). Tais alcaloides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (CARVALHO et al., 2003). Dentre os capsaicinoides, o componente mais importante é a capsaicina ($C_{18}H_{27}O_3N$) (cerca de 70%), seguido da dihidrocapsaicina ($C_{18}H_{29}O_3N$) (cerca de 20%) (Figura 1) e de outros componentes em menor quantidade, como a nordihidrocapsaicina, a homocapsaicina e a homodihidrocapsaicina (LOPES, 2008; REIFSCHNEIDER, 2015). Usada externamente no corpo, a capsaicina gera endorfina, que promove uma sensação de bem-estar, acionando o potencial imunológico (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). A concentração dessas substâncias nos frutos de pimenta é bastante variável, dependendo de fatores genéticos e de ambiente, do manejo da cultura e da idade dos frutos quando colhidos (BOSLAND e

VOTAVA, 1999). Fatores ambientais influenciam o nível de pungência dos frutos de pimentas, mas o componente genético é o fator determinante desta característica (REIFSCHNEIDER, 2015). Destacam-se ainda os carotenoides, que estão associados à cor vermelha de alguns frutos e à presença de ácido ascórbico (SIMÕES et al., 2004).

TODD et al. (1977), utilizando cromatografia gasosa para obtenção de capsaicinoides, afirmaram que a pungência de uma determinada amostra pode ser obtida pela determinação do conteúdo bruto da capsaicina (Figura 1) presente na amostra multiplicado pelo valor da pungência da capsaicina pura ($16,1 \times 10^6$), mas a grande maioria dos estudos em *Capsicum* publicados, ainda utiliza a Unidade de Calor Scoville (SHU) para aferir a pungência.

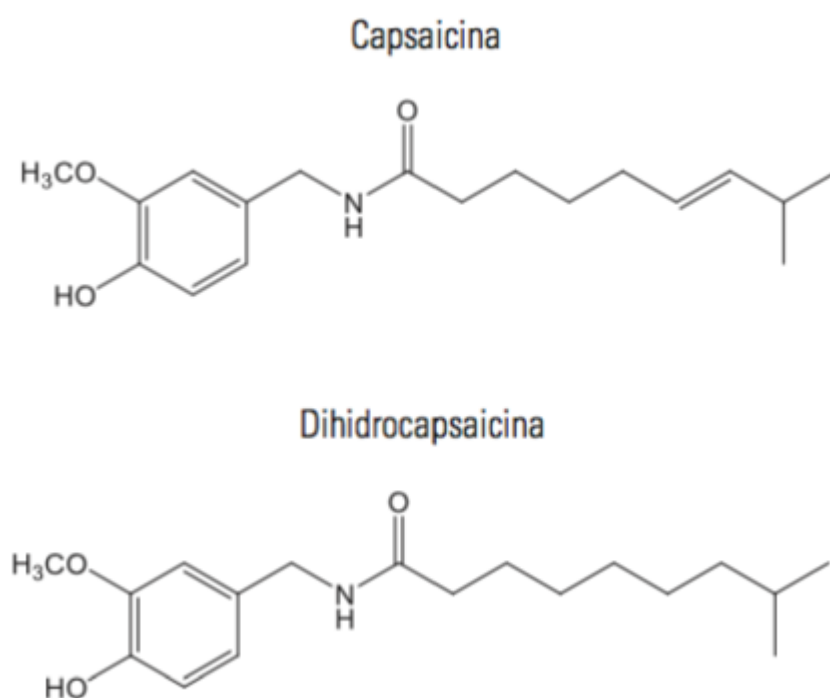


Figura 1: Estrutura química dos componentes capsaicina e dihidrocapsaicina, principais alcaloides responsáveis pela pungência de frutos do gênero *Capsicum*.

Os índios Caetés foram os primeiros brasileiros a usarem a pimenta como arma, sem imaginar que séculos depois a oleorresina de pimenta em aerossol ou em espuma, os famosos ‘pepper spray’ e ‘pepper foam’, seriam utilizados pela polícia moderna (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

As pimentas do gênero *Capsicum* são diploides ($2n=2x=24$ e $2n=2x=26$ cromossomos), sendo o último presente apenas nas espécies silvestres. Para espécies $2n = 24$, os cariótipos são

relativamente simétricos, geralmente com 11 pares metacêntricos e um par subtelocêntrico (submetacêntrico) (MOSCONE et al., 2007; SCALDAFERRO et al., 2013; POZZOBON et al., 2006). São autógamas, embora a polinização cruzada realizada por abelhas e outros insetos possa chegar a 40%, bem acima dos 5% registrados em condições normais (MARTÍN et al., 1979; MOSCONE et al., 2007).

2. CAPSICUM CHINENSE

O nome da espécie, *Capsicum chinense*, conferido pelo botânico holandês Nikolaus Joseph von Jacquin (1727-1817), surgiu de um equívoco, quando este considerava ser a espécie originária da China, mesmo que na época, fosse sabido que todas as espécies de *Capsicum* eram originárias do hemisfério ocidental (BOSLAND & VOTAVA, 1999).

Capsicum chinense é a mais brasileira das espécies domesticadas e caracteriza-se pelo aroma acentuado dos seus frutos. Há tipos varietais desta espécie com frutos doces como “biquinho” e extremamente picantes, como a pimenta 'Habanero', muito popular no México. No Brasil, as mais conhecidas são as pimentas “De Cheiro”, “Bode”, “Cumari do Pará” ou “Cumari amarela”, “Murupi”, “pimenta de bico (biquinho)”, entre outras (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2019; RIBEIRO et al., 2008; REIFSCHNEIDER, 2015).

A Amazônia é reconhecida como importante centro secundário de espécies domesticadas de *Capsicum*, sendo *C. chinense*, provavelmente, a mais importante espécie cultivada a leste dos Andes (REIFSCHNEIDER, 2000).

Embora *C. chinense* seja considerada uma espécie autógama, uma certa quantidade de polinização cruzada pode ser observada em algumas condições, incluindo altas temperaturas, vento e presença de insetos (BABA et al., 2016).

3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A taxonomia do gênero ainda é bastante discutida e estudada, mas, principalmente com os avanços na Biotecnologia, a caracterização morfológica tem sido cada vez mais associada a outros métodos, sobretudo, ao uso de marcadores moleculares. Diversos exemplos tiveram a identificação revista depois de passarem por caracterização molecular (BARAL e BOSLAND, 2004; JARRET, 2008; ALBRECHT et al., 2012; THUL et al., 2012). ALBRECHT et al. (2012), utilizando marcadores AFLP em coleções do USDA/ARS, apontaram que alguns acessos, inicialmente identificados como *C. chinense*, foram reidentificados como *C. frutescens*.

As espécies de pimentas do gênero *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, mesma família do tomate, batata e berinjela, subfamília Solanoideae e tribo Capsiceae (OLMSTEAD et al., 2008). O gênero compreende cerca de 42 espécies descritas, dentre elas, cinco são domesticadas e largamente cultivadas e utilizadas pelo homem: *Capsicum annuum*; *C. baccatum*; *C. chinense*; *C. frutescens* e *C. pubescens* (BARBOZA et al., 2019; DEWITT et al., 2009). Representantes silvestres de todas essas espécies são conhecidos, com exceção de *C. pubescens* (PARAN et al., 1998), que, por sua vez, é a única não cultivada no Brasil (CASALI e COUTO, 1984), e a espécie cultivada mais importante é *C. annuum*, originária do México (PARAN et al., 1998).

Pickersgill et al. (1979) propuseram que as espécies poderiam ser arranjadas em três agrupamentos diferentes com base na obtenção de híbridos férteis, cada qual incluindo pelo menos uma espécie domesticada somada às espécies afins. Esses agrupamentos foram denominados de complexos gênicos e divididos em *annuum*, *pubescens* e *baccatum*. Esses conjuntos refletiam afinidades entre espécies pertencentes ao mesmo agrupamento e as barreiras genéticas entre espécies pertencentes a agrupamentos diferentes, ou seja, linhas evolutivas distintas. Os trabalhos subsequentes, que incluem estudos cromossômicos, de hibridizações e moleculares, seguiram o mesmo modelo das três linhas evolutivas independentes entre diferentes complexos de espécies relacionadas: complexo *C. annuum* (composto pela espécie *C. annuum* var. *annuum*, *C. annuum* var. *glabriusculum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. galapagoense*); complexo *C. baccatum* (*C. baccatum* var. *pendulum*, *C. baccatum* var. *baccatum*, *C. baccatum* var. *praetermissum* e *C. tovarii*) e complexo *C. pubescens* (*C. pubescens*, *C. eximium* e *C. cardenasii*) (INCE et al., 2010; ALBRECHT et al., 2012).

Sabe-se que quanto mais próximas geneticamente são as espécies envolvidas, maior a homologia cromossômica entre elas, maior a chance de sucesso na obtenção do híbrido e, conseqüentemente, mais normal será a formação dos gametas desse híbrido que se dá via meiose (SINGH, 2002).

3.1 Complexo *annuum*

Capsicum annuum é a espécie mais cultivada e economicamente importante do gênero (HEISER Jr., 1976). Essa espécie possui duas formas botânicas: *C. annuum* var. *annuum* (pimentão e pimentas) e *C. annuum* var. *glabriusculum* (pimenta ornamental) (VIÑALS et al., 1996). Pertencem à espécie *C. annuum* as variedades mais comuns do gênero, como pimentões

doces, pimentas doces para páprica, pimenta “jalapeño” e algumas poucas cultivares ornamentais (REIFSCHNEIDER, 2000).

As espécies geneticamente mais próximas entre si, dentro do complexo, são *C. chinense* e *C. frutescens* (PICKERSGILL, 1991). *Capsicum frutescens* são pimentas extremamente pungentes (HEISER Jr., 1976), que possuem uma forma domesticada chamada de “tabasco”. A pimenta popularmente conhecida como “malagueta” é também uma variedade de *C. frutescens* (VALIM, T.C., 2019). Já *C. chinense* é a espécie de pimenta mais difundida na América tropical (BOSLAND, 1992), sendo que algumas variedades dessa espécie encontradas em cultivo na África são reportadas como as mais pungentes de todas as pimentas (HEISER Jr., 1976). Existem formas não pungentes de *C. chinense*, mas encontraram problemas de aceitação entre consumidores acostumados ao pimentão (*C. annuum*), porque os frutos de *C. chinense* não picantes são menores e mais irregulares do que o pimentão (Cheng, 1989).

3.2 Complexo *baccatum*

A espécie *C. baccatum* é pouco conhecida fora do continente sul-americano (HEISER Jr., 1976), apesar de ser também encontrada no México, na Índia e no Havaí (ESHBAUGH, 1993). O nome “baccatum” significa fruto igual à baga, fruto pequeno, pois os frutos dessa espécie de pimenta são bem pequenos, arredondados ou ovalados (REIFSCHNEIDER, 2000). *Capsicum baccatum* var. *pendulum* é representada, no Brasil, pelas pimentas “Dedo-de-moça” e “Cambuci” ou “Chapéu-de-frade”, *C. baccatum* var. *baccatum* é também conhecida como “Cumari verdadeira” ou “Pimenta de passarinho”. Já *C. baccatum* var. *praetermissum* é conhecida pelas mesmas denominações das pimentas variedade *baccatum* (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

3.3 Complexo *pubescens*

O complexo *C. pubescens* compreende as espécies: *C. pubescens*, *C. eximium* e *C. cardenasii*. Apenas *C. pubescens* é cultivada, estando entre as primeiras pimentas a serem domesticadas, sendo cultivada há 5000 anos. É uma pimenta com frutos de tamanho médio, comum no Peru, Bolívia, Chile, Argentina e Equador. Os frutos desta espécie possuem paredes espessas, tal como os pimentões, mas são muito mais picantes.

4. BOTÂNICA CAPSICUM CHINENSE

Plantas com 45 a 76 cm de altura. Folhas e ramos essencialmente glabros, raramente com densa e pequena pubescência, folhas ovadas a ovado-lanceoladas de 10,5 cm, largas, macias ou rugosas, de tonalidades verde claro a escuro. As flores aparecem de 3 a 5 por nó, exceto em plantas depauperadas. O pedicelo é pendente, raramente ereto, relativamente curto e grosso na antese. Corola verde amarelada ou raramente esbranquiçada, medindo de 0,5 a 1,0 cm de comprimento. Anteras azuis, púrpuras ou amareladas (SMITH e HEISER, 1957).

O sistema radicular é pivotante, com um número elevado de ramificações laterais, podendo chegar a profundidades de 70-120 cm. As flores típicas são hermafroditas, possuem cálice com 5 (em alguns casos 6-8) sépalas e a corola com 5 (em alguns casos 6-8) pétalas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Os frutos variam de 1,0 a 12,0 cm de comprimento, com formas variáveis, de esféricas a alongadas, pouco ou muito enrugados, de cores salmão, laranja, amarela, vermelha ou marrom (Figura 2). No gênero *Capsicum*, a pungência é considerada uma das mais importantes características dos frutos (REIFSCHNEIDER, 2000).

A margem da semente é sempre ondulada e raramente suave (SMITH e HEISER, 1957).



Figura 2: Diversidade de frutos *Capsicum chinense*.

5. ORIGEM E CENTROS DE DIVERSIDADE

As espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* são originárias das Américas, mas hoje encontram-se dispersas pelo mundo todo. Os frutos de pimenteiras são apreciados pela multiplicidade de formas, cores, tamanhos, sabores e pungência. São consumidas de diversas formas, mas principalmente frescas (*in natura*), em molhos líquidos, em conservas e desidratadas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

O centro primário de diversidade da espécie *C. annum* var. *annuum* está localizado no México e na América Central, com centros secundários no sudeste e centro da Europa, na África, na Ásia e em partes da América Latina. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum*

abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru e Bolívia e o sul e o sudeste do Brasil. *Capsicum chinense* tem a Amazônia como área de maior diversidade, sendo considerada a mais brasileira de todas as pimentas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; PICKERSGILL, 1991; BELLETTI et al., 1998; REIFSCHNEIDER, 2015). *Capsicum frutescens* se distribui desde as terras baixas do sudeste brasileiro até a América Central e as Antilhas, no Caribe, sendo muito cultivada no sudeste dos Estados Unidos. Já *C. pubescens* é, notadamente, uma espécie de terras altas, adaptadas a temperaturas baixas, tendo como centro de diversidade a Bolívia (CARVALHO e BIANCHETTI, 2008).

As espécies semidomesticadas e silvestres, por sua vez, restringem-se à região andina e à região litorânea brasileira (REIFSCHNEIDER, 2000).

6. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os registros mais antigos do cultivo de pimenta são encontrados em sítios arqueológicos localizados em Tehuacán, no México, e datam de cerca de nove mil anos (REIFSCHNEIDER, 2000; POWIS et al., 2013). Outros registros arqueológicos sugerem que as pimentas já eram consumidas por populações pré-colombianas entre 8.500 a 5.600 anos a.C. nas regiões andinas do Peru e 6.500 a 5.500 anos a.C. no México (NUEZ-VIÑALS et al., 1998). Atualmente, o cultivo ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; REIFSCHNEIDER, 2015). A crescente demanda do mercado tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias em várias regiões do Brasil (CARVALHO et al. 2005), sendo o Sudeste e o Centro-Oeste os principais produtores (RUFINO e PENTEADO, 2006).

Geralmente comercializadas na forma *in natura* nas feiras livres e mercados, as pimentas também são processadas indústrias de pequeno, médio e grande portes na forma de molhos, pastas (*mash*), conservas, desidratada em flocos (calabresa), em pó (páprica) e geleias, o que agrega valor à essa hortaliça, trazendo bom retorno financeiro sem exigir grandes investimentos sendo atrativa para pequenos produtores. A pasta de pimenta, conhecida como *mash*, é utilizada principalmente para produção de molhos picantes, cuja demanda ainda não foi plenamente atendida (MACEDO, 2015). As pimentas também têm uso ornamental quando cultivadas em jardins ou em vasos (LIMA et al., 2013).

A espécie mais amplamente cultivada, *Capsicum annuum*, tornou-se uma das commodities de especiarias mais importantes globalmente (HILL, 2013). A crescente demanda

pelo produto tem impulsionado o aumento da área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, tornando o agronegócio de pimentas, tanto doces quanto picantes, um grande segmento de hortaliças no país. Além do mercado interno, parte da produção brasileira é exportada de diferentes formas, como páprica, pasta, desidratada e conservas (EMBRAPA, 2008).

No Brasil, existe grande dificuldade de obter dados estatísticos confiáveis de pimenta porque a produção é dispersa e desorganizada (REICHSCHNEIDER, 2015). Na pauta do comércio internacional de hortaliças, o volume das exportações brasileiras atingiu 8.479 toneladas no valor de US\$ 17.344 mil em 2004. Em contrapartida, as importações foram de 641 toneladas no valor de US\$ 1.403 mil (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). Em 2009, a Índia, a China e o Peru foram os principais exportadores de pimentas e pimentões secos, e o Brasil ocupou o oitavo lugar no ranking mundial de exportadores em volume exportado (8600 t) (REICHSCHNEIDER, 2015). De acordo com Associação Brasileira do Comércio de Mudas e Sementes, o Brasil cultivou uma área de 1979,89 hectares de pimentas (doce e ardida) para a produção de sementes e comercializou o equivalente a 590,12 kg de sementes em 2011(ABCSEM, 2011).

Os dados mundiais de produção de *Capsicum* geralmente englobam pimentas e pimentões. As pimentas são cultivadas em todos os estados da federação, principalmente Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Ceará, Bahia e Rio Grande do Sul, totalizando uma área estimada de 5 mil hectares e produção de cerca de 75 mil toneladas (REICHSCHNEIDER, 2015). O cultivo, desde o preparo do solo até a colheita, gera de três a quatro empregos diretos, com uma renda bruta que oscila entre R\$ 4.000,00 e 12.000,00/ha/ano (PANORAMA RURAL, 2006). Em 2009, a produção mundial de *Capsicum in natura* e desidratados foi de 31,44 milhões toneladas em 3,71 milhões de hectares, com produtividades médias de 15,2 t ha⁻¹ e 1,61 t ha⁻¹, respectivamente (ALI, 2006; FAOSTAT, 2011). Em 2010, cerca de 3,8 milhões de hectares foram cultivados com pimentas e pimentões no mundo, com produção total de 30,6 milhões de toneladas, sendo que Egito, Nigéria, Argélia, Gana, Marrocos, Tunísia e Etiópia ficaram entre os 20 principais produtores mundiais de pimenta e pimentão desidratados (REICHSCHNEIDER, 2015). A maior diversidade de dados é originária do continente asiático, devido à importância econômica que a cadeia produtiva do fruto tem naquele continente que, atualmente obtém a maior produção mundial, com 20,97 milhões de toneladas em 2,36 milhões de hectares e produtividade média de 16,99 t ha⁻¹. Nesse cenário, a Índia destaca-se como grande produtora e também consumidora, pois utiliza cerca de 90% do que produz. Em 2003, o país produziu 4,5 milhões de toneladas de pimenta *in natura* em 945,5 mil hectares, mas com baixa produtividade,

de apenas 4,7 t ha⁻¹ (ALI, 2006; FAOSTAT, 2011). China e Índia cultivam cerca de 1400000 hectares de *Capsicum* por ano toneladas (REICHSCHNEIDER, 2015). Dados mais recentes de produção de *Capsicum*, englobando pimentas e pimentões, a produção mundial, em 2018, foi de 40,9 milhões de toneladas em uma área cultivada de 3,8 milhões de hectares, tendo como principais produtores China (45,3%), México (8,4%) e Turquia (6,3%) (PINTO & DONZELE, 2021).

Apesar de sua importância, os dados estatísticos de produção e comercialização de pimenta hortícola no Brasil são escassos e a pouca informação disponível não reflete a realidade econômica dessa hortaliça, visto que grande parte da produção é comercializada em mercados regionais e locais que não fazem parte das estatísticas (DOMENICO et al., 2010). Nos mercados atacadistas brasileiros, as cotações de preços para as pimentas não distinguem os tipos, simplesmente os agrupa em classes genéricas, como “pimenta”, “pimenta vermelha” ou “pimenta ardida”.

Segundo Reifschneider (2000), o agronegócio de pimenta é bastante amplo, pois envolve desde pequenas fábricas artesanais caseiras de conservação até empresas multinacionais que competem na exportação de especiarias e temperos. A perspectiva do mercado de pimentas é praticamente ilimitada pela versatilidade de suas aplicações culinárias, industriais, farmacêuticas e ornamentais.

7. COLHEITA

As pimentas são colhidas manualmente, arrancando-se os frutos das plantas com ou sem os pedúnculos, dependendo do tipo de pimenta e do uso do produto. Algumas variedades direcionadas para consumo *in natura*, se mantidas com pedúnculo, maximizam a vida útil de armazenamento. Apresentam diferentes pontos de colheita, de acordo com cada tipo, região de cultivo e época do ano. São mais difíceis de serem colhidas quando comparadas com pimentão devido ao menor tamanho dos frutos e à arquitetura da planta, principalmente aquelas de menor porte e com maior número de ramos. Para efetuar a colheita das plantas de porte mais baixo, como a ‘Cumari do Pará’ e ‘Malagueta’, é necessário que os apanhadores fiquem agachados ou curvados, enquanto para aquelas pimentas com plantas mais altas, como a ‘Bode’, é possível fazer a colheita em pé, em uma posição mais confortável (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

A posição dos frutos das pimentas, seu tamanho e a resistência do pedúnculo também interferem na velocidade da colheita. As pimentas ‘Bode’ e ‘Dedo-de-Moça’ possuem frutos maiores e são mais fáceis de apanhar, sendo possível colher até 60 kg/dia/operário, enquanto as

pimentas ‘Malagueta’ e ‘Cumari do Pará’ possuem frutos menores, o que reduz a velocidade da colheita (aproximadamente 10 kg/dia/operário) (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Para aquelas pimentas com maior resistência do pedúnculo, como a ‘Bode’ e a ‘Dedo de Moça’, às vezes é necessária uma operação adicional no galpão de beneficiamento para retirar completamente o pedúnculo dos frutos destinados para conservas. As pimentas mais picantes (‘ardidas’), como a ‘Malagueta’, causam irritação e até queimaduras na pele das mãos dos colhedores devido aos teores mais elevados de capsaicina (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007), sendo que essas variações podem ocorrer entre espécies e dentro de espécies.

8. RECURSOS GENÉTICOS E MELHORAMENTO EM CAPSICUM

A ampla adaptabilidade e variabilidade de tipos regionais em todo o território nacional fazem do Brasil um centro de diversidade do gênero, e é necessário que haja condições que favoreçam a implementação e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de *Capsicum* no país (BENTO et al., 2007; BARBOZA et al., 2020; RIBEIRO et al., 2020). A busca de variedades resistentes a doenças, principalmente viroses, tem sido o alvo preferencial dos melhoristas de *Capsicum*, sendo que a base genética do gênero não é tão estreita como em muitas outras culturas e um grande número de variedades tropicais ainda não foi explorado (HEISER, 1979).

As espécies domesticadas *C. chinense* e *C. frutescens* são muito próximas geneticamente, sendo de difícil distinção, principalmente se for considerada a possibilidade de ocorrência de híbridos naturais interespecíficos (CARVALHO, 2014). Essa mesma autora mostrou que, embora essas espécies apresentem similaridades e características compartilhadas com sobreposição de caracteres morfológicos, estas se mostraram de fato distintas por análises com marcadores moleculares microssatélites.

Os cruzamentos interespecíficos podem permitir o melhoramento de cultivares pela introdução de importantes alelos, tais como os de resistência a patógenos (MOSCONI et al., 2003). Entretanto, para que seja bem-sucedida a transferência de genes entre espécies, é necessário que elas sejam geneticamente próximas, ou seja, apresentem certa homologia cromossômica, minimizando os problemas de incongruidade e, desse modo, viabilizando o híbrido (PRESTES e GOULART, 1995). Em geral, quanto mais próximas geneticamente são as espécies envolvidas no cruzamento, mais fácil será a obtenção do híbrido e mais fértil será a progênie (SINGH, 2002).

A introdução de genes que conferem resistência a doenças em *C. annuum*, a partir de outras espécies do gênero, é uma das mais bem-sucedidas aplicações da hibridação interespecífica dentro do gênero para o melhoramento da cultura (RUSSO, 2012). Por exemplo, a introgressão de genes de resistência ao vírus TMV de *C. chinense* e *C. chacoense* em *C. annuum* (PICKERSGILL, 1997).

Em geral, em programas de melhoramento genético de pimentas, as seleções são feitas para baixa persistência do pedúnculo na planta (para facilitar a colheita), além de outras características como produtividade, arquitetura da planta, precocidade e resistência a doenças (REIFSCHNEIDER, 2000; MARTINS, 2010). Em estudo realizado com pimenta tabasco (*C. frutescens*), Rao & Paran (2003) relataram que a fácil abscisão do fruto do pedúnculo parece estar relacionada à presença de enzimas, principalmente a poligalacturonase (PG), responsáveis pela degradação de polímeros presentes na parede celular, como a pectina. Arancibia et al., (2004) concluíram que o grau de degradação da pectina está diretamente relacionado à abscisão.

A organização da coleção de germoplasma em coleções nucleares tem sido tópico de interesse recente para o programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa, como estratégia para melhorar a conservação e o uso desses recursos genéticos (CARVALHO 2014). Na composição da coleção nuclear, cada acesso vai representar a variabilidade genética de outros acessos que ficaram no mesmo grupo de similaridade. Feita a caracterização detalhada da coleção nuclear, caso seja verificado o potencial de determinado acesso, esse potencial pode ser extrapolado para todos os acessos do mesmo grupo de similaridade, o que pode ser confirmado por meio de caracterização detalhada desses acessos (FALEIRO, 2007).

Existem diversas coleções de germoplasma de *Capsicum* nacionais e internacionais, sendo as duas maiores localizadas no World Vegetable Center (WorldVeg) em Shanhua (Taiwan) e em United States Department of Agriculture (USDA) em Griffin, no estado da Geórgia (EUA) com, respectivamente, 9.209 e 4.877 acessos provenientes de vários continentes (BARCHENGER; NARESH; KUMAR, 2019). Atualmente, existem várias coleções e alguns poucos Bancos Ativos de Germoplasma de *Capsicum* no Brasil. Os BAGs de pimenta que se destacam no país com maior número de acessos são o BAG-IAC (Campinas-SP), BAG-UFV (Viçosa-MG) e BAG-Embrapa Hortaliças (Brasília-DF) (DOMENICO, 2011).

Com o intuito de preservar o patrimônio genético e colocá-lo à disposição do agronegócio brasileiro, a Embrapa Hortaliças e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia iniciaram, na década de 1980, coletas e intercâmbio de pimentas de diferentes tipos, sendo que a Embrapa Hortaliças mantém atualmente um acervo de mais de quatro mil acessos, a maior

coleção brasileira de pimentas do gênero *Capsicum* (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; COSTA & SPEHAR, 2012).

A Embrapa Hortaliças, dada a importância da cultura para o Brasil, também criou o Programa *Capsicum*, liderado pelo pesquisador Francisco Reifschneider, que teve como mola propulsora a requeima, doença causada por um fungo (fitóftora), que vinha devastando plantios de pimentão em várias partes do país, e com relatos de ocorrência na pimenta malagueta em Minas Gerais. Além do fungo, viroses também contribuíam para aumentar os problemas, o que ajudou a fortalecer a ideia da necessidade de se criar um programa para enfrentar essa problemática (MACEDO, 2015). Nesse sentido, em 2008, foi criada uma plataforma online de gestão baseada em uma rede nacional de pessoas vinculadas ao agronegócio da pimenta (<http://groups.google.com/group/capsicums>). Essa plataforma, associada a diversos eventos de capacitação e informação de mercado e manejo, como encontros nacionais, acrescentam bastante para o melhor conhecimento de forma a agregar valor na produção desse cultivo, assim identificar problemas da cultura que possam ser solucionados com o melhoramento genético.

O programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa também foi impulsionada por projetos em parceria com empresas processadoras de pimenta, com destaque para a Sakura-Nakaya Alimentos, empresa de alimentícia que lidera a produção de molhos à base de soja, pimenta e alho no País. As cultivares de pimenta jalapeño (*C. annuum*) BRS Sarakura e BRS Garça, são os primeiros frutos dessa parceria. As plantas dessas cultivares de polinização aberta apresentam frutos grandes e elevada produtividade: de 40 a 60 t/ha com a BRS Garça, e de 45 a 65 t/ha no caso da BRS Sarakura, colhidas em campo de produção de Catalão, município do sudeste goiano. Outra parceria importante foi com a agroindústrias Fuchs Agro Brasil Ltda., que resultou na obtenção do híbrido de pimenta doce para páprica BRS Brasilândia, com elevados rendimento industrial e teor de capsaiscina. Parcerias com outras instituições como a Emater-DF e de outros estados, e fundações de apoio à pesquisa, também têm sua cota de créditos pelos bons resultados alcançados pelo programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa (MACEDO, 2015).

A cultivar de pimenta biquinho (*C. chinense*) de coloração salmão BRS Tui e o porta-enxerto para pimentão (*C. annuum*) BRS Acará, que apresenta resistência às doenças de solo murcha-de-fitóftora e murcha bacteriana, São mais recentes, enquanto as cultivares BRS Juruti (habanero), BRS Nandaia (habanero) BRS Mari (dedo-de-moça), BRS Moema (biquinho) e BRS Seriema (bode) fazem parte do portfólio voltado para o segmento da agricultura familiar (MACEDO, 2015).

9. MARCADORES MOLECULARES

Segundo Collard et al. (2005), marcadores genéticos representam diferenças genéticas entre organismos ou espécies que ocupam uma posição genômica específica dentro dos cromossomos (como genes) chamada loco, e são divididos em marcadores morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isoenzimas) ou de um segmento específico de DNA, expresso ou não (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética a nível molecular oferecem informações adicionais a diversos outros estudos relacionados à conservação e uso de bancos de germoplasma, estudos filogenéticos, mapeamento genético, mas a principal aplicação do estudo da genética de plantas é o melhoramento genético (HOFFMANN e BARROSO, 2006). O uso de métodos altamente discriminatórios para a identificação e caracterização de genótipos é essencial para programas de melhoramento e até para a proteção de cultivares (REZENDE et al., 2009).

O desenvolvimento de marcadores moleculares alterou muito a genética e o melhoramento de plantas (KORDROSTAMI et al. 2015). O uso de marcadores moleculares no melhoramento vegetal e animal abriu novos territórios na agricultura e são amplamente utilizados por sua maior prevalência e expressão em diferentes estágios de desenvolvimento dos organismos surgindo por meio de mutações como substituições, inserções e deleções, erros de replicação do DNA e em sequências repetidas (PATERSON, 1996; FALQUE e SANTONI, 2007; ZHU et al., 2008).

As principais etapas de detecção de marcador molecular, envolvem a extração do DNA da planta, e posterior detecção de polimorfismos entre as amostras que geralmente são determinadas por meio de reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase) ou hibridação e subsequente separação de fragmentos para reconhecer diferentes moléculas baseadas em tamanho, composição química ou carga (BERNARDO, 2008; JENA, 2008). Nos últimos anos, o avanço da bioinformática e das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) tem revolucionado os estudos de genômica de plantas. A plataforma online Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) armazena dados genômicos, fenotípicos, projetos e ferramentas potentes para análise de espécies da família *Solanaceae*, incluindo pimenta (FERNANDEZ-POZO et al., 2014). Dentre as espécies do gênero *Capsicum*, o genoma de *C. annuum* foi o primeiro a ser publicado por dois grupos de pesquisa de forma paralela. Kim et al. (2014) publicaram a sequência do genoma completo de *C. annuum* (CM334) e o sequenciamento *de novo* de *C. chinense* (PI 159236). No mesmo ano, Qin et al. (2014) realizaram a montagem do

genoma de Zunla-1 (*C. annuum* L.) e da pimenta silvestre chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*). Ambos os estudos mostraram que o tamanho do genoma de *Capsicum annuum* é de ~3–3,5 Gb, com cerca de 35 mil genes e alta porcentagem de elementos repetitivos (~80%) (De ALMEIDA et al., 2020). Kim et al. (2017) também realizaram a montagem de alta qualidade dos genomas de *C. baccatum* (~3,9 Gb) e *C. chinense* (~3,2 Gb) com base no genoma de referência de *C. annuum* (CM334).

Entre as vantagens do uso de marcadores moleculares pode-se citar a identificação direta do genótipo sem a influência do ambiente, a possibilidade de detecção de polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos (FALEIRO, 2007).

9.1 SIMPLE SEQUENCE REPEATS (SSR)

Dentre os diferentes marcadores, os SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélites ou ainda STR (Short Tandem Repeats) são ferramentas indicadas para uma análise genética detalhada. Esses marcadores caracterizam-se por serem abundantes e amplamente distribuídos nos genomas de eucariotos, apresentam alta heterozigosidade, são multialélicos, bastante estáveis e codominantes, ou seja, em cada loco analisado é possível distinguir homozigotos e heterozigotos, o que possibilita grande riqueza de informação genética. Uma vez obtidos os primers informativos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente, e os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (FERREIRA et al., 2007; FALEIRO, 2007; KALIA et al., 2011; ZANE et al., 2002). A variação no número de repetições é causada por deslizamento durante a replicação do DNA (SCHLOTTERER e TAUZ, 1992) ou crossing-over entre as cromátides irmãs (INNAN et al., 1997). Este deslizamento é considerado como o principal mecanismo para que sejam geradas variantes em tamanho nos locos microssatélites (KRUGLYAK et al., 1998; CHAMBERS & MACAVOY, 2000).

Microssatélites estão disponíveis para um número limitado de espécies de plantas já que são iniciadores específicos, e se anelam nas regiões que flanqueiam os microssatélites, geralmente com tamanho entre 20 e 30 pb, número suficientemente grande para que este primer não encontre outra sequência complementar que não à da região adjacente ao microssatélite, o que restringe o uso à espécie em estudo. Nesse sentido, é necessário primeiramente o desenvolvimento dos primers para a espécie por meio da construção de bibliotecas genômicas, seleção de clones positivos utilizando-se como sondas sequências repetitivas, e posterior

sequenciamento para finalmente desenhar os primers, que em alguns casos, poderão ser usados em espécies geneticamente relacionadas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA; 1998 FALEIRO et al., 2003; HOFFMANN & BARROSO, 2006).

Assim, diversos estudos demonstram semelhança em sequências de DNA em regiões adjacentes às sequências repetitivas, em espécies diferentes (CIAMPI et al., 2008), indicando a possibilidade de se transferirem primers microssatélites entre espécies aparentadas (CARVALHO, 2014), o que poupa tempo e altos custos no desenvolvimento de primers. A transferibilidade de primers microssatélites (SSR) entre espécies aparentadas é uma estratégia que permite realizar análises genéticas, uma vez que não existem primers SSR desenvolvidos especificamente para *C. frutescens* e *C. chinense*. A transferibilidade de primers SSR de *C. annuum* para *C. chinense* e *C. frutescens* foi avaliada por CARVALHO et al. 2015 e, de um total de 185 primers, 116 (62,7%) amplificaram fragmentos em *C. frutescens* e *C. chinense*. Destes, 19 (16,4%) apresentaram-se polimórficos para *C. frutescens* e 35 (30,2%) mostraram polimorfismo em *C. chinense*.

Outros estudos de transferibilidade em *Capsicum* contribuem significativamente para o uso de primers em espécies relacionadas (YI et al., 2006; NAGY et al., 2007; INCE et al., 2010). Devido a sua distribuição onipresente nos genomas e ao seu alto polimorfismo, os SSR têm sido amplamente utilizados em estudos sobre diversidade genética, evolução, construção de mapas genéticos, *quantitative trait loci* (QTL) e mapeamento genético (PENG et al., 2000; LEE et al., 2004; SHARMIN et al., 2018; ZHONG et al., 2021).

9.2 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP)

Em muitos estudos de melhoramento vegetal, marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) estão cada vez mais sendo utilizados, possibilitando acelerar os ganhos de seleção por meio da seleção assistida por marcadores (MAS). No entanto, para muitas plantas cultivadas, há números baixos de marcadores SNP validados disponíveis, embora sejam necessários em grande número para estudos de variabilidade genética, mapas de ligação, análise de estrutura populacional, genética de associação, isolamento de genes baseado em mapa e melhoramento de plantas (GANAL et al., 2009).

Avanços tecnológicos em estudos com marcadores moleculares e nos sistemas de sequenciamento de DNA permitiram o surgimento de metodologias de alto desempenho capazes de gerar grande quantidade de dados com baixo custo e considerável rapidez, como é o caso dos SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) ou Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos,

que são marcadores moleculares utilizados para identificar mutações geradas por polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo (CHO *et al.*, 1999). São a mais frequente forma de variação genética, sendo gerados por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção. Essas alterações pontuais podem ocorrer em regiões expressas ou não expressas e têm sido muito utilizados em estudos filogenéticos de evolução intraespecífica (WOLTERS *et al.*, 2000), em identificação de cultivares e para mapeamento genético (MELLOTO & KELLY, 2001; QUIRINO, 2003; HAN *et al.*, 2018). Aproximadamente 90% da heterozigose na população humana é devida a SNPs (GOLDMAN *et al.*, 2005).

Marcadores SNPs são relativamente abundantes em plantas (um a cada 100-300pb), apresentam baixa taxa de mutação e, devido às tecnologias de sequenciamento de nova geração, são identificados com alto rendimento e baixo custo (SINGH & SINGH, 2015). A mutação mais comum nesses marcadores são as transições ou trocas de uma base pirimidina (C por T) ou de uma purina (A por G), sendo os SNPs de maior reprodutibilidade em comparação aos demais marcadores moleculares, com presença em todo o genoma, possibilidade de automação e detecção simultânea de grandes quantidades de polimorfismos (HASAN *et al.*, 2021; KIM & MISRA, 2007), que possibilitam grande cobertura genômica, sobretudo na construção de mapas genéticos e detecção de QTLs.

Dentre as metodologias de análise desses marcadores, é importante citar o uso de MicroArrays ou chips, que possibilitam a análise simultânea de centenas de marcadores em centenas de acessos, produzindo uma enorme quantidade de dados com alta cobertura genômica, de modo a auxiliar na criação de mapas genéticos e na detecção de sequências de interesse. Segundo SINGH & SINGH, 2015, os sistemas Illumina Infinium são plataformas que envolvem a genotipagem de SNPs em todo o genoma utilizando microesferas com sondas Infinium II acopladas, em que a terminação 3' é posicionada no último nucleotídeo ao lado da posição do SNP alvo e um sinal é gerado quando o nucleotídeo é adicionado ao loco alvo. Além disso, as matrizes podem ser usadas não apenas para as espécies das quais os ESTs foram derivados, mas também para espécies intimamente relacionadas (GANAL *et al.*, 2009). Em suma, essas sondas ou matrizes contêm sequências específicas em “spots” de um Microarray ou chip que se alinham ao cDNA (complementary DNA), marcado com fluorescência, das amostras em questão, e emitem a cor correspondente quando lidas por laser. As sequências que não encontram complementaridade (não anelam), são “lavadas” do chip. Esses dados são codificados por meio do uso de bioinformática e propiciam análises robustas e eficientes.

10. MAPEAMENTO GENÉTICO

Cada espécie tem um número característico de pares de base em seu núcleo, conhecido como tamanho do genoma ou conteúdo de DNA nuclear que pode ser estimado através da citometria de fluxo. Espécies do gênero *Capsicum* apresentam o segundo maior genoma na família Solanaceae, no entanto diferentes resultados têm sido observados na determinação do conteúdo de DNA dentro do gênero (MARTINS et al., 2015).

Estudos realizados com marcadores morfológicos em muito contribuíram para a elucidação dos fundamentos teóricos da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (KNAPP, 1991). Os marcadores moleculares são um recurso muito útil em análises genéticas. Há grande quantidade de mapas genéticos disponíveis, tanto para espécies animais como vegetais, e um número crescente de genes têm sido detectados com auxílio desses mapas. No início da década de 60, as isoenzimas foram descobertas (MARKERT e MOLLER, 1959) e passaram a ser usadas como marcadores bioquímicos, permitindo a construção de mapas genéticos, potencialmente, em todas as espécies de plantas (GARVIN e WEEDEN, 1994). A partir da década de 80, com o advento dos marcadores de DNA, o mapeamento genético tornou-se, efetivamente, ilimitado a todas as espécies (BOSTEIN et al., 1980).

Mapas de ligação são usados na identificação de regiões cromossômicas que contenham traços qualitativos (controlados por um único gene) ou quantitativos (Quantitative Trait Loci: QTLs) – controlados por mais genes. Esses mapas mostram a distância relativa entre marcadores ao longo do cromossomo (MOHAN et al., 1997; KORDROSTAMI et al., 2015). A construção de mapas de ligação tem como base a análise de segregação de centenas de marcadores e, por isso, é computadorizada (CARNEIRO e VIEIRA, 2002). Programas como “Mapmaker” (LANDER et al., 1987), “Linkage 1” (SUITER et al., 1983), “Gmendel” (LIU e KNAPP, 1992) foram desenvolvidos para auxiliar na análise genética dos dados visando à construção de mapas genéticos.

A seleção da população para mapeamento envolve a escolha de genitores e a determinação do tipo de população de mapeamento a ser avaliada, sendo consideradas etapas críticas para o sucesso da construção do mapa (STAUB et al., 1996). A escolha adequada de parentais da população segregante a ser utilizada é de suma importância. Os genitores escolhidos para gerar a população de mapeamento devem ser contrastantes (até mesmo quanto à expressão fenotípica da característica de interesse), já que o número de marcas no mapa

representa o número de caracteres contrastantes nos genitores e que estarão segregando nas populações de mapeamento (TANSKLEY 1982; TANKSLEY et al., 1992). O tamanho da população segregante utilizada no mapeamento genético preliminar geralmente varia de 50 a 250 indivíduos (MOHAN et al., 1997), no entanto populações maiores são necessárias para mapeamento de alta resolução, sobretudo quando em análises de QTLs, em que também é necessária a avaliação fenotípica da população (COLLARD et al., 2005).

Os tipos de populações mais utilizadas para a construção de mapas são linhagens puras recombinantes (*RILs – Recombinant Inbred Lines*), populações obtidas por retrocruzamento, populações F₂, linhagens de duplo-haploides ou populações F₁ geradas a partir de cruzamento entre parentais heterozigotos (JONES et al., 1997; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; CARNEIRO & VIERIA, 2002; COLLARD et al., 2005). A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador empregado (TANKSLEY et al., 1988).

Quanto ao tipo de marcador genético escolhido para este fim, é importante levar em consideração marcadores com maior conteúdo informativo, geralmente codominantes, como microssatélites, por exemplo. Tanto o grau de cobertura do genoma como a densidade do mapa a ser construído são funções diretas do número de marcadores (COELHO, 2000). Espera-se um padrão mendeliano típico para a população segregante, que é pressuposto nos modelos probabilísticos (BEARZOTI, 2000). A ausência do padrão mendeliano é chamada distorção da segregação mendeliana, sendo causada, por exemplo, por seleção e deriva genética ou até mesmo pelo efeito de amostragem ou viabilidade diferencial de gametas (FREGENE et al., 1997; LESPINASSE et al., 2000; TANSKLEY 1993). Segundo LIU (1998), os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação podendo gerar falsos positivos. É recomendado, preferencialmente, o descarte dos locos que apresentam distorções da segregação mendeliana para não comprometer a qualidade do mapa (YAO et al., 1999; BEARZOTI, 2000).

A mensuração da frequência de gametas recombinantes entre dois locos constitui o procedimento a partir do qual se realiza o mapeamento (STAUB et al., 1996). Diversos tratamentos estatísticos podem ser usados para estimar a frequência de recombinantes, entre eles, o método dos momentos, o método dos quadrados mínimos e o da máxima verossimilhança (WEIR, 1996; LIU, 1998a). Ao longo do genoma existem "pontos quentes" e "pontos frios" de recombinação, que são regiões cromossômicas em que a recombinação ocorre com maior ou menor frequência, respectivamente (FARIS et al., 2000; Ma et al., 2001; YAO et al., 2002).

De acordo com WEIR (1996), uma unidade de medida de distância genética de mapa é definida como igual à distância entre dois locos ao longo da qual se espera que ocorra uma permuta por gameta, por geração. Essa medida é denominada Morgan (M), sendo expressa em centiMorgans (cM). Para estabelecer a relação entre as distâncias genéticas entre dois locos no mapa e a frequência de gametas recombinantes criaram-se as funções de mapeamento (LYNCH e WALSH, 1998; CAMP, 2002; ZENG, 1994). Um grande número de funções de mapeamento tem sido desenvolvido (HALDANE, 1919; KOSAMBI, 1944; CARTER e FALCONER, 1951; RAO et al., 1977; FELSENSTEIN, 1979; KARLIN, 1982), sendo as funções de Haldane e Kosambi as mais utilizadas no mapeamento genético de vegetais (STAUB et al., 1996). A função de Haldane admite que a ocorrência de permuta se dá de modo independente (ausência de interferência), enquanto que a função de Kosambi admite a ocorrência de permutas próximas como eventos não independentes (presença de interferência).

Do ponto de vista biológico, os grupos de ligação são definidos como grupos de genes (marcadores) cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo (LIU, 1998). Uma vez conhecidas as frações de recombinação (quanto maior for a taxa de recombinação, maior será a probabilidade de ocorrência de permuta) entre cada par de marcadores, e já discriminados os grupos de ligação, deve-se determinar a melhor ordem para os marcadores dentro de cada grupo. Historicamente, a ordenação de locos tem sido um processo que visa minimizar o número de crossing-overs (CARNEIRO e VIEIRA, 2002). A ligação entre os marcadores geralmente é calculada usando um índice de proporção de ligação versus nenhuma ligação, expresso como razão de verossimilhança, convertido para o logaritmo na base 10 (LOD - logarithmic of odds) (RISCH, 1992). Um valor de LOD igual a três entre dois marcadores indica que a ligação é 10^3 ou 1000 vezes mais verossímil (ou seja, 1000: 1) do que nenhuma ligação (nulo hipótese), sendo valores maiores que três normalmente usados para a construção de mapas de ligação (COLLARD et al., 2005). Os softwares mais comumente utilizados para a construção de mapas de ligação incluem Mapmaker/EXP (LANDER et al., 1987; LINCOLN et al., 1993), MapManager QTX (MANLY et al., 2001) e JoinMap (STAM, 1993).

Uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos, altura da planta, teor de proteína, resistência a doenças, que resultam da ação cumulativa de um conjunto de genes. Essas características são denominadas poligênicas, quantitativas ou de herança complexa, e os locos que as controlam são chamados de QTLs (TANKSLEY, 1993). A identificação de QTLs baseada apenas nos métodos de melhoramento convencional não é possível, de forma que o advento de marcadores moleculares foi e é de fundamental importância

para esse tipo de análise (COLLARD et al., 2005). Um dos principais objetivos das análises envolvendo QTLs é limitar a região a uma menor região do cromossomo. Mapeamento de QTLs junto ao desenvolvimento de ferramentas estatísticas têm contribuído significativamente para a genética quantitativa na identificação de genes potenciais de interesse, e a complexidade dessas características é influenciada pela segregação de alelos em vários locos, fatores ambientais e suas interações (RAHIMI et al. 2012; YAMAMOTO et al. 2009).

Os fundamentos da teoria do mapeamento de QTLs foram entendidos a partir do trabalho de Thoday (1961). Esse autor sugeriu que se um oligogene (herança complexa) estiver ligado a um monogene (herança simples), os efeitos fenotípicos do oligogene podem ser indiretamente estudados com base nos efeitos do gene vizinho. O mapeamento de QTLs possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como suas localizações cromossômicas, modo de ação gênica (aditividade, dominância, heterose e epistasia), além de possibilitar a decomposição da interação genótipos por ambientes ao nível de cada QTL (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; AUSTIN e LEE, 1998). O mapeamento de QTLs é baseado no fato de que genes marcadores estão segregando por meio de recombinação cromossômica (crossover) durante a meiose o que permite a análise dessas regiões na progênie (BERNARDO, 2008).

Três métodos são amplamente utilizados para a detecção de QTLs: análise de marcador único, mapeamento por intervalo simples e mapeamento por intervalo composto (LIU, 1998b; TANSKLEY, 1993). A análise de marcador único é o método mais simples para detectar QTLs associados a marcadores únicos e inclui métodos estatísticos como testes t, análise de variância (ANOVA) e regressão linear (COLLARD et al., 2005). O método de mapeamento por intervalo simples (SIM) faz uso de mapas de ligação e analisa intervalos entre pares adjacentes de marcadores ligados ao longo dos cromossomos simultaneamente, em vez de analisar marcadores únicos (LANDER & BOTSTEIN, 1989). E mais recente, o mapeamento de intervalo composto (CIM), que combina mapeamento de intervalo com regressão linear incluindo marcadores genéticos adicionais na estatística além de um par adjacente de marcadores vinculados para mapeamento de intervalo (JANSEN, 1993; JANSEN & STAM, 1994; ZENG, 1993, 1994).

11. MORFOLOGIA E ANATOMIA

Os marcadores morfológicos, também chamados de clássicos pelos melhoristas, são marcadores genéticos representados por características fenotípicas inerentes a cada espécie e

geralmente visíveis. São de extrema importância em estudos botânicos e amplamente utilizados até os dias atuais. HILL et al., 2013 relataram que para incrementar os programas de melhoramento de *Capsicum* é necessária a caracterização detalhada da diversidade presente no gênero, incluindo dados morfológicos, geográficos e moleculares. A caracterização morfológica é um processo que, por meio da utilização de uma lista de descritores, trata de prover maiores informações sobre o germoplasma conservado, dispondo-o de uma forma mais efetiva para a utilização (RAMOS et al., 1999; NEITZKE, 2012). Em estudo de caracterização morfológica e genética de acessos de *Capsicum* spp. da coleção da UFAM (Universidade Federal do Amazonas), foram avaliados 20 acessos com 56 descritores morfológicos definidos pelo Instituto Internacional de Recursos Genéticos de Plantas (IPGRI), constatando alta variabilidade genética e predominância de *C. chinense* na coleção (Da SILVA, 2011).

O conhecimento da variabilidade genética estimada por marcadores moleculares, complementa a caracterização fenotípica e é essencial para encontrar fontes adicionais de diversidade genética presente em germoplasma (MOSES et al., 2014; BABA et al., 2016). Tradicionalmente, a caracterização de pimentas é feita com descritores morfológicos estabelecidos pelo IPGRI (1995), que possuem alta herdabilidade, são expressos em todos os ambientes, com pouca interação genótipo-ambiente, e de fácil identificação e diferenciação. Para o gênero *Capsicum*, caracteres qualitativos como formato do fruto, cor do fruto imaturo e maduro, textura da epiderme, são importantes para o mercado consumidor. Esses descritores também são utilizados nas chaves de identificação taxonômicas de famílias, gêneros e espécies vegetais, e têm servido aos estudos de diversidade genética (COSTA & SPEHAR, 2012). GOMES et al. (2019) caracterizaram 56 acessos de *Capsicum* por meio de 25 descritores morfoagronômicos quantitativos e qualitativos e concluíram que foram eficientes na separação das amostras em relação às espécies. BENTO et al. (2007), estudando a diversidade genética e fenotípica em 29 acessos de pimentas por meio de 37 descritores morfoagronômicos, observaram diversidade fenotípica entre os acessos estudados, com potencial uso para programas de melhoramento vegetal. Estudos de caracterização direcionados a pimentas facilitam e estimulam ações de melhoramento e ampliação da diversidade, podendo ser mais resistentes a patógenos e de boa qualidade comercial (LUZ, 2006). Dessa forma, o uso dos genótipos em programas de melhoramento se torna mais efetivo com o uso de acessos devidamente caracterizados por descritores comumente reconhecidos e catalogados.

As espécies de *Capsicum* são frequentemente descritas em termos de divergência genética considerando aspectos morfológicos, agronômicos e moleculares, no entanto descrições das diferenças genéticas com base em caracteres anatômicos são raras (DIAS et al.

2013). O estudo anatômico envolve a descrição de estruturas microscópicas ou vistas a olho nu, e possibilitam a correta caracterização para chaves taxonômicas.

A planta produtora de sementes possui corpo altamente evoluído, apresentando evidências de uma especialização funcional e estrutural expressa pela diferenciação externa em órgão e interna, por várias categorias de células, tecidos e sistemas de tecidos, que podem ser visualizados em formas de transição (EAU, 1974).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCSEM – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE MUDAS E SEMENTES. Pesquisa de mercado de sementes de hortaliças 2007. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/dadosdosegmento.php>. Acesso em 04 de novembro de 2019.

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

ALI, M. Chili (*Capsicum* spp.). Food chain analysis: setting research priorities in Asia. Shanhua, Taiwan: AVRDC – **The World Vegetable Center**. Technical Bulletin No. 38, AVRDC Publication 06-678. 2006. 253p.

ARANCIBIA, R.A.; MOTSENBOCKER, C.E. Pectin ultra-degradation decreases the force required to detach ripe fruit from the calyx in tabasco pepper. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 129, n. 5, p. 642-648, 2004.

AUSTIN, D.F.; LEE, M. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize across generations in stress and nonstress environments. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1296-1308, 1998.

BABA, V.Y. et al. Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. **Genetic resources and crop evolution**, v. 63, n. 8, p. 1371-1381, 2016.

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

BARBOZA, G. E.; BIANCHETTI, L. D. B.; STEHMANN, J. R. *Capsicum carassense* (Solanaceae), a news species from the Brazilian Atlantic Forest. **PhytoKeys**, v. 140, p. 125-138, 2020.

BARBOZA, G.E.; GARCIA, C.C.; GONZALEZ, S.L.; SCALDAFERRO, M.; REYES, X. Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. **PLoS ONE**. 14, 2019.

BARCHENGER, D. W.; NARESH, P.; KUMAR, S. **GENETIC RESOURCES of CAPSICUM**. In: *The Capsicum Genome*. Switzerland: Springer, Cham, 2019, cap. 2, p. 9-23.

BEARZOTI, E. **Mapeamento de QTL**. In: PINHEIRO, J.B., CARNEIRO, I.F (Eds.). *Análise de QTL no melhoramento de plantas*. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.63-223.

BELLETTI, P., MARZACHI, C., LANTERI, S. Flow cytometry measurement of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 209, p. 85–91, 1998.

BENTO, C. S. et al. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 2, p. 149-156, 2007.

BERNARDO, R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. **Crop Science**, v. 48, n. 5, p. 1649-64, 2008.

BOSLAND, P.W. Chiles: A diverse Crop. **Horticulture Technology**, v.2, p. 7-10, 1992.

BOSLAND, P. W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice Capsicums**, New York: CABI Publishing, 1999. p. 66-83.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BUSO, G. S. C.; BRONDANI, R. V.; AMARAL, Z. P. de S.; REIS, A. M. M.; FERREIRA, M. E. **Desenvolvimento de primers ssr para análise genética de pimentas e pimentões**

(*Capsicum spp.*) utilizando biblioteca genômica enriquecida. Brasília, DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2000. 27p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Boletim de Pesquisa, 15).

CAMP, N.J.; COX, A. Quantitative trait loci: methods and protocols: Springer Science & Business Media; 2002.

PINTO & DONZELE, Revista CAMPO & NEGÓCIOS ONLINE. Diversidade das Pimentas *Capsicum*. **Campo & Negócios**, maio de 2021. Disponível em: <<https://revistacampoenegocios.com.br/pimentas-capsicum/#:~:text=As%20pimentas%20do%20g%C3%AAnero%20Capsicum,de%203%2C8%20milh%C3%B5es%20hectares.>> Acesso em 04/03/2022.

CARNEIRO, M.S; VIEIRA, M.L.C. Mapas Genéticos em Plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, 89-100, 2002.

CARTER, T.C.; FALCONER, S.D. Stocks for detecting linkage in the mouse and the theory of their design. **Journal of Genetics**, Bangarole, v.50, n.2, p.307-323, 1951.

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**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 49 p.

CARVALHO, S.I.C., RIBEIRO, C.S.C., Porto, I.S. (2005) **Características agronômicas e industriais de pimentas *Capsicum spp.* do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1129544/1/CT-172-25-jan-2021.pdf>>. Acesso em 30/09/2019.

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

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B. (2008) **Botânica e Recursos Genéticos**. In: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. (ed.) *Pimentas Capsicum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p 39-54.

CARVALHO, S.I.C.; RAGASSI, C.F.; OLIVEIRA, I.B.; AMARAL, Z.P.S.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; FALEIRO, F.G.; BUSO, G.S.C. Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annum* L. to *C. frutescens* L. and *C. chinense* Jacq. **Genetic and Molecular Research**, v. 14, p. 7937–7946, 2015.

CASALI, V.W.D., COUTO, F.A.A. (1984) **Origem e botânica de Capsicum**. Informe Agropecuário, 10: 8-18.

CHAMBERS, G. K. & MACAVOY, E. S. **Microsatellites: consensus and controversy**. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, v.126, n.4, p.455-476, 2000.

CHENG, S.S. 1989. **The use of Capsicum chinense as sweet pepper cultivars and sources for gene transfer**. In: Tomato and Pepper Production in the Tropics. Shanhua, Tainan, Taiwan: Asian Research and Development Centre, p. 55– 62.

CHO, R.J.; MINDRINOS, et al., Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, v.23, p.203-207, 1999.

CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1074-1077, 2008.

COLLARD, B. C. Y. et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n. 1, p. 169-196, 2005.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R. Base da diversidade genética. In: *Conservação de Recursos Genéticos no Brasil*. Brasília, DF: Embrapa, 2012, cap.1, p. 28-65.

COELHO, A.S.G. **Considerações gerais sobre a análise de QTL's.** In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Eds.). *Análise de QTL no melhoramento de plantas.* Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-20.

Da SILVA, R. A. **Caracterização morfológica e diversidade genética entre acessos de *Capsicum* spp. da coleção de trabalho da FCA/UFAM.** 2011.

De ALMEIDA, B. M. et al. **As Vicissitudes da Pesquisa e da Teoria nas Ciências Agrárias: Pimentas *Capsicum* L.: Conservação dos Recursos Genéticos, Caracterização Morfológica e Citogenética e Sequenciamento Genômico (PARTE II).** Teresina: UFPI. 2020. p. 48-61.

DeWITT, D.; BOSLAND, P.W. **The Complete Chilli Pepper Book: A Gardener's Guide to Choosing, Growing, Preserving and Cooking;** Timber Press: Portland, OR, USA, 2009.

DIAS, G. B. et al. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. **Genetic and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6488-6501, 2013.

DOMENICO, C.I.; LILLI, A.J.O.; MELO, A.M.T. Caracterização de componentes de produção de híbridos intra-específicos de pimenta-hortícola. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 50.** Anais... Guarapari: ABH. 2010.

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

ESHBAUGH, W.H. (1993) **Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery.** In: Janick, J., J.E. Simon (eds.). *New Crops.* New York: Wiley and Sons, Inc., p. 132-139.

EMBRAPA HORTALIÇAS, **Sistemas de Produção, 2,** ISSN 1678-880x Versão Eletrônica Nov./2007, Disponível em: https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_sp/index.html, Acesso em 03 de set. de 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema de produção. Pimenta (*Capsicum* spp.) 2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp>, Acesso em 04 de novembro de 2019.

EMBRAPA HORTALIÇAS, *Capsicum chinense*, Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0frh1202wx5ok0liq1mqt5bf5ht.html>>, Acesso em 01 de nov. de 2019.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, Itabuna, v.15, p.41-46, 2003.

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

FALQUE, M; SANTONI, S. (2007) Molecular markers and high-throughput genotyping analysis. In: Morot-Gaudry J-F, Lea P, Briat J-F, editors. Functional plant genomics: Taylor & Francis Group, LLC; 503–27.

FARIS, J.D.; K.M. Haen & B.S. Gill, 2000. Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. **Genetics**, v. 154, p. 823–835.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <http://faostat.fao.org> Acesso em 04 de novembro de 2019.

FELSENSTEIN, J. A mathematically tractable family of genetic mapping functions with different amount of interference. **Genetics**, Baltimore, v.91, n.4, p.769- 775, 1979.

FERNANDEZ-POZO, N. et al. The Sol Genomics Network (SGN) - from genotype to phenotype to breeding. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 1306-1041, 2014.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1996. 220p.

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

FREGENE, M.; ANGEL, F.; GOMEZ, R.; RODRIGUEZ, F.; CHAVARRIAGA, P; ROCA, W.; TOHME, J.; BONIERBALE, M. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, n.3, p.431-441, 1997.

GANAL, M.W.; ALTMANN, T.; RÖDER, M.S. SNP identification in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 211-217, 2009.

GARCÉS-CLAVER, A. et al. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, n. 7, p. 907-916, 2007.

GARVIN, D.F.; WEEDEN, N.F. Genetic-linkage between isozyme, morphological, and DNA markers in tepary bean. **Journal of Heredity**, Cary, v.85, n.4, p.273-278, 1994.

GOLDMAN, L; AUSIELLO, D. et al., Tratado de Medicina Interna. In: HALL, J. (Ed.). **Distúrbio Homogênicos e Cromossômicos**. [tradução de Ana Kepler et al.,] Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 230.

GOMES, G. P. et al. Combinations of distance measures and clustering algorithms in pepper germplasm characterization. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 172-179, 2019.

HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, Bangarole, v.8, p.299-309, 1919.

HAN, K. et al. QTL mapping and GWAS reveal candidate genes controlling capsaicinoid content in *Capsicum*. **Plant biotechnology journal**, v. 16, n. 9, p. 1546-1558, 2018.

HASAN, N.; CHOUDHARY, S.; NAAZ, N.; SHARMA, N. et al. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 128, 2021.

HEISER JR, C.B. (1976) **Peppers, *Capsicum* (Solanaceae)**. In: N.W. Simmonds. (ed.). The evolution of crop plants. London: Longman Press, p. 256- 268

HEISER, C. B. Jr. **Peppers – *Capsicum* (Solanaceae)**. IN: SIMMONDS, N. W. Evolution of crop plants. Longman, 1979, p. 265-273.

HILL, T. A; ASHRAFI, H.; REYES-CHIN-WO, S.; YAO, J.; STOFFEL, K.; TRUCO, M.J.; VAN DEYNZE, A. Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30K unigene Pepper GeneChip. **PloS one**, v.8, n.2, p.1-16, 2013.

HOFFMANN, L.V.; BARROSO, P.A.V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 36p.

INNAN, H.; TERAUCHI, R.; MIYASHITA, N.T. Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v146, p.1441–52, 1997.

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

JANSEN, R., Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v. 135, p. 205–211, 1993.

JANSEN, R. & STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v. 136, p. 1447–1455, 1994.

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

JENA, K.; MACKILL, D. Molecular markers and their use in marker-assisted selection in rice. **Crop Science**, v. 48, n. 4, p.1266-76, 2008.

JONES, N.; OUGHAM, H. & THOMAS, H. Markers and mapping: we are all geneticists now. **New Phytologist**, v.137, n.1, p.165-177, 1997.

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

KARLIN, S. Theoretical aspects of genetic map functions in recombination processes. In: CHAKRAVARTI, A. (Ed.). **Human population genetics: the Pittsburgh symposium**. New York: van Nostrand Reinhold, 1982. p.245-286.

KIM, S.; MISRA, A. SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 289-320, 2007.

KIM, S. et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. **Nature Genetics**, v. 46, n. 3, p. 270–278, 2014.

KIM, S. et al. New reference genome sequences of hot pepper reveal the massive evolution of plant disease-resistance genes by retroduplication. **Genome biology**, v. 18, n. 210, p. 1-11, 2017.

KNAPP, S.J. Mapping quantitative trait loci using molecular makers: multilocus estimators of backcross, recombinant inbred, and doubled haploid parameters. **Theoretical and Applied Genetic**, New York, v.81, p.333-338, 1991.

KORDROSTAMI, M. et al. Molecular markers in plants: concepts and applications. **Genetics 3rd Millenn**, v. 13, p. 4024-4031, 2015.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annuaire of Eugenetics.**, v.12, p.172-175, 1944.

KRUGLYAK, S.; DURRETT, R. T.; SCHUG, M. D. & AQUADRO, C. F. **Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.95, n.18, p.10774-10778, 1998.

LANDER, E.S.; P. GREEN, J.; ABRAHAMSON, A.; BARLOW, M.J.; DALY, S.E.; LINCOLN & L. NEWBURG, 1987. Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v. 1, p. 174–181.

LANDER, E. & D. BOTSTEIN, Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185–199, 1989.

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

LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L.; LECONTE, A.; LEGNATE, H.; SEGUIN, M. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, n.1, p.127-138, 2000.

LIMA, I. B.; BRAGA, A.; JÉSSYCA, J. Pimenteira ornamental submetida a tratamentos com daminozide em vasos com fibra de côco ou areia. **Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.3597–3610, 2013.

LINCOLN, S.; M. Daly & E. Lander, 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 3rd Edn.

LIU, B.H.; KNAPP, S.J. GMENDEL: a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny populations using log-likelihood ratios. **Journal of Heredity**, Cary, v.81, n.5, p.407-418, 1992.

LIU, B.H. Statistical genomics. New York: CRC, 1998a. 610p.

LIU, B., **Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis**, CRC Press, Boca Raton, 1998b.

LOPES, C.A. (2008) **Ardume, picância e pungência**. In: Ribeiro, C.S.C, Lopes, C.A., Carvalho, S.I.C., Henz, G.P., Reifschneider, F.J.B. Pimentas Capsicum. Brasília: Embrapa hortaliças, p 25-30.

LOPES, C. A. Ardume, picância, pungência In: RIBEIRO, C.S.C.; CARVALHO, S.I.C.; HENZ, G.P.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. p. 25-30.

LUZ, F. J de F.; BRAZ, L. T.; VARGAS, P. F.; ALMEIDA, G. V. B. de. Volume de pimentas *in natura* de gênero Capsicum, comercializadas na Ceagesp – SP no ano de 2004. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 11, p. 145, 2006.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: **Sinauer Associates**, 1998. 978p.

MA, X.F.; K. ROSS & J.P. Gustafson, 2001. Physical mapping of restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers in homoeologous groups 1 and 3 chromosomes of wheat by in situ hybridization. **Genome**, v. 44, p. 401–412.

MACEDO, A. (2015) Pimentas Capsicum: Uma história de Sucesso na Cadeia Produtiva. **Hortaliças em Revista**. Brasília. 11p.

MANLY, K.F.; H. Cudmore Robert, Jr. & J.M. Meer, 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. **Genome**, v. 12, p. 930–932.

MARKERT, C.L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzyme: tissues, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v.45, p.753-763, 1959.

MARTIN, F. W.; SANTIAGO, J.; COOK, A. A. **Vegetables for the hot humid tropics** (Part 7. the Peppers, Capsicum Series). Science and Education Administration / U. S. Department of Agriculture). New Orleans, 1979. 18p.

MARTINS, K.C.; SANTANA, N.T.P.; SOUZA, S.A.M.; COSTA, F.R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v.40, n.8, p.1746–1751, 2010.

MARTINS, K. C. et al., Tamanho do Genoma de Espécies de *Capsicum* via Citometria de Fluxo. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MELORAMENTO DE PLANTAS, VIII**, 2015, Goiânia. Anais... 2015.

MELLOTO, M.; KELLY, J.D. Fine mapping of the Co-4 *locus* of common bean reveals a resistance gene candidate, COK-4, that encodes for a protein kinase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.103, p.508-517, 2001.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A., et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular breeding**, v. 3, p. 87-103, 1997.

MOSCONE, E.A., BARANY, M., EBERT, I., GREILHUBER, J., EHRENDORFER, F., HUNZIER, A. (2003) Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (*Solanaceae*) by flow cytometry and feulgen densitometry. **Annals of Botany**, 92: 21-29.

MOSCONE, E.A., SCALDAFERRO, M.A., GRABIELE, M., CECCHINI, N.M., GARCÍA, Y.S., JARRET, R., DAVIÑA, J.R., DUCASSE, D.A., BARBOZA, G.E., EHRENDORFER, F. The Evolution of Chili Peppers (*Capsicum – Solanaceae*): a Cytogenetic Perspective. **Acta Horticulturae**, 745: 137-169, 2007.

MOSES, M.; UMAHARAN, P.; DAYANANDAN, S. Microsatellite based analysis of the genetic structure and diversity of *Capsicum chinense* in the Neotropics. **Genetic Resource Crop. Evolution** 2014, 61, 741–755.

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

NEITZKE, Raquel. **Recursos genéticos de pimentas do gênero *Capsicum* – explorando a multiplicidade de usos**. 2012. 115f (Tese doutorado) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

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

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

OLMSTEAD, R.G. et al. A molecular phylogeny of the Solanaceae. **Taxon**, v. 57, n. 4, p. 1159-1181, 2008.

PANORAMA RURAL. Pimenta - um mundo de cores e sabores. **Panorama Rural**, ano VII, n. 84, janeiro de 2006. p. 30-35.

PARAN, I., AFTERGOOT, E., SHIFRISS, C. (1998) Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. **Euphytica**, 99:167-173.

PATERSON, A.H. (1996) Making genetic maps. In: Paterson AH, editor. Genome mapping in plants: R.G. Landes Company; p. 23–39.

PENG, J.; KOROL, A. B; FAHIMA, T.; RÖDER, M. S.; RONIN, Y. I.; LI, Y. C.; NEVO, E. Molecular genetic maps in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: 85 genome-wide coverage, massive negative interference, and putative quasilinear linkage. **Genome Research**, v. 10, n. 10, p. 1509-1531, 2000.

PICKERSGILL, B., HEISER, C.B., MCNEILL, J. (1979) Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. **Academic, London**. p. 679-700.

PICKERSGILL, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. (eds.) **Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B**, Amsterdam: Elsevier. p.139-160.

PICKERSGILL, B. (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, 96: 29-133.

POWIS, T. G.; GALLAGA MURRIETA, E.; LESURE, R.; LOPEZ BRAVO, R.; GRIVETTI, L.; KUCERA, H.; GAIKWAD, N. W. Prehispanic use of chili peppers in chiapas, Mexico. **Plos One**, v.8, n.11, p.1-10, 2013.

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

PRESTES, A.M.; GOULART, L. R. (1995). Transferência de resistência a doenças de espécies silvestres para espécies cultivadas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 3: 315-363.

QIN, C. et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. **PNAS**, v. 111, n. 14, p. 5135-5140, 2014.

QUIRINO, M.S. **Polimorfismos de sequência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência**. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAHIMI, M.; DEGHANI, H.; RABIEI, B.; TARANG, A. (2012) Multi-trait mapping of QTLs for drought tolerance indices in rice. **Cereal Research** (in Farsi), 2(2):107- 21.

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

RAO, D.C.; MORTON, N.E.; LINDSTEN, J.; HULTEN, M.; YEE, S. A mapping function for man. **Humboldt Heredity**, Basel, v.27, n.2, p.99-104, 1977.

RAO, G.U. and PARAN, I. Polygalacturonase: a candidate gene for the soft flesh and deciduous fruit mutation in *Capsicum*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p.135–141, 2003.

REIFSCHNEIDER, F.I.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. 113p.

REIFSCHNEIDER, Francisco José Becker et al. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. Francisco Reifschneider, Luciano Nass, Gilmar Henz, 2015.

REZENDE, R.K.S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; CHALFUN JUNIOR, A.; TORGA, P.P.; MASETTO, T.E. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.39, p. 2435-2440, 2009.

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

RIBEIRO, C. et al. Embrapa's Capsicum Breeding Program— Looking back ... into the Future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, v. 2, p. 1-26, 2020.

RISCH, N., 1992. Genetic linkage: Interpreting LOD scores. **Science**, v. 255, p. 803–804.

RUFINO, J.L.S., PENTEADO, D.C.S. (2006) **Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta**. Informe agropecuário, 27: 7-15

RUSSO, V.M. (2012) **Peppers: botany, production and uses**. CABI. 280 p.

SCALDAFERRO, M. A. et al. Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v 60, p. 693- 709, 2013.

SCHLOTTERER, C.; TAUZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Res**, v.20, p, 211–215, 1992.

SHARMIN, Afsana et al. Molecular diversity analysis of some chilli (*Capsicum* spp.) genotypes using SSR markers. **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 3, p. 368-379, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SINGH, B. D.; SINGH, A. K. Marker Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. Springer, 447 p., 2015.

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

SINGH, R.J. (2002) **Plant Cytogenetics**. CRC Press. 2^a ed. 463p.

SUITER, K.A.; WENDELL, J.F.; CASE, J.S. Linkage 1: a pascal computer-program for the detection and analysis of genetic-linkage. **Journal of Heredity**, Cary, v.74, n.3, p.203-204, 1983.

STAM, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. **Plant J.**, v. 3, p. 739–744.

STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

TANSKLEY, S.D. ; MEDINA-FILHO, H. ; RICK, C. M. Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in a interspecific backcross of tomamto. **Heredity** 49: 11-25. 1982.

TANKSLEY, S.D.; MILLER, J.; PATERSON, A.; BERNATSKY, R. **Molecular mapping of plant chromossomes**. In: GUSTAFSON, J.P.; APPELS, R. (Eds.). New York: Plenum Press, 1988. p.157-173.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Baltimore, v.132, n.4, p.1141-1160, 1992.

TANSKLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics** v. 27, p.205-233, 1993.

TEWKSBUURY, J.J.; MANCHEGO, C.; HAAK, D.C.; LEVEY, D.J. Where did the chili gets its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, n.3, p.547-564, 2006.

THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, v.191, p.368-370, 1961.

TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

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

VIÑALS, F.N., ORTEGA, R.G., GARCIA, J.C. (1996) **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.

WEIR, B. Genetic data analysis. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 447p.

WOLTERS, P.; POWELL, W.; LABUDAH, E.; SNAPE, J.; HENDERSON, K. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. In: PLANT AND ANIMAL GENOME CONFERENCE, 8.,2000, San Diego **Abstracts...**San Diego: [s.n.], 2000. p.103.

YAMAMOTO, T.; YONEMARU, J.; YANO, M. Towards the understanding of complex traits in rice: substantially or superficially? **DNA research**, v.16, n. 3, p. 141-54, 2009.

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

YAO, Y.; BAN, M.; BRANDLE, J. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. **Genome**, Ottawa, v.42, n.4, p.657- 661,1999.

YAO, H. et al., Molecular characterization of meiotic recombination across the 140-kb multigenic a1-sh2 interval of maize. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 6157–6162, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZENG, Z.B., Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 10972–10976, 1993.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v. 136, n. 4, p. 1457-68, 1994.

ZHONG, Y. et al. High-Throughput SSR Marker Development and the Analysis of Genetic Diversity in *Capsicum frutescens*. **Horticulturae**, v. 7, n. 7, p. 187, 2021.

ZHU, C.; GORE, M.; BUCKLER, E.S.; YU, J. Status and prospects of association mapping in plants. **The plant genom**, v. 1, n.1, p. 5-20, 2008.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE PRIMERS SSR E SNPs PARA MAPEAMENTO EM *Capsicum chinense*

N. Carvalho^{1,2*}, L.R. da Mata², C.S. da C. Ribeiro³, M. de C. Moretzsohn², N.O.S. Souza¹, G.S.C. Buso²

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

²Laboratório de Genética Vegetal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³EMBRAPA Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

*Autor Correspondente: nayaracarvalho87@gmail.com

RESUMO: O gênero *Capsicum* compreende grande variabilidade morfoagronômica e atualmente, a colheita dessas pimentas é essencialmente manual, devido ao difícil desprendimento do fruto da planta de alguns genótipos pertencentes à espécie *C. chinense*, tornando a colheita mais difícil e penosa. O desenvolvimento de cultivares com fácil abscisão de fruto tem sido interesse de programas de melhoramento genético e alguns grupos de pimentas, visando facilitar a colheita manual dos frutos, e também permitir a colheita mecanizada ou semimecanizada. Uma forma de facilitar a seleção é a identificação de marcadores moleculares ligados à característica de interesse, por meio da construção de mapas genéticos. Marcadores microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) têm sido amplamente utilizados como uma eficiente ferramenta na caracterização de acessos e elaboração de mapas genéticos. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o polimorfismo de primers SSR entre dois parentais (*C. chinense*) selecionados contrastantes para característica de abscisão de fruto, CNPH 4337-4 (de fácil abscisão de frutos) e CNPH 40001-1 (de difícil abscisão de frutos), para uso posterior em mapeamento de QTLs. Os locos SSR foram amplificados por meio de reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) e a separação dos fragmentos foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% com revelação em nitrato de prata. Foram testados 478 primers SSR, desenvolvidos para *C. annuum*, dos quais 128 mostraram-se polimórficos, 249 não apresentaram diferenças entre os genótipos e 101 não amplificaram, representando 26,8%, 52,1% e 21,1% dos primers testados, respectivamente. Dos 128 locos polimórficos encontrados, 116 foram marcados com fluorescências e desses, 30

foram utilizados para genotipagem da população segregante F₂, composta por 156 indivíduos, em um analisador automático de DNA ABI 3730. Além disso, foi utilizado um chip Illumina Infinium II[®], contendo 1273 SNPs, desenvolvidos para *Capsicum annuum*. Apenas 7 SNPs foram informativos na população de mapeamento e utilizados para a construção do mapa de ligação. Os dados gerados por ambos os marcadores foram analisados e utilizados na construção de um mapa genético de ligação. O mapa construído teve no total 204,6 cM de tamanho, com média de 22,7 cM, e 37 marcadores distribuídos em nove grupos de ligação, sendo 30 SSRs e sete SNPs. O mapa produzido apresentou baixa cobertura genômica, entretanto, foi informativo para uso em seleção assistida no programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças, sendo necessário mais marcadores a fim de se obter uma maior cobertura genômica e maior precisão.

Palavras Chave: SSR; SNP; Abscisão de frutos; *Capsicum chinense*; Mapa de ligação.

ABSTRACT: The *Capsicum* genus comprises great morphoagronomic variability and currently, the harvest of these peppers is essentially manual, due to the difficult detachment of the fruit from the plant of some genotypes belonging to the species *C. chinense*, making the harvest more difficult and painful. The development of cultivars with easy fruit abscission has been interest of genetic breeding programs and some groups of peppers, aiming to facilitate the manual harvest of the fruits, and also to allow the mechanized or semi-mechanized harvest. One way to facilitate selection is the identification of molecular markers linked to the trait of interest, through the construction of genetic maps. Microsatellite markers or Simple Sequence Repeats (SSR) have been widely used as an efficient tool for accession characterization and construction of genetic maps. Thus, the aim of this study was to evaluate the SSR primer polymorphism between two selected parents contrasting for fruit abscission characteristic, CNPH 4337 (easy fruit abscission) and CNPH 40001-1 (difficult fruit abscission), for future use in QTL mapping. SSR loci were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) reactions and fragment separation was performed by 5% polyacrylamide gel electrophoresis and silver nitrate revelation. 478 SSR primers developed for *C. annuum* were screened, of which 128 were polymorphic, 249 showed no differences between genotypes and 101 did not amplify, representing 26.8%, 52.1% and 21.1% of the primers tested, respectively. Of the 128 polymorphic loci found, 116 were labeled with fluorescent dyes and of these, 30 were used for genotyping the F₂ segregating population, composed of 156 individuals, using an automated DNA analyzer ABI 3730. Additionally, an Illumina Infinium II chip containing 1273 SNP markers developed for *Capsicum annuum* was used for genotyping the population. Only seven SNPs were detected on the population and used for the construction of the linkage map. The data generated by both markers were analyzed and used for the construction of a genetic linkage map. The genetic linkage map had a total size of 204.6 cM, with an average of 22.7 cM, with 37 markers distributed in nine linkage groups, being 30 SSRs and seven SNPs. The map produced showed low genomic coverage, however, it was informative for use in marker-assisted selection in the *Capsicum* breeding program of Embrapa Hortaliças, although more markers are needed in order to obtain greater genomic coverage and greater precision.

Keywords: SSR; SNP; Fruit Abscission; *Capsicum chinense*; Linkage map.

INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e compreende uma grande variedade de espécies que podem ou não apresentar pungência que se deve ao acúmulo de capsaicinoides. A espécie *C. chinense* foi originalmente encontrada na bacia amazônica, mas é comercialmente cultivada em todo o Brasil, devido à sua adaptabilidade a diferentes solos e climas. Os frutos desta espécie apresentam uma enorme variabilidade em tamanho e forma, e em diferentes intensidades de amarelo, laranja ou vermelho quando maduros (LANNES et al., 2007).

A fácil abscisão de frutos facilita a colheita manual de frutos, principalmente de grupos de pimenta com frutos pequenos, e pode possibilitar colheitas semimecanizada e/ou mecanizada, e é uma característica de interesse para o melhoramento genético da pimenta. O fruto da pimenta não tem uma camada de abscisão do pecíolo como a do tomate, por exemplo, e a ligação do pedicelo ao fruto pode ser muito forte em algumas cultivares. Muitas vezes, há rompimento do fruto e/ou considerável quebra na colheita manual causando queimaduras nas mãos dos colhedores. No programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças (CNPq), foram selecionados parentais de *C. chinense* contrastantes para essa característica. Uma forma de facilitar a seleção é a identificação de marcadores moleculares ligados à característica de interesse, por meio da construção de mapas genéticos em população F₂, originária de parentais contrastantes para a característica, e avaliação da população F₃ para mapeamento da característica.

Nesse sentido, marcadores microssatélites ou SSRs (Simple Sequence Repeats) e SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) têm sido amplamente utilizados como uma eficiente ferramenta. Com o crescente interesse no uso de marcadores SNPs em estudos moleculares, muitos métodos de genotipagem foram desenvolvidos e uma grande variedade de plataformas tem sido utilizada, incluindo eletroforese em gel, microarrays ou chips, espectrometria de massa, leitores de placas de fluorescência e citometria de fluxo (PARIS et al., 2003; LEE et al., 2004; GIANCOLA et al., 2006 apud. GARCÉS-CLAVER et al., 2007). Plataformas de genotipagem de alta robustez foram desenvolvidas para algumas espécies vegetais e são capazes de analisar simultaneamente centenas ou milhares de marcadores em centenas ou milhares de indivíduos (SINGH & SINGH, 2015), propiciando alta cobertura genômica e gerando grande número de dados que auxiliam na criação de mapas genéticos a exemplo os MicroArrays ou chips de SNPs, que possibilitam a análise simultânea de milhares de marcadores em centenas de acessos, produzindo uma enorme quantidade de dados de modo a auxiliar na criação de

mapas genéticos, na detecção de sequências de interesse, em estudos de caracterização, taxonomia e diversos outros.

Assim, o objetivo desse estudo foi produzir um mapa genético de ligação com análise de população segregante F₂ utilizando marcadores SSRs e SNPs.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

O material obtido para o estudo foi proveniente do Programa de Melhoramento da Embrapa Hortaliças (Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças - CNPH), e consistiu de um acesso híbrido F₁ (CNPH 40.491), obtido por meio de cruzamento de dois genitores contrastantes para abscisão de fruto, CNPH 4337 (com abscisão de fruto fácil) e CNPH 40001-1 (com abscisão de fruto difícil). Também foi utilizada para a análise, a população segregante F₂ composta por 156 indivíduos. O estudo foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Genética Vegetal – LGV, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO E AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS

DNA genômico foi extraído, utilizando-se o protocolo de extração CTAB 2% (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998 – com adaptações). Foram utilizadas folhas das plântulas e essa fase envolveu seis etapas descritas a seguir:

1. Foram utilizados aproximadamente 200 mg de amostras de tecido foliar pesadas em balança de precisão, identificadas e individualizadas em tubos tipo eppendorf com “beads” metálicas. Foram adicionados 700 µL de detergente catiônico CTAB 2% em solução contendo 1,4 M NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0; PVP 1%, responsável pela lise das membranas celulares e 2 µL de β - mercaptoetanol 0,2%, responsável pela inibição da oxidação do material vegetal. A maceração mecânica para a lise das paredes e membranas celulares foi realizada em máquina *Mini beadbeater* (Biospec Products Inc.);

2. Os tubos foram incubados em banho maria a 65° C por aproximadamente uma hora, agitando-os suavemente, de 10 em 10 minutos, para solubilização e homogeneização da solução.

3. Após banho maria, foram adicionados 600 µL de CIA - Solvente orgânico (solução de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados por inversão durante 5 minutos e submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Nessa etapa, a fase orgânica (inferior) contendo parede celular, celulose, lipídeos, proteínas e polissacarídeos foi separada da fase aquosa (superior) contendo DNA e RNA.

4. A fase superior foi retirada com auxílio de pipeta de 200 µL e transferida para outro tubo devidamente identificado. Foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado (-20°C), responsável pela precipitação dos ácidos nucleicos totais, e os tubos ficaram armazenados em freezer - 20°C por uma hora. Após esse período, foi realizada centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, havendo formação do pellet.

5. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não se perder o pellet. O pellet foi lavado com 500 µL de etanol 70% duas vezes e posteriormente com 500 µL de etanol 100% uma vez, e seco em centrífuga a vácuo por 15 minutos.

6. Foram adicionados 50 µL de tampão TE (Tris-EDTA) para ressuspender o pellet e 2µL de RNase (10mg/mL), incubando as amostras em estufa a 37°C por 30 minutos para digestão do RNA, restando apenas o DNA genômico desejado.

QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DO DNA

Para verificar a quantidade e qualidade, o DNA extraído foi quantificado por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. Foi utilizado DNA λ com concentração de 200 e 400 ng (total) como comparativo para o DNA concentrado. A visualização das bandas foi realizada por leitura da intensidade de fluorescência do brometo de etídio sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador e fotografada em fotodocumentador. O brometo de etídio é um corante que se intercala nas moléculas dos ácidos nucleicos sendo que a luz ultravioleta induz a fluorescência.

A diluição do DNA foi feita com água Mili Q, utilizando-se o estimador a seguir para diluição:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Onde:

C1 = Concentração do DNA estimada no gel.

V1= Volume de água a ser adicionado para concentração de trabalho (3ng/µL).

C2 = Concentração do DNA para trabalho (3ng/μL).

V2 = Volume estipulado de DNA para trabalho (200μL).

O DNA diluído foi quantificado em gel de agarose 1% utilizando DNA λ com concentração de 15, 30 e 50 ng (total) como comparativo e os ajustes e requantificação foram feitos quantas vezes necessário até a obtenção da concentração de 3 ng/μL.

Foram utilizados para o screening de microssatélites (seleção dos primers polimórficos) os parentais CNPH 40.001 e CNPH 4337 e o híbrido F₁ CNPH 40.491, resultante desse cruzamento. Para a genotipagem com marcadores moleculares SSR e SNP, foram utilizados 156 acessos da população F₂ provenientes da autofecundação do híbrido F₁, além dos parentais e F₁.

AMPLIFICAÇÃO, SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS E GENOTIPAGEM DE POPULAÇÃO F₂ COM MARCADORES SSR

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por meio de reações de PCR (Polymerase Chain Reaction). Para isso, foram utilizados 3 μL de DNA a aproximadamente 3 ng/μL; 3 μL de primer (oligonucleotídeos desenhados para serem complementares à sequência alvo) a 0,9 μM; e 7 μL de mix contendo 2,65 μL de água; 1,3 μL de dNTPs a 2,5 μM; 1,3 μL de BSA a 2,5 ng/mL; 1,3 μL de tampão 10x (100 μM Tris-HCl pH 8,3; 500 μM KCl; 0,25 μL de MgCl₂ 50 μM) e 0,20 μL de Taq DNA polimerase a 5,0 U/μL totalizando 13 μL de reação.

As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento (otimizada para cada par de primers e variando de 48 a 60°C), e 1 minuto a 72°C, seguidos de um ciclo final de 10 minutos a 72°C, sendo que as PCRs para todos os genótipos foram realizadas em sistemas multiplex com 3 pares de primers.

A separação dos fragmentos obtidos por PCR no *screening* de primers foi realizada por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 5%, coloração com nitrato de prata (AgNO₃) e revelação com carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) (BASSAM et al., 1991), a uma constante de 90 W de potência. O gel de poliacrilamida 5% é constituído por uma malha que separou fragmentos com até 2 a 4 pb de diferença, menores se comparado ao gel de agarose. Dessa forma, optou-se por utilizar essa técnica, devido à sensibilidade e especificidade na separação de macromoléculas. O tamanho dos fragmentos amplificados em pares de base foi avaliado por comparação com marcador de peso molecular Ladder 10pb.

Os primers F e R (forward e reverse) utilizados nesse estudo foram desenvolvidos para *C. annuum* no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (BUSO et al., 2000), constituindo 256 pares de primers (com nomes iniciados por CA seguido de um número). Outros 222 pares de primers (CaCr) também foram utilizados e estão descritos na literatura (CHENG et al., 2016), totalizando 478 primers. Esse total foi testado e otimizado em *screening* (com os genótipos dos dois parentais e do híbrido), e utilizados para genotipagem da população F₂, de acordo com a ocorrência de polimorfismos.

116 primers polimórficos foram marcados com fluorescência e a A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por meio de reações de PCR utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente para seleção de primers. Foram adicionados à reação de PCR pronta 10 µL de uma mistura de Rox + Hidi formamida (100/1000µL) – Referência passiva – e após desnaturação, levada ao sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems), com detecção de fluorescência por meio de capilares e genótipos declarados com o uso do software GeneMapper versão 4.0/4.1. O arredondamento do tamanho dos alelos em pares de bases foi realizado com o uso do software AlleloBin (PRASANTH et al., 2006).

GENOTIPAGEM DE POPULAÇÃO F₂ COM MARCADORES SNP

O DNA genômico extraído dos acessos parentais, F₁ e F₂ foram enviados para a empresa Neogen, onde foram selecionados 1273 SNPs de *Capsicum annuum* do chip de alto rendimento publicado por ASHRAFI et al. (2012) e utilizados em chip multiespécies (com SNP para 27 espécies, entre elas, *C. annuum*) para a genotipagem descrita no presente estudo por meio da tecnologia Illumina Infinium II®.

CONSTRUÇÃO DO MAPA DE LIGAÇÃO

Para a construção do mapa de ligação, dados de ambos os marcadores (SSRs e SNPs) foram utilizados no software JoinMap versão 3.0 (VAN OOLJEN; VOORRIPS, 2001) que permite a análise conjunta de marcadores segregando nas proporções 1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1 e possibilitando a construção de mapas integrados. Esse software implementa um método que calcula uma probabilidade para cada genótipo, dadas as pontuações dos dois marcadores flanqueadores e as distâncias entre marcadores (CHEEMA & DICKS, 2009).

Inicialmente o teste de Qui-quadrado (X²) foi utilizado para testar a hipótese nula de segregação 1:2:1 nos marcadores polimórficos, e marcadores distorcidos que apresentaram

proporções de segregação esperadas com nível de significância $\alpha \geq 0,05$ também foram utilizados para a análise de ligação.

Os parâmetros de análise para o estabelecimento dos grupos de ligação adotados foram: LOD score de 3,0 e fração de recombinação máxima de 0,4. O ordenamento mais provável dos marcadores em cada grupo de ligação foi estimado pelo método de máxima verossimilhança e as frações de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa, centimorgans (cM), usando a função de mapeamento de Kosambi, que leva em consideração a interferência entre eventos de recombinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MARCADORES SSR

Marcadores polimórficos revelam diferenças entre os genótipos para o loco analisado enquanto marcadores monomórficos não apresentam diferenças para o loco em questão. Do total de 478 primers testados em *screening* para os genótipos dos dois parentais (CNPH 4337-4 e CNPH 40001-1) e o híbrido (F₁) CNPH 40.491, 128 apresentaram polimorfismo e o restante não foi informativo, sendo 249 monomórficos e 101 não amplificaram, representando 26,8%, 52,1% e 21,1%, respectivamente (Figura 3).

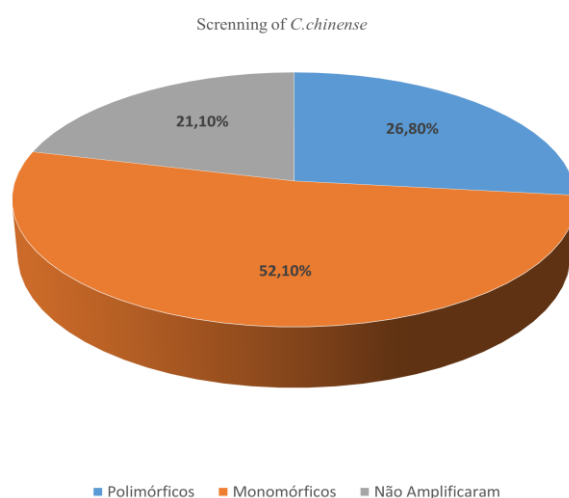


Figura 3: Screening de 478 primers SSR com os genótipos CNPH 4337-4 e CNPH 40001-1 de *C. chinense*.

Dos 128 primers polimórficos, 116 foram marcados com fluorescência e são apresentados na Tabela 1 com suas respectivas sequências (forward e reverse), temperaturas de anelamento otimizadas e fluorescências utilizadas (6-FAM (Azul), HEX (Verde) e NED (Amarela)) pela empresa Life Science Solutions Group para possibilitar a análise simultânea de vários locos (Multiplex) na genotipagem. Esses primers foram escolhidos para marcação por apresentarem maior nitidez na visualização dos tamanhos de fragmentos e foram utilizados em estudo posterior na elaboração de mapa genético de ligação, visando à identificação de marcadores associados à fácil abscisão de frutos com o intuito de implementar a seleção assistida por marcadores no programa de melhoramento genético da Embrapa Hortaliças.

Tabela 1: Lista dos 116 primers SSR polimórficos selecionados em screening. Sequências Forward e Reverse, temperatura de anelamento (Ta) e fluorescência usada para marcação.

PRIMER	FORWARD	REVERSE	Ta (°C)	FLUORES CÊNCIA
Ca10	AAACACGAGAGAGAGAGA	CGAGTGTGGTGAATATGA	56	HEX
Ca11	GTTGTTATCTCCTTTTCCCA	AAATGTTAGGAACCTACCAG	56	6-FAM
Ca26	CGCATATAGGCAGATCAAAT	TGACTCAAATGCTCTCTGAA	58	NED
Ca29	TGGGTAAAGGTACTTAGTAG	GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	56	NED
Ca 36	GGGTAAAGGTACTTAGTAGA	GTTGTATTGCTTTAGCTCAG	56	NED
Ca 44	AAACACGAGAGAGAGAGA	GGTTGACATACTCTTCCT	56	HEX
Ca49	CTATCTTCGCATATAGGCAG	AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	NED
Ca61	GAAGAGTCTACTCAATCTA	CTATATGGTTTCACTCCTTC	56	NED
Ca62	CGCATATAGGCAGATCAAAT	GGTCAGACTACGCTCTCTCA	56	6-FAM
Ca67	CCGAGAAAATGCACACAA	TGACATACTCTTCCTACAGCTA	56	NED
Ca68	TAATAGAAGCCCCGCCCT	ATGCATGAGACTGTTGTTATGGTA	56	NED
Ca71	CTCAAGTGTGCCAGGTGATT	TGCAGGATCAAAGTAGTCATAG	56	NED
Ca73	GCAAGGAGAGAATCAAGGTT	GGAGGTCAAACTTGGATTAG	56	6-FAM
Ca76	GCTAGTCACGTCAATCTGTT	CATTCTCTTCTTCTCAAACG	56	HEX
Ca80	CTCAAGTGTGCCAGGTGATT	GAGAGACAGGAAGAGACGTACA	56	HEX
Ca82	GCACATGCACGTACAACC	GGGGTAAAAGGCATTGTG	56	HEX
Ca87	CCGCTACGTTAGTATGTTAT	AGCCACGACAATCAATAG	56	6-FAM
Ca88	AATGGATGTTCCCTTGCTTT	CAACTGATCAACCATTCCGT	56	HEX
Ca90	AAGGAGGAACAAGAACAACC	ATTGGCAAGCACATGTAACCT	56	HEX
Ca94	ACACAAAATGTCCCCGAA	CCATTGACAAGGACAATTCT	56	NED
Ca95	CGCATATAGGCAGATCAAAT	AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	6-FAM
Ca96	CGCATATAGGCAGATCAAAT	AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	6-FAM
Ca99	TTCGCATATAGGCAGATCAA	AATCTCTGTGGCTGACTCAA	56	HEX
Ca105	CTTCGCATATAGGCAGATCA	GGCTGACTCAAATGCTCTCT	58	6-FAM
Ca106	CGAGGAAGCATTTAATGAGA	CCTAGTCAATTGGATAGTGGG	56	6-FAM
Ca110	GTCCAGTTTATGTTAGTTATT A	TGGTTCCTTGATTTTCATATAG	56	NED
Ca129	GCAAACCTCATAATAGAAGC	AGATACTTCTCTGTTCTCCT	48	HEX

Ca131	AAATGCACACAAAAACAC	AATATGACCACATTTGTG	48	HEX
Ca136	GTGGACTAACAGACTCAACG	CTGATGATGCAGAACATGAT	56	6-FAM
Ca144	TAGAAACACAAAATGTCCCC	CCATTGACAAGGACAATTCT	56	6-FAM
Ca159	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA	ATTGCTTTAGCTCAGAATGG	56	6-FAM
Ca163	ACTCACCAGAAACAGTTAGC	TCTGCTCATATACACCTACA	56	6-FAM
Ca167	CATTCTCTTCTTCTCAAACG	CACGTCAATCTGTTGTGAAA	56	NED
Ca169	CTTTAGCTCAGAATGGTC	TGGGTAAAGGTACTTAGTAG	56	NED
Ca175	CGCATATAGGCAGATCAAAT	GCTGACTCAAATGCTCTCTG	56	6-FAM
Ca178	CCCAACTCATTTAATCCAC	CACGTCAATCTGTTGTGAAA	56	HEX
Ca199	CCGCTACGTTAGTATGTTAT	GATGTAATAATGCATGGTGT	58/60	NED
Ca200	ACAAATCATCCATTTATAGG	GAGTAGTTGTTGCCCTGTATT	56	NED
Ca206	AGTAACTAACTCGAGGAAGC	GGTCATGAGCTCTGTATAAAA	56	HEX
Ca211	CCAGATATGCAGGATCAAAG	CTCAAGTGTGCCAGGTGATT	56	6-FAM
Ca215	GGCTCTTACCATTGACAAGG	ACACAAAATGTCCCCGAA	58	HEX
Ca216	AGAATCTCTGTGGCTGACTC	ATCTTCGCATATAGGCAGAT	56	HEX
Ca221	ACCCACTATATACAGAGA	CTAGTTGTATTGCTTTAG	50	6-FAM
Ca226	GCAGAAAATGGGTAAAGGTA	TTGCTTTAGCTCAGAATGGT	56	HEX
Ca230	CGCATATAGGCAGATCAAAT	CTCAAATGCTCTCTGAACAA	54	NED
Ca243	CATTGTGTATCAGGGCATT	AATGGATGTTCCCTTGCTTT	56	NED
Ca262	TGAGTCTTGCTTTGTTCTGG	GTAAAGGCCGCTCAATCTAC	56	HEX
Ca264	GTTTCACTCCTTCTTTGCTT	AGTTGGTTGATCAGGAATCT	56	6-FAM
CaCr1-2	AGTTTGTTCGATGTGGCTCA	CACCAAGTCTACCTCGCAGA	57	NED
CaCr1-7	TGCAACTAGTATTTCCACCGT	ACTGAATTGACCCATGAAAGCT	56	HEX
CaCr1-10	CAAACACTACCGAACCAAGGCC	ACGAATCGCTTGTTTCAGAAGA	56	HEX
CaCr1-11	TCCACCACATCCTTTCAGCA	GAAATGAAGGCCCGCATCAT	56	HEX
CaCr1-13	TGATGTTTCATTTCGATTGGCAA C	CCTTCGCGGTTATGTTATCGG	56	HEX
CaCr1-14	GTGCCAGCTAAGTGACTACT	GGACTATTGTGCCAGCTAATTAG	56	6-FAM
CaCr1-17	ACAAAGTCAGCAGCAAGTGG	GGGGAATTACTATCAGGATCCGT	56	NED
CaCr2-1	AGCTCGGATTCTAATGGACAC T	AGGGATGACTGTGAGGTTAAGA	56	NED
CaCr2-3	AGCAACAGCAGGAAAACGAA	GCTGTCTGCAAGGGGAGTAT	58	HEX
CaCr2-7	TCGCGCAGGTAGGAATTTTG	GTGGACTACAAAATCTCTCGTTCT	58	NED
CaCr2-13	AATGTGGGATCTTGCAGCAC	CTCATTTGCCCAACTTGCCCT	58	6-FAM
CaCr2-14	ATTGCTTTGCTCCCAATCCC	ACTGGCTTCATCTTTCGCAC	52	6-FAM
CaCr3-2	CAGCACAATAGAATTCAACAT GTGT	TCGACCCACATTCATCTAGCA	56	HEX
CaCr3-6	ACTTATGTGTTTCCAGGTACG G	TTTGAAAATGGCTAGTGTCTCAA	58	6-FAM
CaCr3-7	GCAGATAGGGGAGTTGTGGT	TGACCCCTCCGAGTTTAAACC	58	HEX
CaCr3-10	CTAAGATCTGCACAGCCACG	AGGGGAGTGGCTATACAACA	56	6-FAM
CaCr3-12	TTCAAACACACGACCTTGGG	AGCTATTAAGGCCCGTTGGA	56	NED
CaCr3-13	GGGTGGGTGGGTATGAAGAA	TGGCGGACTAAATAGGGAT	56	NED
CaCr3-14	TAGGAGTGTGGCATTGTGGG	TGTGGCATCTATCTCACCCA	56	6-FAM
CaCr3-19	TGGGGAGTGCTTGTGTGTAA	GATGTAACGTCTGGTGGTGC	58	6-FAM
CaCr4-3	GAAAACCGCTGACTCCATC	AGGGGCGGATATACAGTGTG	56	NED
CaCr4-4	GGACCATGATTATCCCAACAC T	ACAAGGAAAGAGAGATATACG GT	56	NED
CaCr4-5	GAACCTGCCACAAACTCACC	CTGCCCTGCGAGTCGTTAAG	57	6-FAM

CaCr4-7	GCCCATAATAGCAGCTGACG	TAGTCAGGTTGTGCTGCAGT	58	NED
CaCr4-10	ACAGTCCCTATACCACATTCA TTG	CCCCACCCCTTCCCTAAAA	58	HEX
CaCr4-11	GAGACGGACAGTGAAAAGCA	TGGTTCTGAGCCGTAGTTGT	56	HEX
CaCr4-13	CGGGCCATGCTTCTCTAGTA	TTAGAGAGGGTGTACGTGCA	56	6-FAM
CaCr5-5	AGGAAGCGAGCCAATCACTA	TGAGTTTTGATTTGGAGTATGTGTT	54	6-FAM
CaCr5-6	ACAAAGGTGGATAGAGGGGT	GAGACTCGTGTGATAACGTGT	56	NED
CaCr5-8	AACCAAGCTGCCCATACCTA	CATTGGTTGTTTGGACGTCC	56	6-FAM
CaCr5-9	ACCCACACATATATGCGCT	AGATTGCGGCGGATGTATCT	55	NED
CaCr5-12	TTTAGTCCTTAACGGTTTGGTT TT	GCATGTCCCTCAGAATGAAGA	56	HEX
CaCr5-13	TGTACAGATGCGGCAACATT	TCTTCCTCCACTTTGTTCTCCT	56	NED
CaCr5-14	AGGAAGGCTGGTGTAGAGTT	GGTGCCACATCATCCTTGTC	56	HEX
CaCr5-15	TATGTCGGTCAGTGACAAG	AGATGTGATAGGGGAAGCTTGT	56	6-FAM
CaCr6-13	TGACCTCCCTCTCTCTCC	TGCATGCACCATAACATCGTG	56	NED
CaCr6-14	CTGCTTCTTCCCTGGCTTCC	GTGTGTTGCTATGCTCGAGG	60	HEX
CaCr6-17	GCCTAGTGACGAGCCTTTTG	GCGAAGGACACTCACTCATG	58	HEX
CaCr7-2	TGGCATCTCTTCATGTCACT	GATGATCAAGCCACCACCAC	56	NED
CaCr7-5	TCTTGGGCGCTTCTTTCAAC	GGGCTGAATTGTAGGGAGGT	60	NED
CaCr7-6	TGTGGATCCTTTGCCCTTTT	CTTAGCCAGTCCCGTGATGC	56	NED
CaCr7-9	ATGCTAAGGTGTCTCTCGGG	GTAATGGACCAGACACCCT	58	HEX
CaCr7-11	TGCTTCTACAGTATTTTGACG TGT	AGTGGTAGGAGCAGTTGTGT	58	HEX
CaCr7-15	ACCATCATTCTTTAGATCC CAC	TGGCTACATCACTACCAAGCT	56	NED
CaCr8-1	AGGTAAGAGGTAGTGAGCAT TGT	CGGTACAAAAGGGGACAAA	58	6-FAM
CaCr8-4	TCATGTTTGCAGGCTTTGGG	TACCAATCGTAGGGGTGCAG	58	HEX
CaCr8-7	AGTGACACCATGCAAGACCT	TGTTCCCTTCGATGGGTGAAC	56	6-FAM
CaCr8-8	GCACAATTACCTATGTGTCCC T	AAAGTTGAGGGGAGAAAAGGAA	60	6-FAM
CaCr8-19	TGGCGGATCTACACATGGTT	TCGTTATCTACAGTGGCGGA	56	HEX
CaCr9-1	GGCCGACCTAACATCAATCG	AACTCGCTCATTTAACGCCT	56	6-FAM
CaCr9-2	CGGAGAGTAATAGGACCTCGT	CCTGGTGATGCTTTGCTTGT	55	NED
CaCr9-5	TGGATGCCATTGTTTGTGAGA	AGGTTAGCAATGGGAGAGGT	62	HEX
CaCr9-7	AGTCAAGTCTTCGATCGGGG	GGGTGTGTTTGGAAAGAAGACA	56	HEX
CaCr9-12	CACTCCGTCTCGAACCTAA	ACGAACATGCAGTCCACAGT	58	6-FAM
CaCr9-16	TCTCTTGAAGTGACAGAAAAC GA	GCGGAGACAAGTGAAAAGCAA	56	NED
CaCr9-20	TCGCTGATGTAGATCCATGAA C	TCGACCTGACTCAAACCACA	56	6-FAM
CaCr10-1	AGGCCCATGTTAAGTTCGGA	TGACCCACTTGATGATTTTCGTC	56	6-FAM
CaCr10-3	GCTTCCTTCAACCTACTGCG	AGAACCTCGGCTCAATGACA	56	6-FAM
CaCr10-8	ACTGCCGTCAAAGAAATCCC	AGTCACCTACATCAACGCCA	60	NED
CaCr10-12	CCCCAAGGTTAGTTTTCTCCT	ACGGGAGAACTTTGCATCAC	50	NED
CaCr10-19	CCACCACCCTTCAAATTAGCA	CACTGTGCATGGTGTTCGAA	58	HEX
CaCr10-22	CCTTCCAACAACCCTGCAAA	CTGCATTGAGTGGTTCGTTGA	50	HEX
CaCr11-16	TTCCACCAACATGCTTCGTG	GCTACCCTTTGCATGAACCC	56	6-FAM
CaCr12-3	TCCCTCAAACCTGACGTGGAA	CACCACCACCATTAACACCG	58	6-FAM
CaCr12-5	GTTAGCTGCACGAATCGAGG	TGGATGGTATTGATGGCCTTG	58	HEX

CaCr12-7	AGTTTTTCAGGTGATTCGTTTG AGA	TGCAACACCACTTCTTGCTC	58	6-FAM
CaCr12-9	TCCACCATCAATCCAGCCAT	GGCATCGAGGTAGGCTTCTA	58	NED
CaCr12-13	TCAGGGTTAAAGCACTCCGA	TTTTGTGGATTGCTCACCCA	56	HEX

Dos 116 marcadores SSR polimórficos relatados anteriormente, 34 foram utilizados para genotipagem da população F₂ e desses, 30 mapearam (Tabela 2).

Tabela 2: Lista dos 30 primers SSR utilizados na elaboração de mapa genético de ligação de *Capsicum chinense*.

PRIMER	CROMOSSOMO	POSIÇÃO
Ca10	1	21.006
Ca26	3	12.725
Ca29	4	7.219
Ca 36	4	18.823
Ca49	3	9.421
Ca61	2	0.000
Ca62	3	0.000
Ca67	1	21.931
Ca71	1	14.477
Ca76	1	9.070
Ca80	1	10.872
Ca87	5	3.680
Ca88	9	0.000
Ca94	1	26.349
Ca95	3	22.039
Ca96	3	25.724
Ca99	3	32.754
Ca105	3	27.996
Ca106	9	0.327
Ca110	4	0.000
Ca136	6	0.000
Ca144	1	24.673
Ca159	4	10.204
Ca167	1	0.000
Ca169	3	35.111
Ca199	5	0.000
Ca211	1	10.115
Ca216	3	26.835
Ca226	4	8.904
Ca264	2	45.841

MARCADORES SNP

Dos 1273 SNP genotipados, apenas 10 segregaram e 7 mapearam (Tabela 3) sendo que o restante não foi informativo (monomórficos). Uma possível justificativa para a proporção de marcadores informativos apresentada pode se encontrar no fato de que o genoma de referência utilizado no chip para genotipagem foi de *C. annuum*, espécie do mesmo gênero de *C. chinense*, mas pertencente a um grupo distinto em sua taxonomia. Hasan et al. (2021) relatam haver maior taxa de mutação em marcadores SNPs comparados com SSR. A baixa taxa de segregação dos marcadores SNPs utilizados nesse estudo pode indicar também alta similaridade genética dos acessos parentais, o que não parece provável, já que houve polimorfismo dos marcadores SSR Garces-Claver et al. (2007) relataram que a abundância e estabilidade em sistemas de genotipagem de alto rendimento que empregam SNPs oferecem impressões digitais e mapeamento aprimorados, bem como análises filogenéticas confiáveis e novos esquemas de ensaio para programas de melhoramento.

Tabela 3: Lista dos 7 marcadores SNP utilizados na elaboração de mapa genético de ligação de *Capsicum chinense*.

SNP	GRUPO DE LIGAÇÃO	POSIÇÃO
EMB-214294-TC	5	18.149
EMB-213721-TC	6	17.092
EMB-214792-AG	7	0.000
EMB-214794-TG	7	0.000
EMB-214793-TG	7	0.000
EMB-212011-TC	8	0.000
EMB-215985-AC	8	42.922

MAPA GENÉTICO DE LIGAÇÃO

A etapa de identificação de marcadores de DNA que revelam diferenças entre os pais (ou seja, marcadores polimórficos) é crítica na construção de um mapa genético de ligação. Lamas (2010) afirmou que para a construção de mapas genéticos é necessário que os genitores da população sejam contrastantes para a característica que se pretende estudar, e que apresentem uma distância genética mínima para que possam ser identificados marcadores polimórficos para

a construção do mapa. Em geral, as espécies de polinização cruzada possuem níveis mais elevados de polimorfismo de DNA em comparação com espécies autógamas (ANDERSON et al., 1993; COLLARD et al., 2003; JOSHI & NGUYEN, 1993; YU & NGUYEN, 1994). Os parentais selecionados nesse estudo, CNPH 4337 (com abscisão de fruto fácil) e CNPH 40001-1 (com abscisão de fruto difícil), eram completamente contrastantes para a característica de abscisão de fruto apesar de terem apresentado uma proporção de SNPs genotipados/mapeados muito pequena na população F₂ segregante, o que poderia indicar uma grande similaridade genética para outras características, mas a causa mais provável é o fato dos marcadores terem sido desenvolvidos para outra espécie.

O mapa genético de ligação construído apresentou um total de 204,6 cM de tamanho, com tamanho médio de 22,7 cM entre marcadores adjacentes, com 37 marcadores distribuídos em 9 grupos de ligação dos quais, 30 são SSRs e 7 SNPs (Tabela 4; Figura 4). Estima-se que o comprimento do mapa total da pimenta esteja entre 1.245 cM e 2.028 cM, de acordo com relatórios anteriores (LIVINGSTONE et al. 1999; BEN CHAIM et al. 2001; KANG et al. 2001; LEFEBVRE et al. 2002; LEE et al. 2004b apud. MINAMIYAMA et al., 2006). Dessa forma, a cobertura genômica no presente estudo não se mostrou satisfatória, sendo necessária a utilização de mais marcadores.

Mapas para *Capsicum* com altas coberturas genômicas estão descritos na literatura, a exemplos: KANG et al. (2001) que construíram um mapa de ligação de *Capsicum* spp. em uma população F₂ interespecífica (*C. annuum* X *C. chinense*) de 107 plantas com 150 marcadores RFLP e 430 AFLP, resultando em 16 grupos de ligação cobrindo 1.320 cM com uma distância média de 7,5 cM entre marcadores. WU et al. (2009) criaram mapa genético de ligação denominado P1-12, onde todos os marcadores analisados foram alocados em 12 grupos de ligação correspondendo aos 12 cromossomos descritos para *Capsicum* spp., com base em marcadores ortólogos que já estavam mapeados no genoma do tomate - denominados conjuntos ortólogos conservados ou marcadores COSII (Wu et al. 2006) com fácil reprodutibilidade por PCR, que representam genes de cópia única conservados nas famílias Solanaceae e Rubiaceae e estão ancorados diretamente no genoma de *Arabidopsis* (Wu et al. 2006).

Posteriormente, SUGITA et al. (2013) que mapearam 597 marcadores SSR, usando linhagem duplo-haplóides (DH) derivadas de um cruzamento intraespecífico de duas linhagens puras de *C. annuum* designado como mapa KL-DH, que consistiu em 12 grupos de ligação, com tamanho de 2.028 cM e distância média entre os marcadores inferior a 4 cM. Esse mapa foi comparado com o mapa P1-12, que foi derivado de uma população F₂ interespecífica

(*C. frutescens* × *C. annuum*), usando sequências cromossômicas do tomate (*Solanum lycopersicum*) para fazer a ponte entre os dois mapas. Os mapas em questão foram semelhantes em comprimento de mapa e distribuição de marcadores.

Tabela 4: Marcadores mapeados e posição em cada grupo de ligação.

Marcador	Grupo de ligação	Posição
CA 167	1	0.000
CA 176	1	9.070
CA 211	1	10.115
CA 80	1	10.872
CA 71	1	14.477
CA 10	1	21.006
CA 67	1	21.931
CA 144	1	24.673
CA 94	1	26.349
CA 61	2	0.000
CA 264	2	45.841
CA 62	3	0.000
CA 49	3	9.421
CA 26	3	12.725
CA 95	3	22.039
CA 96	3	25.724
CA 216	3	26.835
CA 105	3	27.996
CA 99	3	32.754
CA 169	3	35.111
CA 110	4	0.000
CA 29	4	7.219
CA 226	4	8.904
CA 159	4	10.204
CA 36	4	18.823
CA 199	5	0.000
CA 87	5	3.680
EMB 214294-TC	5	18.149
CA 136	6	0.000
EMB 213721-TC	6	17.092
EMB 214792-AG	7	0.000
EMB 214794-TG	7	0.000
EMB 214793-TG	7	0.000
EMB 212011-TC	8	0.000
EMB 215985-AC	8	42.922
CA 88	9	0.000
CA 106	9	0.327
TOTAL	-	204.614

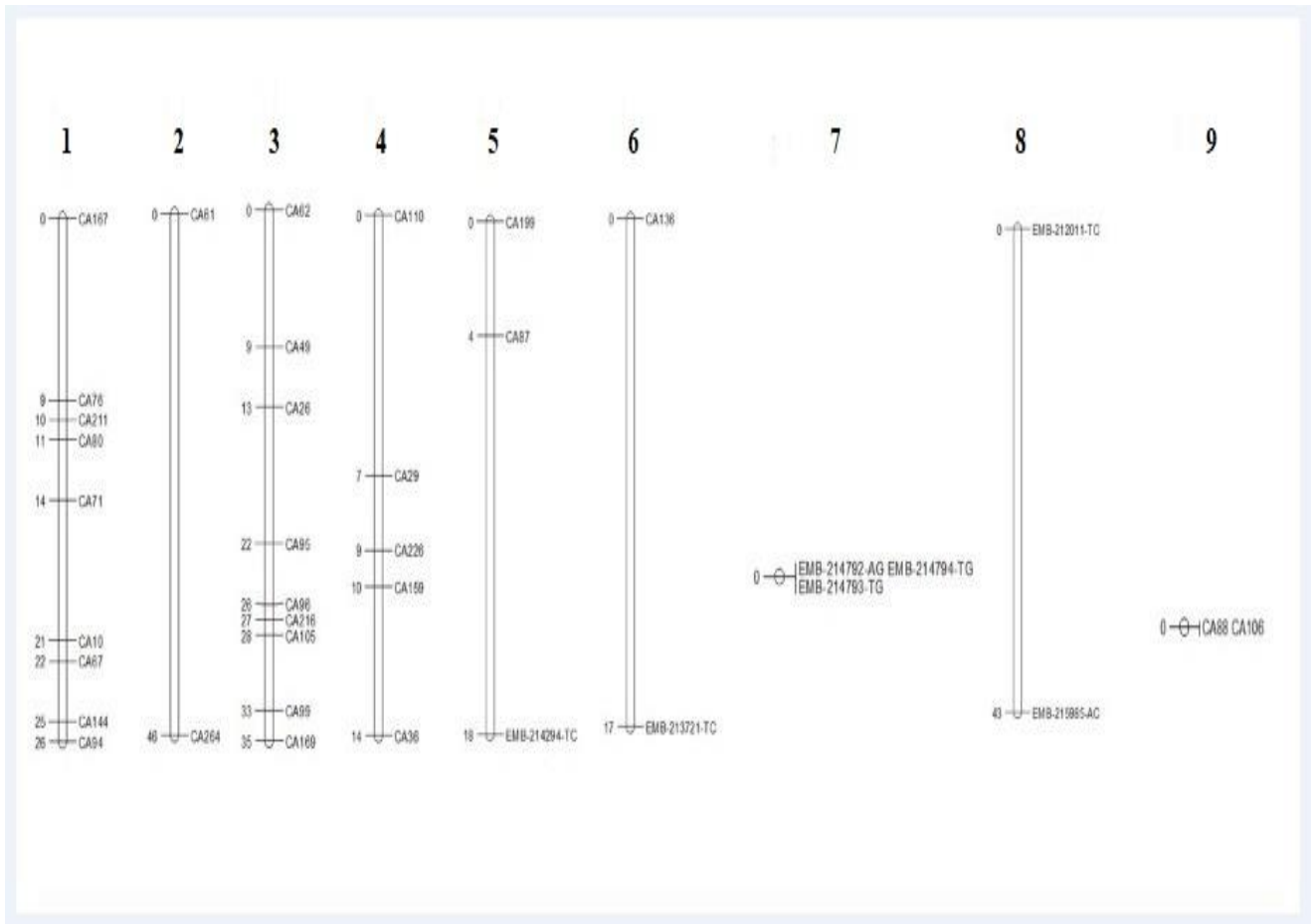


Figura 4: Mapa genético de ligação para *Capsicum chinense* gerado pela análise de 156 plantas F_2 , resultante do cruzamento entre CNPH 40.001 e CNPH 4337-4, com marcadores SSR e SNP.

O ordenamento dos marcadores no software JoinMap é realizado em 3 fases, em que a primeira é mais rígida, levando em consideração desvios estatísticos padronizados e a última fase sendo menos precisa levando em consideração alguns desvios de forma a incluir mais marcadores no mapa. Dessa forma, a terceira fase de ordenamento de cada grupo foi escolhida já que dispúnhamos de poucos marcadores no processo de construção do mapa. Cheema & Dicks (2009) acreditam firmemente que a estimativa de mapas é um processo iterativo, onde os pesquisadores devem primeiro entender o padrão global de seu conjunto de dados antes de reavaliar e revisar o agrupamento e a ordenação dos marcadores.

A precisão da medição da distância genética entre os marcadores e da determinação da ordem dos mesmos está diretamente relacionado ao número de indivíduos estudados na população de mapeamento, sendo indicados de 50-250 indivíduos (COLLARD et al., 2005). No presente estudo, foram utilizados 156 indivíduos F_2 , sendo que para mapas de alta resolução, um número maior de indivíduos seria mais adequado.

Cinco espécies de *Capsicum* foram domesticadas nos trópicos americanos, mas os programas de melhoramento se concentraram nas cultivares não pungentes de *C. annuum* (PICKERSGILL 1997). A maioria dos mapas publicados para *Capsicum* envolvem a espécie *C. annuum*, que é a mais importante do ponto de vista produtivo e econômico. Minamiyama et al. (2006) construíram o mapa SNU2 para *C. annuum* a partir de população duplo haploide, com 374 marcadores, incluindo 106 novos SSR desenvolvidos no mesmo estudo, AFLP, CAPS e RAPD, distribuídos em 13 grupos de ligação e com 1042 cM de tamanho total e média de 2,8 cM entre marcadores, entretanto, utilizaram como parâmetro um LOD de 6,5, bastante superior ao que é usualmente descrito (3). Paran et al. (2004) construíram um mapa genético de ligação integrado a partir de 6 mapas já publicados, todos de progênies distintas envolvendo *C. annuum* e *C. chinense*, e consistindo de 2262 marcadores (AFLP, RFLP, Genes, isoenzimas e marcadores morfológicos já conhecidos) cobrindo 1832 cM, e constataram 320 marcadores âncoras (comuns em pelo menos dois mapas individuais). Barchi et al. (2007) elaboraram mapa de ligação intraespecífico de alta resolução em *Capsicum annuum*, a partir de população de 297 linhagens recombinantes. Um conjunto de 587 marcadores, incluindo RAPD, RFLP e SSR foram utilizados na construção do mapa, sendo que destes, 489 foram agrupados em 49 grupos de ligação. A estrutura do mapa cobriu 1857 cM com uma distância média entre marcadores de 5,71 cM.

Dessa forma, é importante acrescentar maior cobertura genômica no presente mapa com a utilização de mais marcadores moleculares já descritos e identificados na seleção de primers descritos nesse estudo.

CONCLUSÃO

Foi produzido mapa genético de ligação com 204,6 cM de tamanho e tamanho médio de 22,7 cM entre marcadores adjacentes, a partir de 37 marcadores distribuídos em 9 grupos de ligação dos quais, 30 são SSRs e 7 SNPs.

Marcadores SSRs foram mais informativos do que SNPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J., et al. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome** v.36, p. 181–186, 1993.

ASHRAFI, H. et al. De novo assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): a benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2012.

BARCHI, Lorenzo et al. A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. **Genome**, v. 50, n. 1, p. 51-60, 2007.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991.

BEN CHAIM, A.; GRUBE, R.C.; LAPIDOT, M.; JAHN, M. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p.1213–1220, 2001.

BUSO, G.S.C (2005). **Marcadores moleculares e análise filogenética**. In: Marcadores moleculares, análise filogenética e Utilização de DNA na análise filogenética (Buso GSC, eds.). Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília.

BUSO, G.S.C, et. al Novel and highly informative Capsicum SSR markers and their cross-species transferability. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-13, 2016.

CARVALHO, S. I. C. Estudos filogenéticos e de diversidade em *Capsicum* e sua aplicação na conservação e uso de recursos genéticos das espécies *C. frutescens* e *C. chinense*. **Embrapa Cerrados-Tese/dissertação (ALICE)**, 2014.

CHEEMA, J.; DICKS, Jo. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. **Briefings in bioinformatics**, v. 10, n. 6, p. 595-608, 2009.

CHENG, J. et al. A comprehensive characterization of simple sequence repeats in pepper genomes provides valuable resources for marker development in *Capsicum*. **Scientific reports**, v. 6, p. 18919, 2016.

COLLARD, B.C.Y., et al. Selection of wild *Cicer* accessions for the generation of mapping populations segregating for resistance to ascochyta blight. **Euphytica** v. 130, p. 1–9, 2003.

COLLARD, B.; JAHUFER, M.; BROUWER, J.; PANG, E. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n 1-2, p. 169-96, 2005.

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

GANAL, Martin W.; ALTMANN, Thomas; RÖDER, Marion S. SNP identification in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 211-217, 2009.

GARCÉS-CLAVER, A. et al. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in *Capsicum* spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, n. 7, p. 907-916, 2007.

GIANCOLA, S. et al. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, n. 6, p. 1115-1124, 2006.

GUPTA, P.; VARSHNEY, R.K.; SHARMA, P.; RAMESH, B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. **Plant Breeding**, v.118, p. 369-90, 1999.

HASAN, N. et al. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-26, 2021.

JOSHI, C. & H. NGUYEN, RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. **Plant Science**, v. 93, p. 95–103, 1993.

KANG, B. C. et al. An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 4, p. 531-539, 2001.

LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, E.E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, v.1, p.174-181, 1987.

LAMAS, Natalia da Silva. Desenvolvimento, caracterização e uso de marcadores microssatélites no mapeamento genético de características agronômicas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.). 2010.

LANNES, S.M.; FINGER, F.L.; SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**. Issue 3, p. 266-270.

LEE, S.-H. et al. Comparison of four flow cytometric SNP detection assays and their use in plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110, n. 1, p. 167-174, 2004.

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

LEFEBVRE, V.; PALLOIX, A.; CARANTA, C.; POCHARD, E. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled haploid progenies. **Genome**, v. 38, p.112–121, 1995.

LIVINGSTONE, K.D. et al., Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of the genome structure in the Solanaceae. **Genetics**, v. 152, p.1183–1202, 1999.

MINAMIYAMA, Y.; TSURO, M.; HIRAI, M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. **Molecular Breeding**, v. 18, n. 2, p. 157-169, 2006.

PARAN, I. et al. An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). **Molecular Breeding**, v. 13, n. 3, p. 251-261, 2004.

PARIS, M. et al. Typing Mlo alleles for powdery mildew resistance in barley by single nucleotide polymorphism analysis using MALDI-ToF mass spectrometry. **Australian journal of agricultural research**, v. 54, n. 12, p. 1343-1349, 2003.

PRASANTH, V. P., et al. AlleloBin: A Program for Allele Binning in Microsatellite Markers. 2006.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, n. 1, p. 129-133, 1997.

SINGH, B. D.; SINGH, A. K. Marker Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. **Springer**, 447 p., 2015.

SMITH, P.G. Deciduous ripe fruit character in peppers. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v. 57, p. 343–344, 1951.

SUGITA, T. et al. Development of simple sequence repeat markers and construction of a high-density linkage map of *Capsicum annuum*. **Molecular Breeding**, v. 31, n. 4, p. 909-920, 2013.

VAN OOIJEN, J. W.; VOORRIPS, R. E. JoinMap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. P. R. International, Wageningen, The Netherlands., 2001.

WU, F. et al. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. **Theoretical and applied genetics**, v. 118, n. 7, p. 1279-1293, 2009.

YU, L.-X. & H. NGUYEN, Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 87, p. 668–672, 1994.

CAPÍTULO 2

Mapeamento de QTL relacionado à facilidade de abscisão de fruto em *Capsicum chinense*

N. Carvalho^{1,2*}, L.R. da Mata², C.S. da C. Ribeiro³, M. de C. Moretzsohn², N.O.S. Souza¹, G.S.C. Buso²

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

²Laboratório de Genética Vegetal, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³EMBRAPA Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

*Autor Correspondente: nayaracarvalho87@gmail.com

RESUMO: O gênero *Capsicum* apresenta grande importância econômica no agronegócio mundial e do Brasil. A pungência é característica de algumas espécies de pimenta e deve-se à presença de alcaloides. Os frutos dessas pimentas não possuem uma camada de abscisão do pedúnculo como a do tomate, em que a ligação fruto-pedúnculo é mais fraca. Dessa forma, muitas vezes há rompimento do fruto e/ou considerável quebra na colheita, que é realizada manualmente. A fácil abscisão de frutos em pimentas desse gênero é uma característica de interesse para o melhoramento genético, facilitando principalmente a colheita manual dos frutos, podendo viabilizar ainda as colheitas semimecanizada e mecanizada e, proporcionando economia de investimentos na fase final do cultivo. Marcadores moleculares têm propiciado estudos de larga escala com análise simultânea de sequências alvo, auxiliando a caracterização de BAGs, correta taxonomia, conservação e seleção assistida, bem como a criação de mapas genéticos e identificação de QTLs associados a características de interesse. Assim, o objetivo desse estudo foi identificar QTLs associados à facilidade de abscisão de fruto em *C. chinense*, por meio de genotipagem de população segregante F₂ com marcadores SSR e SNPs e análise fenotípica de população segregante F₃. Foram selecionados parentais de *C. chinense* contrastantes para essa característica, componentes do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, CNPH 40.001-1 (de difícil abscisão de frutos) e CNPH 4337 (de fácil abscisão de frutos). O híbrido F₁ CNPH 40.491, resultante do cruzamento desses dois parentais, foi autofecundado dando origem a 156 indivíduos F₂ utilizados para construção do mapa genético de ligação (Cap. 1). Cada planta F₂ foi autofecundada, dando origem a três plantas F₃, com

exceção dos genótipos 42, 47, 104 e 127 que não produziram sementes. Portanto, 459 plantas F₃ e nove plantas correspondentes aos parentais e híbrido F₁ (totalizando 468 genótipos) foram avaliadas fenotipicamente para abscisão e firmeza de fruto. Um QTL sugestivo foi identificado, no grupo de ligação 3, com LOD máximo de 3.23. Dessa forma, sugere-se a utilização de mais marcadores para uma melhor cobertura genômica e validação do QTL identificado nesse estudo.

Palavras-Chave: Colheita; Mecanizada; F₂.

ABSTRACT: The genus *Capsicum* has great economic importance in agribusiness worldwide and in Brazil. Pungency is characteristic of some pepper species and is related to the presence of alkaloids. The fruits of these peppers do not have a stem abscission layer like on tomatoes, where the fruit-stem connection is weaker. The fruit often breaks and/or there is a considerable break in the harvest, which is currently carried out manually due to the difficulty of detaching the fruit. In this way, the easy abscission fruits in peppers of this genus becomes a characteristic of interest for genetic breeding, allowing semi-mechanized and mechanized harvesting, providing savings in the final stage of cultivation. Molecular markers have provided large-scale studies with simultaneous analysis of target sequences, helping the characterization of BAGs, correct taxonomy, conservation and assisted selection, as well as the construction of genetic maps and identification of QTLs associated with interest traits. Thus, the aim of this study was to identify QTLs associated with the easy fruit abscission in *C. chinense*, through genotyping of F₂ segregating population with SSR and SNP markers and phenotypic analysis of F₃ segregating population. Parents of *C. chinense* contrasting for this characteristic were selected, components of the breeding program of Embrapa Hortaliças, CNPH 40.001-1 (difficult fruit abscission) and CNPH 4337 (easy fruit abscission). The F₁ hybrid CNPH 40.491 resulting from the crossing between these two parents was selfed, and 156 F₂ individuals were used for the genetic linkage map construction (chapter 1). Each F₂ plant was selfed, giving rise to three F₃ plants, with the exception of genotypes 42, 47, 104 and 127 (which did not produce seeds). Therefore, 459 F₃ plants and nine plants corresponding to the parents and F₁ hybrid (totaling 468 genotypes) were phenotypically evaluated for abscission and fruit firmness. A suggestive QTL was identified in linkage group 3, with highest LOD score of 3.23. Thus, we suggest the use of more markers for better genomic coverage and validation of the QTL identified in the present study.

Key words: Harvest; Mechanized; F₂.

INTRODUÇÃO

Originárias das Américas, as pimentas do gênero *Capsicum* foram introduzidas na Europa, Ásia e África na época das grandes navegações (1492-1600) (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). Hoje apresentam grande importância econômica no agronegócio do Brasil e são comercializadas de diversas formas *in natura*, em molhos, desidratadas ou processadas para temperos, também utilizadas na indústria farmacêutica como fitoterápicos ou em forma de arma não letal (spray de pimenta), além de representarem grande fortalecimento da agricultura familiar.

Os estudos e dados de produção relacionados às pimentas desse gênero geralmente se restringem à espécie *C. annuum* que é a mais difundida e cultivada no Brasil sendo representada principalmente pelos pimentões. Entretanto, variedades de *C. chinense* têm conquistado o mercado brasileiro por apresentarem muitas das pimentas mais pungentes do gênero, com destaque para a considerada mais pungente do mundo na escala scoville com SHU de 2,2 milhões, a Carolina Reaper.

O conhecimento de características morfológicas, anatômicas e genéticas, e sua correlação, contribui significativamente para a correta caracterização e distinção de espécies, o que facilita o gerenciamento de bancos de germoplasma na identificação de duplicatas, e auxilia programas de melhoramento por meio da seleção assistida por marcadores na obtenção de novas cultivares de interesse agrônomico.

A fácil abscisão de frutos de genótipos de diferentes grupos varietais, principalmente pertencentes à espécie *C. chinense* é uma característica de interesse agrônomico na obtenção de novas cultivares, facilitando principalmente a colheita manual, aumentando o rendimento da colheita. A mecanização da colheita de frutos de pimentas também pode ser facilitada com o desenvolvimento de cultivares com fácil abscisão de frutos. A biologia molecular tem avançado bastante nos últimos anos por meio de ferramentas biotecnológicas extremamente robustas e eficientes que possibilitam análises genéticas vegetais de espécies de grande importância econômica. A utilização de marcadores moleculares associados às análises fenotípicas para a identificação de QTLs de interesse são de grande valia na seleção assistida e contribuem para melhor conhecimento da constituição genética de espécies e em estudos de melhoramento genético.

Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi identificar QTLs associados à facilidade de abscisão de fruto em população de pimenta *C. chinense* oriundos do Programa de

Melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças, por meio de genotipagem de população segregante F₂ com marcadores SSR e SNP e análise fenotípica de população segregante F₃.

MATERIAL E MÉTODOS

AValiação Fenotípica da População F₃

MATERIAL VEGETAL

Foram selecionados parentais de *C. chinense* contrastantes para abscisão de fruto e firmeza de polpa, componentes do programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças, CNPH 4337 (fácil abscisão de fruto e polpa macia) e CNPH 40001-1 (difícil abscisão de fruto e polpa firme). O cruzamento desses dois parentais gerou o híbrido (F₁) CNPH 40.491, que foi autofecundado, dando origem a 156 indivíduos F₂. Cada planta da população F₂ foi autofecundada, dando origem a três plantas F₃ de cada um dos 156 indivíduos, com exceção dos indivíduos 42, 47, 104 e 127 (que não geraram sementes autofecundadas e nem de polinização aberta), compondo 459 plantas F₃. Essas plantas, além de três plantas de cada parental e três plantas do híbrido F₁, totalizando 468 plantas avaliadas. Estas foram, foram fenotipadas para abscisão de fruto e firmeza de fruto.

As sementes das plantas utilizadas para a fenotipagem foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Hortaliças, as quais foram germinadas e mantidas em casa de vegetação durante todo o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo.

CONDUÇÃO E MANEJO

A condução, manejo e avaliação fenotípica das plantas de população F₃ foram realizados na casa de vegetação número 5, na área experimental da EMBRAPA Hortaliças, de janeiro a dezembro de 2020.

SEMEADURA:

A semeadura foi realizada em 20 bandejas de 128 células nos dias 06 e 07 de janeiro de 2020 (Figura 5).



Figura 5: Semeadura das plantas utilizadas para fenotipagem – 3 plantas de cada parental (CNPH 40.001 e CNPH 4337), 3 plantas do híbrido F₁ (CNPH 40.491) e 459 plantas da população segregante F₃. Brasília – DF, 2020.

TRANSPLANTIO DE MUDAS:

O transplântio ocorreu em 18/02/2020, para vasos de 10 litros (3 plântulas/vaso), preenchidos com solo esterilizado preparado na Embrapa Hortaliças (Figura 6). Os vasos foram colocados em bancadas na casa de vegetação 5, conforme croquis apresentado na figura 7. O parental CNPH 40.001 e o híbrido F₁ CNPH 40.491 atrasaram a germinação e só foram transplantados na primeira quinzena de março.



Figura 6: Detalhe evidenciando 3 plântulas por vaso no transplante das mudas em vasos de 10 litros e irrigação por gotejamento. Brasília – DF, 2020.

40.578	40.577	40.576	40.575	40.574	40.573	40.572	2	40.579	40.580	40.581	40.582	40.583	40.584	40.585	1
40.571	40.570	40.569	40.568	40.567	40.566	40.565	1	40.586	40.587	40.588	40.589	4337	40.590	40.591	2
Bancada 6								Bancada 7							
40.564	40.563	40.562	40.561	40.560	40.559	40.558	2	40.592	40.593	40.594	40.595	40.596	40.597	40.598	1
40.557	40.556	40.555	40.554	40.553	40.552	40.551	1	40.599	40.600	40.601	40.602	40.603	40.604	40.605	2
Bancada 5								Bancada 8							
40.550	40.549	40.548	40.547	40.546	40.545	40.544	2	40.606	40.607	40.608	40.609	40.610	40.611	40.612	1
40.543	40.542	40.541	40.540	40.539	40.538	40.537	1	40.613	40.614	40.615	40.616	40.617	40.618	40.619	2
Bancada 4								Bancada 9							
40.536	40.535	40.534	40.533	40.531	40.530	40.529	2	40.620	40.621	40.622	40.623	40.624	40.625	40.626	1
40.528	40.527	40.526	40.525	40.524	40.523	40.522	1	40.627	40.628	40.629	40.630	40.631	40.632	40.633	2
Bancada 3								Bancada 10							
40.521	40.520	40.519	40.518	40.517	40.516	40.515	2			40.638	40.651	40.652	40.692	40.695	1
40.514	40.513	40.512	40.511	40.510	40.509	40.508	1	40.707	40.713	40.717	40.743	40.756	40.763	40.766	2
Bancada 2								Bancada 11							
40.507	40.506	40.505	40.504	40.503	40.502	40.501	2						40.491	40.001	1
40.500	40.499	40.498	40.497	40.496	40.495	40.494	1						40.532	40.799	2
Bancada 1								Bancada 12							
PORTA								Casa de vegetação 5							

Figura 7: Croquis de disposição dos genótipos F₃ de *C. chinense* avaliados em casa de vegetação. Brasília – DF, 2020.

ADUBAÇÃO:

A adubação ocorreu uma semana após o transplante com Basacote plus 3M (NPK 16-08-12 - Fertilizante de liberação controlada com grânulos completamente recobertos por um polímero elástico chamado Poligen®. A liberação de seus nutrientes ocorre por processo de difusão). Aproximadamente 2g/vaso. E na segunda quinzena de março, adubação de cobertura com ureia – dosagem de 5 gramas por vaso.

IRRIGAÇÃO:

A irrigação automatizada foi realizada por gotejamento (Figura 6), utilizando-se um controlador de irrigação Gardena T1030, com turno de rega diário, variando de 7 a 12 minutos de duração, acompanhando o crescimento, desenvolvimento e a demanda de água da planta.

CONDUÇÃO:

Na segunda quinzena de março foi realizado o amarrio das plantas em estacas para condução vertical (Figura 8).



Figura 8: Tutoramento das plantas com amarrio em estacas para condução vertical. Brasília – DF, 2020.

APLICAÇÃO DE DEFENSIVOS:

Durante o desenvolvimento das plantas foram realizadas aplicações de químicos preventivos e de controle para mosca-branca e ácaro branco (Vertimec, Applaud e Sivanto Prime).

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

COLETA DE FRUTOS:

Foram coletados e avaliados cinco frutos por planta, de cada uma das três plantas F_3 por vaso, no mesmo estágio de maturação: cor vermelha distribuída uniformemente no fruto; frutos túrgidos (sem apresentar nenhum sinal de murcha) e com aspecto fresco e pedúnculo verde.

Foi utilizada uma tesoura para cortar o pedúnculo do fruto na região de inserção à planta, local indicado na figura 9.



Figura 9: Local de corte do pedúnculo para coleta dos frutos. Brasília – DF, 2020.

Os frutos foram individualizados em saquinhos plásticos devidamente identificados com o código do genótipo F_3 e o número da planta (1, 2 ou 3) (Figura 10), e transportados em caixas de isopor até o local da avaliação, que foi realizada no mesmo dia da coleta, no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

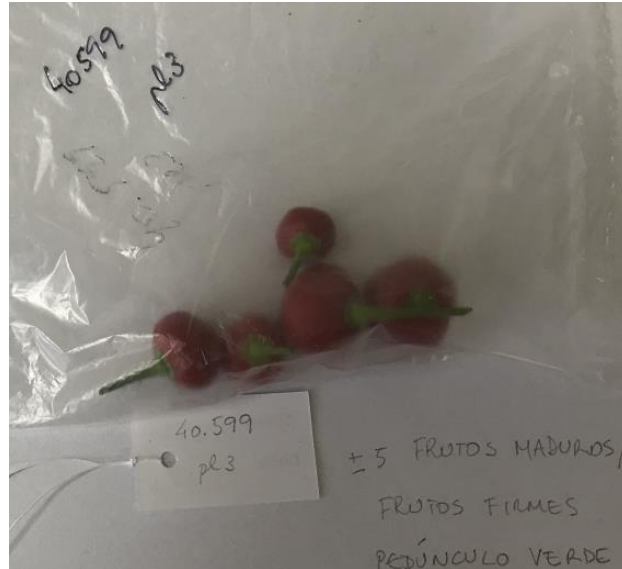


Figura 10: Coleta de frutos para avaliação fenotípica. Brasília – DF, 2020.

Os pedúnculos que se desprenderam dos frutos durante a colheita/transporte foram considerados como sendo de fácil abscisão.

AVALIAÇÃO DE ABCISÃO DE FRUTO:

Para avaliação fenotípica da abscisão dos frutos, levou-se em consideração a força de desprendimento do fruto do pedúnculo. Realizou-se avaliação apenas por um operador, para diminuir a subjetividade (percepção), usando uma escala de notas de 1 a 3, com menor número associado à facilidade de se desprender o fruto do pedúnculo com as próprias mãos (fácil abscisão) (Tabela 5; Figura 11 e 12). Para a “calibração” das mãos do operador, alguns testes foram realizados com os parentais da população, que possuem valores extremos.

Tabela 5: Escala de notas atribuídas para avaliação de abscisão de fruto.

Escala de notas - Abscisão
1 – Fácil
2 – Médio
3 – Difícil



Figura 11: Avaliação de abscisão do fruto por destaque; **i:** Zona de destaque pedúnculo-fruto. Brasília – DF, 2020.

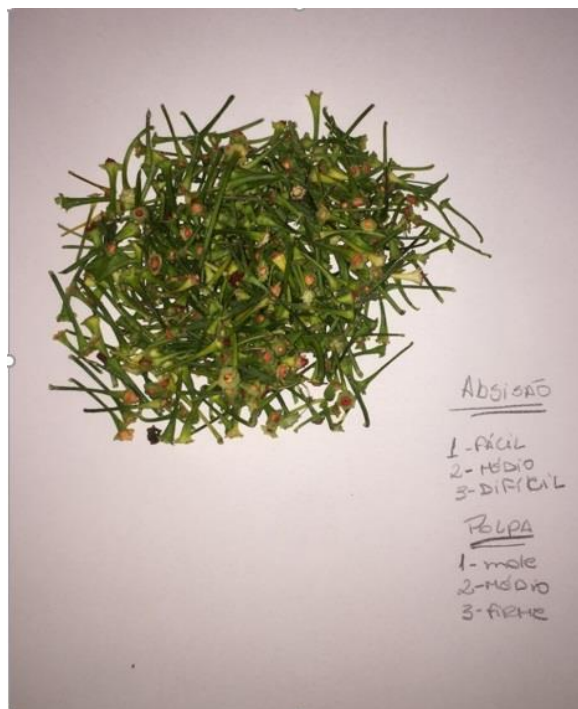


Figura 12: Pedúnculos extraídos na avaliação de abscisão. Brasília – DF, 2020.

AVALIAÇÃO DE FIRMEZA DE FRUTO:

Para avaliação fenotípica da firmeza dos frutos, levou-se em consideração o nível de firmeza ao apertar os frutos entre os dedos polegar e indicador, conforme figura 13. Para a “calibração” das mãos do operador, alguns testes foram realizados com os parentais da população, que são contrastantes também para essa característica. Teoricamente, frutos com polpa mole destacam-se com mais facilidade do pedúnculo. Foi atribuída uma escala de notas de 1 a 3 (Tabela 6), semelhante à avaliação para abscisão, onde o menor número foi associado a frutos com textura mole, e o maior número a frutos com textura firme.



Figura 13: Avaliação de firmeza de fruto. Brasília – DF, 2020.

Tabela 6: Escala de notas atribuídas para avaliação de firmeza de fruto.

Escala de notas – Firmeza
1 – Mole
2 – Médio
3 – Firme

ANÁLISE DE QTLs

O mapeamento de QTLs para característica de abscisão de fruto foi realizado utilizando o mapa de ligação desenvolvido no capítulo 1 desse estudo por meio do software R/qtl (BROMAN et al., 2003). As associações genótipo-fenótipo foram investigadas utilizando análise de intervalo composto por levar em consideração a região entre os marcadores. Os testes de hipótese para presença do QTL foram realizados a cada 1 cM do mapa de ligação (“walk speed” = 1). O limiar experimental foi estabelecido com base em 1.000 permutações (CHURCHILL & DOERGE, 1994) em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características e a metodologia de avaliação fenotípica são subjetivas, de forma que dependem da percepção de força do avaliador. GERSCH (1996) utilizou microscopia eletrônica de varredura para investigar diferenças no tipo de célula e organização celular no receptáculo da fruta (junção com pedúnculo) em dois genótipos de pimenta caiena (*C. annuum*) e encontrou uma região distinta de 15 camadas de células esclerificadas que se estendia da periferia do fruto para o receptáculo, no genótipo de difícil abscisão, contrastando com o genótipo de fácil abscisão que apresentava menos camadas dessas mesmas células. Na metodologia, foi utilizado um medidor de força para medir quantitativamente a abscisão (registrado em kg e convertido em Newtons), método pelo qual a avaliação torna-se menos subjetiva do que o utilizado no presente estudo. A firmeza dos frutos foi avaliada adicionalmente, pois pode estar relacionada à abscisão. Em estudo preliminar com tomate de mesa, Villalon & Bryan (1970) encontraram significância estatística na interação da separação fruto-pedicelo e a maturação.

A abscisão continua sendo uma característica importante nos programas de melhoramento modernos. Pesquisas com tomate identificaram mutações que bloqueiam a formação da zona de abscisão (AZ) no pedicelo, produzindo o fenótipo “jointless” (BUTLER, 1936; RICK, 1967; ROBERTS et al., 2002 apud. ITO, 2015), que provou ser útil em cultivares de tomate industrial. Nessas cultivares, os frutos podem ser colhidos mecanicamente sem o pedicelo e as sépalas, porque, na ausência de um ponto de ruptura no pedicelo AZ, o fruto se desprende próximo ao ponto de ruptura, enquanto o cálice AZ na extremidade proximal do fruto e os órgãos verdes permanecem na planta. Isso reduz o trabalho e tempo necessários para remover o pedicelo e as sépalas durante a colheita (ZAHARA & SCHEUERMAN, 1988 apud. ITO, 2015).

Ainda segundo o levantamento bibliográfico de Ito (2015) se referindo à AZ do tomate, a regulação dessa zona está ligada a estímulos de abortamento de flores e/ou maturação de frutos, como a diminuição da auxina, o aumento de etileno e a presença da enzima poligalacturonase (PG). Portanto, estudos nesse sentido seriam complementares e muito úteis para avaliar a fácil abscisão em *Capsicum* spp. . ESTORNELL et al. (2013) afirmaram que, como nem todas as células que compõem a AZ sofrem dissolução de suas paredes celulares durante a abscisão, a possibilidade de que genes expressos específicos e atividades enzimáticas podem ocorrer nessas regiões. Foi recentemente sugerido que genes associados a células programadas para morte (PCD), remodelação da parede celular e biossíntese de etileno são

expressos assimetricamente dentro da AZ de tomate. Lee & Hutton (2021) utilizaram CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) como ferramenta molecular de edição cultivar de tomate de mesa jointless e obtiveram resultados de produção positivos em ensaios de campo, comparando com duas cultivares de mesa, uma com fenótipo jointless obtida por melhoramento convencional e uma sem o fenótipo jointless.

A possibilidade de se associar o genótipo de plantas F_2 com fenótipos de progênies avaliadas em níveis mais altos de endogamia (F_3 , F_4 etc) foi discutida por Lynch & Walsh (1998) e representa uma alternativa interessante para os casos em que um maior volume de material é necessário para que sejam realizadas as avaliações fenotípicas, como é apresentado nesse estudo, onde foram fenotipados 468 indivíduos. O máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F_2 e marcadores codominantes (STAUB et al., 1996; COLLARD, 2005), já que um indivíduo F_2 fornece duas vezes a informação de um indivíduo retrocruzado pois geralmente carregam dois gametas informativos (LIU, 1998). O mapa genético de ligação gerado no capítulo anterior apresentou um total de 204,614 cM de tamanho, com tamanho médio de 22,7 cM e 37 marcadores distribuídos em 9 grupos de ligação dos quais, 30 SSR e 7 SNPs. Segundo LANDER & KRUGLYAK (1995), o mapeamento baseado em intervalo para se detectar um QTL de interesse deve apresentar distância entre marcadores associados entre 20 e 35cM pois nesse intervalo é provável que ocorra recombinação entre o QTL e os marcadores.

A facilidade de separação do fruto do cálice nas pimentas foi relatada como sendo controlada por um único gene dominante (Smith, 1951). No entanto, nesse trabalho foram observados indivíduos não contrastantes para essa característica, podendo indicar herança poligênica. Como as características avaliadas não apresentaram distribuição normal, os dados foram transformados em binários sendo 1 de fácil abscisão (escala de notas 1 e 2) e 0 de difícil abscisão (escala de notas 3). Usando o nível mínimo de significância estimado pelo programa, que foi de 2,79, um QTL foi detectado no grupo de ligação 3 com LOD máximo de 3,23 (Figura 14). Em termos mais formais, os QTLs podem ser classificados como: (1) sugestivo; (2) significativo; e (3) altamente significativo, classificação essa proposta para “evitar uma enxurrada de alegações de falsos positivos” e também garantir que indícios de ligação não fossem perdidos. QTLs significativos e altamente significativos têm níveis de significância de 5 e 0,1%, respectivamente, enquanto um QTL sugestivo é aquele que seria esperado ocorrer uma vez ao acaso em um estudo de mapeamento de QTL (em outras palavras, há um aviso sobre a confiabilidade de QTLs sugestivos (LANDER & KRUGLYAK, 1995).

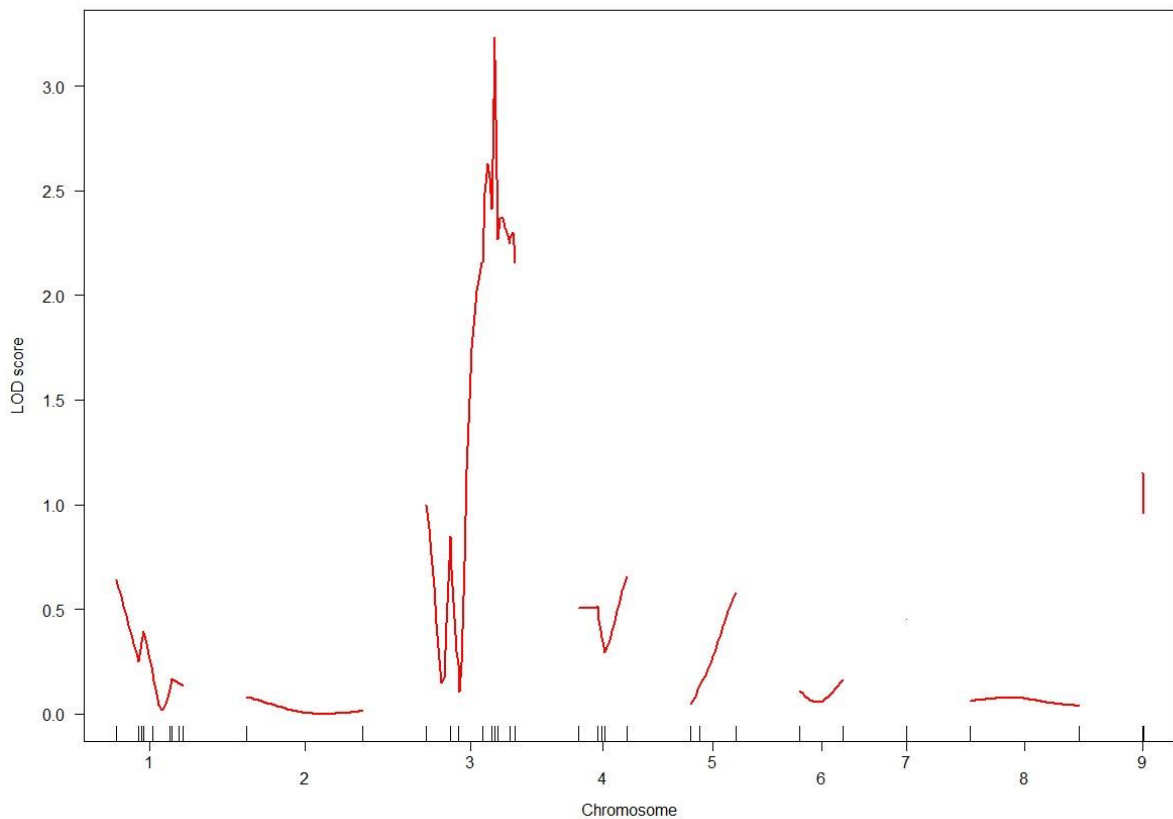


Figura 14: QTL significativo presente no grupo de ligação 3.

Embora a posição mais provável de um QTL seja a posição no mapa em que a pontuação mais alta de LOD é detectado, os QTLs realmente ocorrem dentro de intervalos de confiança. O mais simples é o 'one-LOD intervalo de suporte,' que é determinado encontrando a região em ambos os lados de um pico QTL que corresponde a uma diminuição de 1 LOD (HACKETT, 2002; LANDER & BOTSTEIN, 1989). O 'Bootstrapping' – um método estatístico para reamostragem - é outro método para determinar o intervalo de confiança de QTLs (LIU, 1998; VISSCHER et al.,1996), e pode ser facilmente aplicado dentro de alguns softwares de mapeamento como MapManager QTX (MANLY et al., 2001).

Segundo AVISE (2004), para MAS (seleção assistida por marcadores) são necessários marcadores fortemente ligados, portanto, o gene deve ser mapeado com precisão e alta resolução, sendo que em populações que possuem tipicamente mais de 400 indivíduos, os genes podem ser localizados com resolução inferior a 1 cM. Ao que tudo indica, como os microssatélites se mostraram mais informativos no presente estudo, mais marcadores seriam necessários na genotipagem a fim de se obter uma maior cobertura genômica e maior precisão

do QTL no mapa. Uma análise de correlação mais minuciosa poderia fornecer informações de associação dos marcadores com a característica em questão no presente estudo.

Muitos dos estudos envolvendo identificação de QTLs em pimentas do gênero *Capsicum* são voltadas principalmente para pungência e resistência às viroses, sendo relatadas também características agronômicas de interesse econômico, mas pouquíssimos estudos são relacionados à abscisão de fruto, e quando são, geralmente envolvem apenas avaliação morfológica. GARCÉS-CLAVER et al. (2007) identificaram e validaram um SNP associado à pungência utilizando 29 cultivares pungentes e não pungentes do gênero *Capsicum*. BEM-CHAIM et al. (2006) detectaram seis QTLs controlando o conteúdo de capsaicinoides em três cromossomos por meio de um mapa denso composto de 728 marcadores microssatélites, AFLPs e RFLPs denominado FA03 e construído com populações interespecíficas F₂ (396 indivíduos) e F₃, ambas originadas de cruzamento de *C. annuum* X *C. frutescens*. DWIVEDI et al. (2015) identificaram 10 QTLs em quatro grupos de ligação, todos relacionados a rendimento agronômico em populações F₈ e F₉ intraespecíficas de linhagem recombinante avançada (RIL) utilizando três tipos de marcadores moleculares: SSR, SCAR (sequenced characterized amplified region) e RAPD (random amplified polymorphic DNA).

Mapas comparativos com tomate têm sido estudados e são de grande valia já que avaliam espécies da mesma família. BEM-CHAIM et al. (2001) identificaram um total de 55 QTLs em um mapa comparativo de tomate-pimenta para várias características, incluindo diâmetro e peso do fruto, espessura do pericarpo e diâmetro do pedicelo que foram frequentemente localizados em regiões cromossômicas semelhantes, e, portanto, parecem corresponder a posições de locos que controlam as mesmas características em tomateiro, sugerindo a hipótese de que esses QTLs podem ser ortólogos nas duas espécies. Essa análise foi realizada em uma população F₃ derivada de cruzamento entre dois genótipos de *C. annuum* e utilizando marcadores RFLP, AFLP, RAPD e marcadores morfológicos.

CONCLUSÃO

Foi detectado QTL significativo com 2,79 de nível de significância e LOD máximo de 3,23, no grupo de ligação 3.

Mais marcadores são desejáveis na análise para a validação do QTL encontrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVISE, J.C. Molecular Markers, Natural History, and Evolution: **Sinnauer Kluwer Academic Publishers**, 2004.

BEN-CHAIM, A. et al. QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 6, p. 1016-1028, 2001.

BEN-CHAIM, A. et al. QTL analysis for capsaicinoid content in Capsicum. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 8, p. 1481-1490, 2006.

BUTLER, L. Inherited characters in the tomato. II. Jointless pedicel. **J Hered**, v. 27, p. 25-26, 1936.

BROMAN, Karl W. et al. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. **Bioinformatics**, v. 19, n. 7, p. 889-890, 2003.

COLLARD, Bertrand CY et al. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica**, v. 142, n. 1, p. 169-196, 2005.

ESTORNELL, L. H. et al. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. **Plant Science**, v. 199, p. 48-60, 2013.

GARCÉS-CLAVER, A. et al. Identification, validation and survey of a single nucleotide polymorphism (SNP) associated with pungency in Capsicum spp. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 115, n. 7, p. 907-916, 2007.

GERSCH, K. P Analysis of the Influence of Genotype on Cayenne Pepper Fruit-Receptacle Detachment. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College, 1996.

HACKETT, Christine A. Statistical methods for QTL mapping in cereals. **Plant molecular biology**, v. 48, n. 5, p. 585-599, 2002.

ITO, Y.; NAKANO, T. Development and regulation of pedicel abscission in tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 442, 2015.

LANDER, Eric S.; BOTSTEIN, David. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.

LANDER, E.S. & L. KRUGLYAK, Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nat Genet**, v. 11, p. 241–247, 1995.

LEE, T. G.; HUTTON, S. F. Field Evaluation of CRISPR-Driven Jointless Pedicel Fresh-Market Tomatoes. **Agronomy**, v. 11, n. 10, p. 1957, 2021.

LYNCH, M.; WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland: **Sinauer Associates**, 1998. 978p.

LIU, B.H. Statistical genomics. New York: CRC, 1998. 610p.

LIU, Ben Hui. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. CRC press, 2017.

MANLY, Kenneth F.; CUDMORE JR, Robert H.; MEER, Jane M. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. **Mammalian Genome**, v. 12, n. 12, p. 930-932, 2001.

RICK, C. M. Fruit and pedicel characters derived from Galápagos Tomatoes'. **Economic Botany**, v. 21, n. 2, p. 171-184, 1967.

ROBERTS, J. A.; ELLIOTT, K. A.; GONZALEZ-CARRANZA, Z. H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 131-158, 2002.

SMITH, P.G. 1951. Deciduous ripe fruit character in peppers. **Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.** 57:343–344.

STAUB, J.E, SERQUEN, F.C., GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, Alexandria, v.31, n.5, p.729-740, 1996.

VISSCHER, Peter M.; THOMPSON, Robin; HALEY, Chris S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*, v. 143, n. 2, p. 1013-1020, 1996.

ZAHARA, M. et al. Hand-harvesting jointless vs. jointed-stem tomatoes. *California Agriculture*, v. 42, n. 3, p. 14-14, 1988.

CAPÍTULO 3 - Caracterização morfológica e anatômica do pedúnculo, flor e fruto relacionada à fácil abscisão de frutos em genótipos de *Capsicum chinense* (Solanaceae)

Análise de estruturas Vegetais em *Capsicum chinense*

Artigo publicado:

N. Carvalho, L.R. da Mata, P.G. Ribeiro, A.L. Da C. Moreira, A. S. Pinedo, C.S. da C. Ribeiro, N.O.S. Souza, G.S.C. Buso. Morphological and anatomical characterization of peduncle, flower and fruit related to easy fruit abscission of *Capsicum chinense* (Solanaceae) genotypes. **Genetics and Molecular Research**, v. 20, n.4, p.1-19.

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

²Laboratório de Genética Vegetal, EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, BA, Brasil.

⁴Faculdade de Educação, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

⁵Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁶EMBRAPA Hortaliças, Brasília, DF, Brasil.

*Autor Correspondente: nayaracarvalho87@gmail.com

RESUMO: As espécies de pimentão e pimenta do gênero *Capsicum* são originárias da América, mas hoje eles encontram-se dispersas por todo o mundo. Embora muito apreciadas no mundo e no Brasil, principalmente na região amazônica, existem poucos estudos sobre *C. chinense*. Estudos de caracterização e classificação podem auxiliar no melhoramento genético da cultura da pimenta e no desenvolvimento de novas cultivares com características de interesse agrônomico. A resistência à abscisão dos frutos dificulta a colheita, que hoje é essencialmente manual, de modo que o desenvolvimento de cultivares com fácil abscisão de frutos, permitindo a colheita semimecanizada - e mecanizada, é uma meta importante. Descrições de diferenças genéticas baseadas em caracteres anatômicos são raras neste gênero. Nessa linha, caracteres morfológicos e estruturas anatômicas foram avaliados diretamente relacionadas à fácil abscisão de frutos em *C. chinense*, por meio da avaliação de dois genótipos contrastantes para este caráter, mantidos pelo Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Hortaliças, bem como o híbrido F₁ resultante desse cruzamento. A caracterização morfológica das flores e frutos foi realizada por meio de 13 descritores, sendo oito definidos pelo IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) e cinco adaptados para este estudo. A caracterização anatômica do pedúnculo e das flores foi realizada com a elaboração de lâminas vegetais para examinar estruturas possivelmente ligadas à fácil abscisão do fruto. Polimorfismos morfológicos contrastantes foram observados na cor do fruto imaturo, formato do fruto, posição do fruto na planta, abscisão e firmeza do fruto, e diferenças significativas no diâmetro do fruto, número de lóculos e sementes por lóculo. Pequenas diferenças foram observadas nas estruturas anatômicas do pedúnculo e da flor, como forma do sistema vascular e leve lignificação do periciclo, mas nenhuma foi diretamente relacionada à abscisão dos frutos. Assim, embora não haja relação anatômica com a abscisão dos frutos, os caracteres morfológicos avaliados neste estudo revelaram grande variabilidade genética para os genótipos avaliados, principalmente para esta

característica, demonstrando grande potencial desses genótipos em um programa de melhoramento para o desenvolvimento de variedades com fácil abscisão dos frutos.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*; Abscisão; Morfologia; Anatomia; Flor; Fruto.

ABSTRACT: The sweet and chili pepper species of the genus *Capsicum* are originally from America; however, currently they are grown worldwide. Although widely appreciated, especially in the Amazon region, there have been few studies about *C. chinense*. Characterization and classification studies can aid in pepper crop genetic breeding and development of new cultivars with characteristics of agronomic interest. Resistance to fruit abscission makes harvesting difficult, which today is essentially manual, so that development of cultivars with easy fruit abscission, allowing semi-mechanized and mechanized harvest is an important goal. Descriptions of genetic differences based on anatomical characters are rare in this genus. Along this line, we examined morphological characters and anatomical structures directly related to easy fruit abscission in *C. chinense*, through the evaluation of two genotypes contrasting for this character, maintained by the Embrapa Hortaliças Genetic Breeding Program, as well as an F1 hybrid. The morphological characterization of flowers and fruits was performed using 13 descriptors, eight defined by the International Plant Genetic Resources Institute and five adapted for this study. The anatomical characterization of the peduncle and flowers was carried out with the elaboration of plant slides to examine structures possibly linked to easy abscission of the fruit. Contrasting morphological polymorphisms were observed in immature fruit color, fruit shape, fruit position on the plant, abscission and fruit firmness, as well as fruit diameter, number of locules and seeds per loculus. Small differences were observed in the anatomical structures of peduncle and flower, such as the shape of the vascular system and lignification of the pericycle, but none were directly related to fruit abscission. Although there was no significant anatomical relationship with fruit abscission, the morphological characters evaluated in this study revealed great genetic variability for these genotypes, demonstrating potential of these genotypes in a breeding program for developing varieties with easy fruit abscission.

Key words: *Capsicum chinense*; Abscission; Morphology; Anatomy; Flower; Fruit

INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum* compreende cerca de 31 espécies pertencentes à família Solanaceae, a mesma família botânica do tomate, batata, tabaco e petúnia. São assim denominadas para diferenciá-las da pimenta preta (*P. nigrum*), pimenta rosa (*Schinus molle*) e pimenta jamaicana (*P. officinalis*), todas elas, embora chamadas de pimentas e usadas como condimento, não são intimamente relacionadas entre si e cada uma tem propriedades químicas diferentes (Carvalho et al., 2006). Das espécies do gênero *Capsicum*, cinco são domesticadas (*C. annum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. pubescens*) (Moscone et al., 2007). A crescente demanda por esse produto em suas diversas formas de consumo, aumenta o desenvolvimento agroindustrial, gerando empregos principalmente na agricultura familiar e contribuindo significativamente para a economia do país.

A espécie *Capsicum chinense* foi batizada em homenagem a Nikolaus Joseph von Jacquin (1727-1817), um botânico holandês que erroneamente pensava que essa espécie era originária da China, quando na verdade todas as plantas do gênero *Capsicum* são originárias da América (Bosland & Votava, 1999). Embora muito apreciadas no mundo e no Brasil, principalmente na região amazônica, as fontes de informação e estudos sobre a pimenta *C. chinense* ainda são muito raras (Lannes et al., 2007). Estudos de caracterização morfológica e anatômica podem auxiliar na conservação da diversidade do gênero, que possui grande importância econômica, principalmente para os agricultores familiares, bem como para a produção de cultivares comerciais de interesse, por meio de seleção assistida por marcadores moleculares.

As espécies de *Capsicum* são frequentemente descritas em termos de divergência genética, considerando bancos de dados morfológicos, agronômicos e moleculares. Sudré et al. (2010) relataram que a identificação de espécies do gênero geralmente é realizada por avaliações de caracteres morfológicos, principalmente de flores. No entanto, descrições morfológicas de apenas uma estrutura vegetal não são suficientes para descrever e caracterizar as espécies, de modo que estudos envolvendo análises de diferentes partes da planta são mais informativos.

A Embrapa Hortaliças mantém atualmente um acervo com mais de 2.000 acessos, sendo considerada a maior coleção brasileira de pimenta do gênero *Capsicum* (Embrapa Hortaliças, 2007). Existe uma grande variabilidade que ainda não foi totalmente explorada no gênero, o que representa grande potencial em estudos de melhoramento genético, principalmente no âmbito da caracterização de bancos de germoplasma, identificação de espécies e criação de novas cultivares com características de interesse. Descrições de diferenças genéticas baseadas em caracteres anatômicos são raras (Dias et al., 2013).

O fruto da pimenta pode ter uma forte conexão do pedúnculo com o fruto em algumas cultivares, o que frequentemente faz com que o fruto se quebre na colheita manual. Arancibia et al. (2004) relataram que a presença do pedúnculo e do cálice aderidos aos frutos na colheita conferem cor desbotada e reduzem a qualidade dos molhos. A fácil abscisão dos frutos, além de facilitar a colheita manual dos frutos, favorece as colheitas semimecanizadas e mecanizadas, sendo também uma característica de grande interesse para o beneficiamento da pimenta.

Foram examinadas as estruturas vegetativa (pedúnculo) e reprodutiva (flor e fruto) de dois genótipos: CNPH 4337 (fácil abscisão do fruto do pedúnculo) e CNPH 40.001 (difícil

abscisão do fruto do pedúnculo) selecionados no programa de melhoramento da Embrapa Hortaliças (CNPH), contrastantes para característica de abscisão dos frutos, assim como o híbrido F1 CNPH 40.491, resultante do cruzamento desses genótipos.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Hortaliças (CNPH), as quais foram mantidas em casa de vegetação durante todo o desenvolvimento. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da EMBRAPA Cenargen.

Foram analisados três genótipos de *C. chinense* (Parental CNPH 40.001, CNPH 4337 e CNPH 40.491 híbrido F₁ oriundo do cruzamento CNPH 40.001 X CNPH 4337). Esses genótipos foram coletados no estado do Amazonas (Brasil), em propriedades de pequenos agricultores que os cultivam. Os genótipos foram semeados em bandejas de 72 células preenchidas com substrato comercial Carolina solo, e as mudas transplantadas para vasos de 10 litros preenchidos (três mudas / vaso) com solo esterilizado, e mantidos por gotejamento em sistema automatizado, utilizando-se um controlador de irrigação Gardena T1030, com turno diário de irrigação variando de 7 a 12 minutos de duração, acompanhando o crescimento e desenvolvimento da planta e sua demanda hídrica. O crescimento vertical foi conduzido com estaqueamento. A fertilização foi realizada uma semana após o transplante com NPK16-08-12, 2g / vaso (fertilizante de liberação controlada com grânulos totalmente recobertos por polímero elástico. A liberação de seus nutrientes ocorre por meio de um processo de difusão) e 40 dias após o transplante com uréia (5g / vaso), e a aplicação de defensivos preventivos e de controle, contra ácaros e mosca-branca, foram realizadas mensalmente.

Para a análise morfológica, foram considerados: três flores totalmente abertas de cada uma das três plantas; três frutos imaturos e três frutos maduros de cada uma das três plantas. Para as análises anatômicas, os cortes vegetais foram realizados nos botões florais antes da antese e no pedúnculo do fruto maduro.

MORFOLOGIA

A morfologia foi avaliada por meio de oito descritores morfológicos definidos pelo IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) para o gênero *Capsicum* (IPGRI, 1995) e cinco descritores adaptados para este estudo, totalizando 13 descritores, relacionados à flor e fruto, três quantitativos e dez qualitativos apresentados a seguir:

1) Flores: As flores foram consideradas totalmente abertas na antese.

1. Posição da flor: pendente (3); intermediário (5); ereto (7).

2. Cor da corola: branco (1); amarelo claro (2); amarelo (3); verde-amarelo (4); roxo com base branca (5); branco com base roxa (6); branco com margem roxa (7); roxo (8); outro (9).

3. Número de pétalas por flor.

2) Frutos: Descritores observados no fruto.

4. Cor do fruto no estágio imaturo: verde amarelado (1); verde claro (2); verde médio (3).

5. Cor do fruto no estágio intermediário (antes do amadurecimento): branco (1); amarelo (2); verde (3); laranja (4); roxo (5); roxo profundo (6); outro (7).

6. Cor do fruto maduro: branco (1); amarelo limão (2); amarelo alaranjado pálido (3); amarelo-laranja (4); laranja claro (5); laranja (6); vermelho claro (7); vermelho (8); vermelho escuro (9); violeta (10); castanho (11); preto (12); amarelo (13); amarelo claro (14); salmão (15).

7. Posição do fruto: pendente (3); intermediário (5); ereto (7).

8. Forma do fruto: alongado (1); quase redondo (2); triangular (3); campanular (4); quadrado (5); outro (6).

9. Diâmetro do fruto (cm).

10. Número de lóculos (retirado de 10 frutos, por meio de cortes transversais e longitudinais): (1); (2); (3); (4); (5)

11. Número de sementes por lóculo (contagem manual em cortes transversais e longitudinais).

12. Abscisão - Persistência do fruto maduro em relação ao pedúnculo (força manual): pouco persistente (3); intermediário (5); persistente (7).

13. Firmeza do fruto (percepção manual do nível de firmeza ao apertar a fruta entre os dedos indicador e polegar: macio (1); intermediário (2); firme (3).

ANATOMIA

Os botões florais e frutos foram cortados imediatamente após a coleta à mão livre. Os cortes foram feitos em seções longitudinais da flor em um estágio inicial (botão) e seções perpendiculares do pedúnculo do fruto.

Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 50% (NaClO) [cloro ativo 13%] por aproximadamente 5-10 minutos. Em seguida, a lavagem em água destilada foi realizada por 2-3 minutos. A coloração foi realizada com azul de alcian / safranina (4: 1) por 10-30 segundos, e novamente lavada com água destilada para remover o excesso de corante. Posteriormente, foram desidratados com a seguinte série de álcool: etanol 50% por dois

minutos, seguido de etanol absoluto (98%) por cinco minutos. Em seguida as lâminas permanentes foram montadas com três gotas de verniz vitral (verniz comumente usado no artesanato), onde os cortes foram depositados cuidadosamente, seguidos da lamínula (Paiva et al. 2006; Krauss 1997). As imagens foram registradas em fotomicroscópio associado a microcomputador com sistema de captura de imagens LAS EZ. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico Motic BA300 com câmera digital acoplada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MORFOLOGIA

A **Tabela S1** mostra as características avaliadas, de flor e fruto, para os três genótipos estudados. Variações na posição da flor foram observadas entre os pais, sendo que o genótipo CNPH 40.491 (F1) herdou esta característica do pai CNPH 4337, não havendo variação na cor da corola (pétalas), que apresentou coloração branca para os três genótipos. Uma pequena variação no número de pétalas por flor foi observada apenas no parental CNPH 4337. Wahua et al. (2014) relataram flores pentâmeras e hexâmeras em *C. annuum*.

Os genótipos analisados apresentaram diferenças notáveis na morfologia do fruto, sendo variáveis na cor do fruto imaturo, posição do fruto na planta, forma e diâmetro do fruto, número de lóculos e sementes por lóculo, abscisão e firmeza, e não houve variação da cor dos frutos no estágio intermediário e maduro, que apresentaram as cores laranja e vermelha respectivamente (**Tabela S1**). Costa (2012) identificou seis diferentes cores de frutos em estágio intermediário de maturação e seis maduros com cinco formas de frutos em um estudo com 40 acessos de *Capsicum* spp. e Alves (2009) identificou cinco e sete cores diferentes, respectivamente, apenas em um morfotipo de *C. chinense*. Baba et al. (2016) utilizaram 14 descritores morfológicos de frutos do IPGRI para caracterizar 71 acessos de *C. chinense* do banco genético da Universidade Estadual de Londrina e alguns desses descritores, principalmente a forma dos frutos, foram essenciais para o agrupamento desses acessos.

Teoricamente, frutos com polpa mole se destacam mais facilmente do pedúnculo, segundo Arancibia et al. (2004) é consequência da desintegração do tecido do fruto. Os genótipos CNPH 40.001 e CNPH 4337 apresentaram características contrastantes, principalmente quanto à abscisão e firmeza do fruto, enquanto o híbrido F1 obtido do cruzamento desses dois genótipos herdou do parental CNPH 4337 a fácil abscisão e firmeza dos frutos (**Tabela S1**). De acordo com Fenwick et al. (1996), Errington et al. (1997) e Rao & Paran (2003), a enzima poligalacturonase é um dos ativos mais primordiais, responsável pelo envelhecimento da fruta e amolecimento da parede celular. O papel normal da poligalacturonase é hidrolisar as pectinas presentes na parede celular durante o amadurecimento dos frutos, o que leva ao seu amolecimento, função também demonstrada por Ahmed et al., (2011) utilizando técnicas de RT-PCR e microscopia eletrônica. Assim, a presença da enzima poligalacturonase pode estar diretamente relacionada à firmeza do fruto.

Vilallon et al. (1970) avaliaram a separação fruto-pedicelo de variedades de tomate de mesa para colheita mecanizada, e trouxeram dados preliminares, na época, correlacionando

estágios de maturação, tamanho e formato do fruto e separação do fruto-pedicelo com a colheita mecanizada, e afirmaram que essa última característica foi de grande importância para os estudos de mecanização da colheita. Linhas de tomate com o gene J2 são mais suscetíveis a danos do que aquelas que não possuem esse gene, por isso é extensivamente investigado em estudos que avaliam a correlação do tamanho e forma do fruto com a separação do pedicelo (Vilallon et al., 1970). Em um estudo de correlação genética de *Capsicum*, Setiamihardja et al. (1990) concluíram que os genes para caracteres de frutos parecem ser pleiotrópicos para caracteres de pedicelo e a ação do gene para força de desprendimento do fruto (FDF) foi principalmente aditiva, mas com dominância e epistasia consideráveis. Anikulmar et al. (2019), em um estudo de herança genética para produção de frutos de *C. annuum*, encontraram genes com efeitos apenas aditivos para peso médio de frutos, frutos por planta e produção de frutos verdes por planta a partir de cruzamentos de pais contrastantes para orientação de frutos (ereto / pendentes). Isso ocorre porque os loci que exibem dominância, bem como epistasia, também contribuem para uma variedade de efeitos aditivos. Isso significa que qualquer locus segregante sem dominância, com dominância parcial, total ou sobredominância, contribui para a variância dos efeitos aditivos (Bernardo 2010, 2014). No presente estudo, há presença de dominância nos locos responsáveis pela FDF ou abscisão do fruto do pedúnculo, uma vez que o híbrido F₁ apresentou essa característica igual ao seu parental CNPH 4337 (**Tabela S1**).

TABELA S1: Características morfológicas polimórficas para os três genótipos de *Capsicum chinense* estudados (CNPH 40.001; CNPH 4337; CNPH 40.491).

	CNPH 40.001	CNPH 4337	CNPH 40.491 (F ₁)
Posição da flor	Intermediário (5)	Ereto (7)	Ereto (7)
Cor das pétalas	Branca (1)	Branca (1)	Branca (1)
Número de pétalas por flor	5	5-6	5
Cor do fruto imaturo	Verde amarelado (1)	Verde claro (2)	Verde médio (3)
Cor do fruto em estágio intermediário de maturação	Laranja (4)	Laranja (4)	Laranja (4)
Cor do fruto maduro	Vermelho (8)	Vermelho (8)	Vermelho (8)
Posição do fruto	Pendente (3)	Ereto (7)	Pendente (3)
Forma do fruto	Oval/com bico (6)	Quase redondo (2)	Cilíndrico (6)
Diâmetro do fruto	3,2 – 3,6 cm	0,6 – 0,8 cm	1,9 – 2,2 cm
Número de lóculos	3	5	3
Número de sementes por lóculo	4-6	1-2	1-2
Abscisão do fruto	Persistente (7)	Pouco persistente (3)	Pouco persistente(3)
Firmeza do fruto	Firme (3)	Macio (1)	Macio (1)

O genótipo que apresentou maior diâmetro do fruto foi o parental CNPH 40.001, e o menor foi o CNPH 4337, com o F₁ resultante tendo um diâmetro intermediário em comparação com o dos pais (**Tabela S1**). Setiamihardja et al. (1990) encontraram efeitos aditivos do gene para distribuição contínua do pedicelo e diâmetro do fruto, correlacionando positivamente o diâmetro com a força de desprendimento do fruto (FDF), ou seja, quanto maior o diâmetro do fruto, maior a FDF ou maior a persistência do pedúnculo, concordando com os dados apresentados no presente estudo, onde o genótipo CNPH 40.001 apresentou o maior diâmetro do fruto e a maior FDF ou maior persistência do fruto ao pedúnculo.

As **Figuras S1, S2 e S3** mostram desenhos botânicos dos genótipos CNPH 40.001, CNPH 4337 e 40.491 (F₁), respectivamente, com alto nível de detalhamento mostrando as estruturas estudadas e apresentadas anteriormente. É possível observar claramente o número de lóculos dos frutos e o número de sementes por lóculo. O parental CNPH 40.001 apresentou o maior número de sementes por lóculo - de 4 a 6 (**Figura S1-J2**), e o parental CNPH 4337 apresentou o maior número de lóculos - 5 (**Figura S2-J2**), de acordo com Gonçalves et al. (2013), que concluíram que o número de sementes por fruto é uma característica heterogênea dentro de uma mesma repetição, sendo sua variação decorrente da diferença de tamanho entre os frutos.

Tomate e pimenta são duas Solanáceas que apresentam uma enorme diversidade na morfologia dos frutos (Paran e Van Der Knaap, 2007). Carvalho et al. (2003), afirmam que existe uma grande variabilidade genética expressa na diversidade de cores e formas dos frutos, principalmente na espécie *C. chinense*. O formato dos frutos apresentou grande variação entre os três genótipos. O genótipo CNPH 40.001 tinha formato oval e bico característico na extremidade inferior do fruto, enquanto o genótipo CNPH 4337 tinha formato de fruto quase redondo e o genótipo CNPH 40.491, formato cilíndrico, aparentemente intermediário ao de seus pais.

A posição/orientação do fruto (ereto ou pendente) é controlada por um único gene (Setiamihardja et al., 1990). O pedúnculo está claramente pendente no parental CNPH 40.001 e ereto no parental CNPH 4337, com o genótipo CNPH 40.491 (F₁) herdando esta característica (pendente) do parental CNPH 40.001 (**Figuras S1-H, S2-G e S3-G**, respectivamente).

Cor, formato, posição, abscisão e diâmetro do fruto do genótipo CNPH 4337, foram idênticos ao estudo de Carvalho (2014), que utilizou oito descritores morfológicos, também do IPGRI (1995) para caracterizar 30 acessos de *Capsicum* do germoplasma da Embrapa Hortaliças banco, incluindo o genótipo CNPH 4337 utilizado no presente estudo.

Padilha (2014) avaliou morfologicamente 20 acessos de *C. annuum* do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS), que mantém aproximadamente 367 acessos conservados do gênero. Neste estudo, foram utilizados 12 descritores qualitativos e 14 quantitativos, alguns utilizados também no presente estudo: cor do fruto imaturo e maduro, formato do fruto, número de lóculos, persistência entre fruto e pedúnculo e diâmetro do fruto, encontrando grande variação genética nos genótipos estudados. Büttow et al. (2010) e Neitzke et al. (2010) também verificaram a existência de grande variabilidade genética em frutos de acessos de *C. annuum* do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado.

As diferentes espécies e variedades de pimenta *Capsicum* podem ser distinguidas pelas características morfológicas dos frutos e, principalmente, das flores (Moreira et al., 2006; Sudré et al., 2010). Neste estudo, não houve diferença na cor das pétalas, que eram brancas para os três genótipos estudados. Apenas uma variação foi encontrada no número de pétalas por flor do genótipo CNPH 4337, mostrado na **figura S2-F**, que apresentou seis pétalas.

Costa (2012) conseguiu distinguir três espécies cultivadas de *Capsicum* spp. em 40 acessos do acervo da Universidade Federal do Amazonas, utilizando 61 descritores morfológicos do IPGRI, dos quais sete também foram utilizados no presente estudo, sendo a cor das anteras florais uma das características determinantes para a diferenciação dos morfotipos de *C. Chinense* no estudo de Costa (2012), bem como a grande variabilidade nos atributos dos frutos.



Figura S1: A-J. Genótipo CNPH 40.001 de *Capsicum chinense*. A. Ramo com frutos; B1-4. Folhas na face adaxial apresentando variação de tamanho; C. Detalhe da folha na face abaxial mostrando os tricomas; D. Porção nodal do ramo mostrando botões; E1-3. Variações do tamanho do botão; F. Variação floral com 5 pétalas; G. Porção nodal do galho mostrando o fruto em seu pedúnculo pendente; H. Porção nodal do ramo mostrando o fruto maduro; I1-5. Frutos maduros e suas variações de tamanho; J1-2. Frutos em seções - J1. Seção longitudinal, J2. Seção transversal mostrando os 3 lóculos. A-J de NAYARA CARVALHO / CNPH 40.001 (Embrapa CNPH- Brasília, 2020). Ilustração de Pétala Ribeiro.



Figura S2: A-J. Genótipo CNPH 4337 de *Capsicum chinense*. A. Ramo com frutos; B1-6. Folhas na face adaxial apresentando variação de tamanho; C. Detalhe da folha na face abaxial mostrando os tricomas; D. Porção nodal do ramo mostrando folhas, flores e botões; E1-3. Desenvolvimento de frutos - E1. Flor, E2. Surgimento do fruto, E3. Fruta imatura; F. Variação floral com 6 pétalas; G. Porção nodal do galho mostrando o fruto em seu pedúnculo ereto; H. Fruto maduro em seu maior tamanho; I1-5. Frutos maduros e suas variações de tamanho; J1-2. Frutos em seções - J1. Seção transversal mostrando os 5 lóculos, J2. Seção longitudinal. A-J da

NAYARA CARVALHO / CNPH 4337 (Embrapa CNPH - Brasília, 2020). Ilustração de Pétala Ribeiro.



Figura S3: A-J. híbrido CNPH 40.491 (F1) *Capsicum chinense*. A. Ramo com botões e frutos; B1-3. Folhas na face adaxial apresentando variação de tamanho; C. Detalhe da folha na face abaxial mostrando os tricomas; D. Porção nodal do galho mostrando os frutos em seu pedúnculo pendente; E. Flor com 5 pétalas; F. Porção nodal do ramo mostrando flor; G1-3.

Desenvolvimento de frutos - G1. Flor, G2. Surgimento do fruto, G3. Fruto imaturo; H1-2. Frutos maduros; I1-2. Fruto em seções - I1 Seção longitudinal., I2. Seção transversal mostrando os 3 lóculos. A-I de NAYARA CARVALHO / CNPH 40.491 (F1) (Embrapa CNPH - Brasília, 2020). Ilustração de Pétala Ribeiro.

Segundo Knapp (2002), os frutos da pimenta são classificados como bagas, ou seja, frutos indeiscentes, com pericarpo composto por exocarpo, mesocarpo e endocarpo definidos, e contém sementes incorporadas à placenta. Na **Figura S4**, é possível observar todas as estruturas citadas para os três genótipos, bem como placenta (região de inserção de sementes), sementes e processo de maturação dos frutos com inserção do pedúnculo. O fruto do genótipo CNPH 4337 apresentou conformação pentalocular, enquanto os genótipos CNPH 40.001 e CNPH 40.491 (F1) apresentaram conformação triclocular. No processo de amadurecimento dos frutos, houve diferença na tonalidade da cor verde dos frutos imaturos, sendo verde amarelado, verde claro e verde médio para os genótipos CNPH 40.001, CNPH 4337 e CNPH 40.491 (F1), respectivamente (**Tabela S1**). Não houve variação na cor dos frutos maduros, sendo que os três genótipos apresentaram coloração vermelha. Frutos amarelos são recessivos a vermelhos em *Capsicum* spp. Faltam-lhes os pigmentos vermelhos capsantina e capsorubina, cuja formação é catalisada pela enzima capsantina - capsorubina sintase (CCS) (Pickersgill, 2007).



Figura S4: *Capsicum chinense*: 1 (CNPH 40.001). A: Fruto trilobular; Seção transversal; (a1): Exocarpo; (a2): Mesocarpo; (a3): Endocarpo; B: Seção Longitudinal (b1): Sementes; (b2): Placenta; C: Estágios de Maturação do Fruto; (c1): Pedúnculo pendente. 2 (CNPH 4337). D: Fruto Pentalocular; Seção transversal; (d1): Exocarpo; (d2): Mesocarpo; (d3): Endocarpo; E: Seção Longitudinal (e1): Sementes; (e2): Placenta; F: Estágios de Maturação do Fruto; (f1): Pedúnculo ereto. 3 (CNPH 40.491). G: fruto trilobular; Seção transversal; (g1): Exocarpo; (g2): Mesocarpo; (g3): Endocarpo; (g4): Sementes; H: Seção Longitudinal (h1): Placenta; I: Estágios de Maturação do Fruto; (i1): Pedúnculo pendente.

Portanto, houve grande variabilidade dos caracteres morfológicos avaliados, apresentando características contrastantes nos genótipos CNPH 40.001 e CNPH 4337, com exceção da cor das pétalas e dos frutos quando maduros.

ANATOMIA

A metodologia de preparo de lâminas vegetais utilizada neste estudo pode ser adequada para outros materiais do gênero *Capsicum*, uma vez que houve dificuldade no

manuseio e montagem. Klein et al. (2004) utilizaram um protocolo diferente para visualização em microscópio eletrônico de varredura, com fixação, pós-fixação e desidratação do material vegetal para posterior embalagem em resina epóxi. Portanto, provavelmente a metodologia com resina epóxi poderia ter sido mais eficaz na confecção dos cortes, proporcionando maior maleabilidade e conseqüentemente melhor visualização do material ao microscópio óptico. Wahua et al. (2014) utilizaram um protocolo com quatro soluções de série alcoólica para desidratação / reidratação do material e três soluções de álcool e clorofórmio para clarificação, utilizando os corantes alcian e azul safranina e para montagem das lâminas, glicerol, e conseguiram obter lâminas tão boas como as de microtomia (incorporados em epóxi).

Pedúnculo

A **Figura S5** mostra seções transversais do pedúnculo do fruto dos três genótipos estudados, evidenciando a epiderme (Ep) e o córtex (Cx), composto por parênquima; o sistema vascular (Xilema (Xi) e Floema (Fl)); periciclo unisseriato (Pe) em torno do floema. No centro: medula (Me) com células parenquimáticas.

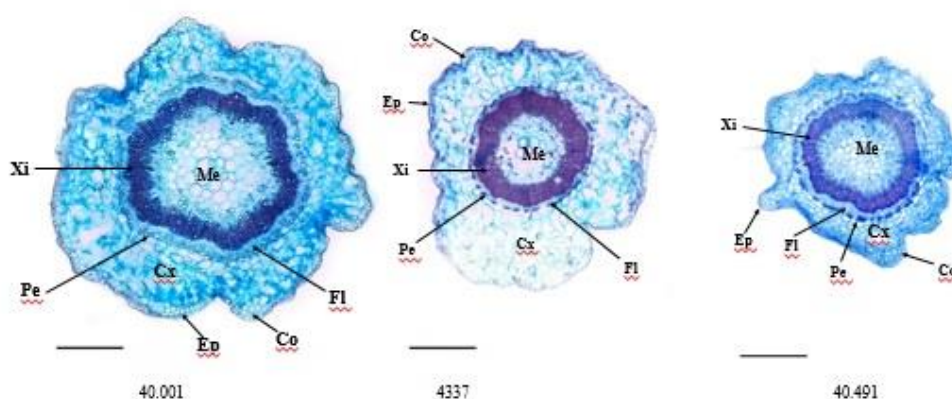


Figura S5: Pedúnculo de *Capsicum chinense*: Genótipo CNPH 40.001: Sistema vascular Xilema (Xi) e Floema (Fl) com formato hexagonal e padrão de sifonostelo circundado pelo periciclo unisseriato simples (Pe). Epiderme unisseriada simples (Ep), seguida de colênquima unisseriado simples (Co). Medula (Me) e Córtex (Cx) com tecido parenquimático. Genótipo CNPH 4337: Sistema vascular Xilema (Xi) e Floema (Fl) com formato de anel (circular) e padrão de sifonostele circundado por periciclo unisseriato simples (Pe) com células lignificadas. Epiderme unisseriada simples (Ep), seguida de colênquima unisseriado simples (Co). Medula (Me) e Córtex (Cx) com tecido parenquimático. Genótipo CNPH 40.491: (F1): Sistema vascular Xilema (Xi) e Floema (Fl) em forma de anel, mas levemente hexagonal, e padrão de sifonostelo circundado por periciclo (Pe) unisseriato simples com células lignificadas. Epiderme unisseriada simples (Ep), seguida de colênquima unisseriado simples (Co). Medula (Me) e Córtex (Cx) com tecido parenquimático.

O sistema vascular do pedúnculo dos três genótipos apresentou padrão de sifonostelo (xilema circundado por floema), os genótipos CNPH 40.001 e CNPH 4337, apresentaram formato hexagonal e circular, respectivamente, e o genótipo CNPH 40.491 (F1) apresentou formato intermediário ao de seus pais. . Wahua et al., (2014) observaram também a conformação circular do sistema vascular no caule e raiz de *C. annuum* . O periciclo do pedúnculo do genótipo CNPH 40.001 não apresentou células lignificadas, ao contrário dos outros dois genótipos (CNPH 4337 e CNPH 40.491). Outras estruturas dos pedúnculos (epiderme, colênquima, medula e córtex) não diferiram entre os três genótipos. Possivelmente, uma análise quantitativa forneceria mais detalhes.

Setiamihardja et al. (1990) acreditam que a força de desprendimento do fruto (FDF) se deve principalmente ao sistema genético que envolve caracteres de pedicelo em genótipos de frutos não decíduos, e que os caracteres de pedicelo e fruto estariam aparentemente envolvidos no FDF. Em estudo histológico com pimenta tabasco (*C. frutescens*), Sundberg et al. (2003) concluíram que frutos facilmente destacáveis apresentam células parenquimáticas periféricas alongadas e grandes espaços intercelulares, características que não foram observadas em nenhum dos três genótipos aqui estudados.

Flor

Descrições de diferenças genéticas baseadas em caracteres anatômicos são raras (Dias et al., 2013), principalmente em flores da espécie *C. chinense*. As **Figuras S6, S7 e S8** apresentadas a seguir, mostram detalhes anatômicos dos principais componentes da flor nos genótipos CNPH 40.001, CNPH 4337 e CNPH 40.491 (F1), respectivamente.

As pétalas das flores (Pe) dos genótipos CNPH 40.001 e CNPH 4337 apresentaram conformação celular uni ou bisseriada, sem muita clareza, enquanto o genótipo CNPH 40.491 (F1), apresentou pétalas com conformação unisseriada. A cutícula (Cu), que recobre a epiderme (Ep), era relativamente fina nos pais e espessa no híbrido CNPH 40.491 (F1).

Segundo Metcalfe e Chalk (1972), as plantas da família Solanaceae podem apresentar inúmeros tipos de tricomas, os quais incluem uma diversidade considerável de formas glandulares e não glandulares, servindo em alguns casos para caracterizar algumas famílias botânicas. A presença de tricomas glandulares é uma característica das espécies da família Solanaceae (Maiti et al., 2002). No presente estudo, Tricomas tectores (Tr) foram observados nos três genótipos, sendo que no híbrido F1 houve maior presença destes. Os tricomas tectores diferem dos glandulares porque são formados por uma única célula que se projeta para fora da epiderme e não produz secreções, enquanto os glandulares produzem exsudatos tóxicos, que segundo Amme et al. (2005), pode estar relacionado à proteção contra patógenos.

Quanto aos órgãos reprodutivos, não foi observado androceu no genótipo CNPH 40.001, provavelmente devido ao corte em fase de crescimento inferior, estruturas já observadas nos genótipos CNPH 4337 e CNPH 40.491. O gineceu foi claramente observado nos três genótipos, diferindo no arranjo dos carpelos, unicarpelar no genótipo CNPH 4337 e bicarpelar

nos demais. Wahua et al. (2014), em um estudo histológico com *C. annuum* observou conformação bilocular.

Também foram encontradas diferenças na forma do estilete (Et), reto nas laterais para os genótipos CNPH 4337 e CNPH 40.491 (F1), e ligeiramente achatado para o genótipo CNPH 40.001; o estigma apresenta um ápice com células receptoras muito evidentes no genótipo CNPH 40.001.

CNPH 40.001



Figura S6: Flor de *Capsicum chinense* genótipo CNPH 40.001: Cálice com pétalas (Pe), epiderme uni ou bisserial (Ep), com cutícula relativamente fina (Cu) e seis a sete camadas de tecido parenquimático (Pa). Sépalos (Se) mostrando tricomas (Tr). Cloroplastos e amido ocasionalmente presentes nas células do parênquima. Estigma (Es) aumentado no ápice, com uma superfície receptora composta por muitas células evidentes. Estilete (Et) ligeiramente achatado nas laterais, com três a cinco células entre a superfície externa e o tubo polínico. Ovário (Ov) bicarpelar com óvulos (Óvl).

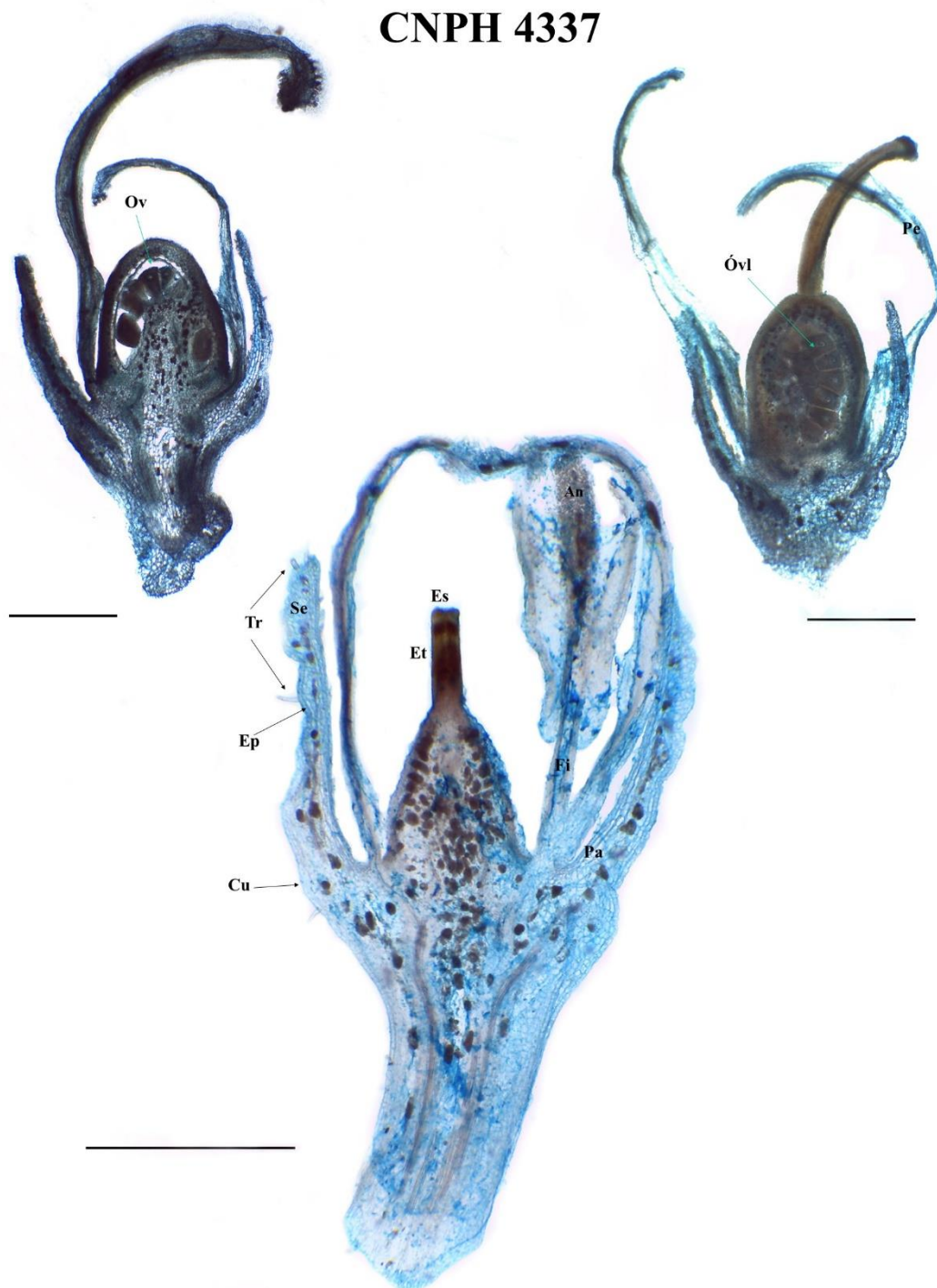


Figura S7: Flor de *Capsicum chinense* genótipo CNPH 4337: Cálice com pétalas (Pe), epiderme uni ou bisserial (Ep), com cutícula delgada (Cu) e cinco a seis camadas de tecido parenquimático (Pa). Estigma (Es) com ápice reto ou ligeiramente aumentado e superfície receptora formada por poucas células não muito evidentes. Estilete reto (Et) nas laterais, com duas a quatro células entre a superfície externa e o tubo polínico. Ovário (Ov) unicarpelar com óvulos (Óvl). Sépalas (Se) mostrando tricomas (Tr). Filete (Fi) com antera (An) e grãos de pólen (Po) dentro.

CNPH 40.491 (F₁)

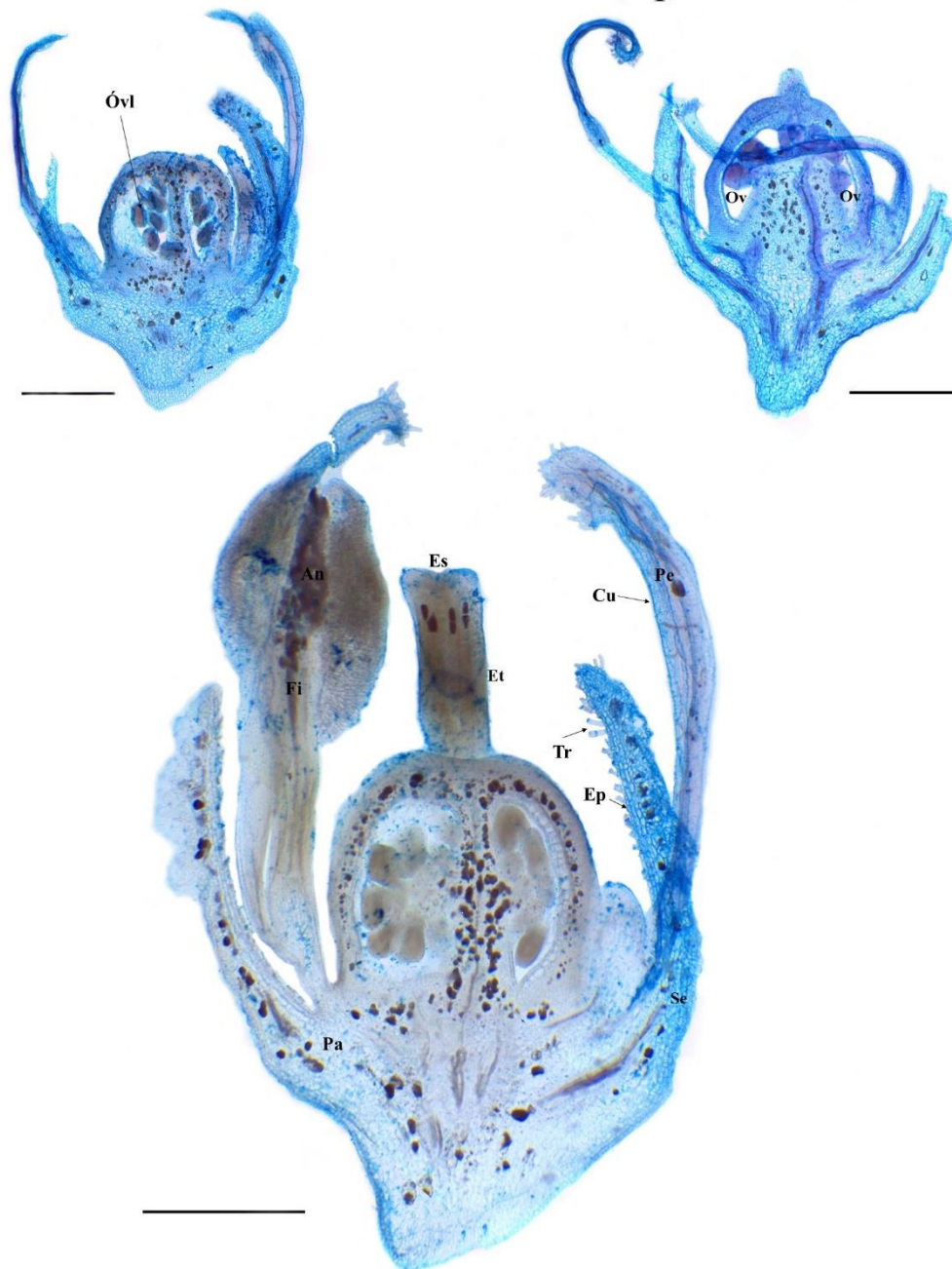


Figura S8: Flor de *Capsicum chinense* genótipo CNPH 40.491: Cálice com pétalas (Pe), epiderme unisseriada, com cutícula relativamente espessa e seis a sete camadas de tecido parenquimático (Pa). Tricomas tectores (Tr) visivelmente presentes, principalmente na parte interna das sépalas (Se). Estigma (Es) ligeiramente alargado no ápice, com superfície receptora composta por células pouco evidentes. Estilete reto (Et) nas laterais, com quatro a seis células entre a superfície externa e o tubo polínico. Ovário (Ov) bicarpelário com óvulos (Óv). Filete (Fi) com antera (An) e grãos de pólen (Po) dentro.

O melhoramento genético de *Capsicum* spp. deve buscar frutos com persistência do fruto com pedúnculo intermediário, que não são facilmente derrubados pelo vento e pela chuva, mas são facilmente destacados durante a colheita (Fonseca et al., 2008).

Assim, foi possível observar estruturas básicas do caule, e pequenas diferenças em algumas delas, mas nenhuma que pudesse estar relacionada à fácil abscisão dos frutos. No que diz respeito às flores, também foi possível observar estruturas básicas, o que pode auxiliar em estudos de caracterização para seleção assistida e estudos de taxonomia nesta espécie.

Dias et al. (2013) examinaram a anatomia e micromorfologia dos órgãos vegetativos e reprodutivos (folhas, frutos e sementes) de quatro espécies de *Capsicum* (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* e *C. frutescens*) do banco genético da Universidade Estadual do Norte Fluminense, com microscopia eletrônica de varredura, e constatou que embora as espécies estudadas apresentassem uma ampla variabilidade morfológica e molecular, essa variabilidade não se refletiu nas características anatômicas. Esses resultados são semelhantes aos aqui apresentados, pois a análise morfológica foi bastante informativa, e a análise anatômica, apesar de apresentar pequenas variações, não esteve diretamente relacionada à fácil abscisão dos frutos em *C. chinense*. Possivelmente, uma análise quantitativa forneceria maiores detalhes para esse fim. Gersch (1996) usou microscopia eletrônica de varredura para investigar diferenças no tipo de célula e organização celular no receptáculo da fruta (junção com pedúnculo) em dois genótipos de pimenta caiena (*C. annuum* L.) e encontrou uma região distinta de 15 camadas de células esclerificadas que se estendia da periferia do fruto para o receptáculo, no genótipo de difícil abscisão, contrastando com o genótipo de fácil abscisão que apresentava menos camadas dessas mesmas células. Na metodologia, foi utilizado um medidor de força para medir quantitativamente (registrado em Kg e convertido em Newtons) a abscisão, método pelo qual a avaliação torna-se menos subjetiva do que o utilizado no presente estudo.

Os caracteres morfológicos avaliados neste estudo revelaram grande variação, principalmente para a abscisão dos frutos, demonstrando grande potencial genético para utilização desses genótipos no programa de melhoramento, embora essa variação não tenha se refletido nas características anatômicas. Embora a fácil abscisão do fruto tenha sido contrastante para os genitores CNPH 40.001 e CNPH 4337, não houve relação das demais características avaliadas com ela, com exceção da firmeza e diâmetro do fruto, que apresentaram correlações diretas com a fácil abscisão, em outras palavras, quanto maior e mais firme o fruto, maior a força de abscisão para o desprendimento do pedúnculo.

Estudos genéticos complementares que utilizem marcadores moleculares para mapear a característica de abscisão do fruto são muito importantes para a utilização desses acessos em

programas de melhoramento, principalmente no contexto do desenvolvimento de cultivares que apresentem fácil abscisão aliada às características de demanda do mercado.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em especial ao Centro de Pesquisas em Biotecnologia e Recursos Genéticos (CENARGEN) e ao Centro Nacional de Pesquisas de Hortaliças (CNPH), à Universidade de Brasília (UnB) e à Coordenação de Melhoria do Ensino Superior Pessoal (CAPES) pelo apoio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S. S. et al. (2011). Activity and expression of polygalacturonase vary at different fruit ripening stages of sweet pepper cultivars. *Genet. Mol. Res.*, 10(4):3275-3290.
- Alves, S. (2009). Caracterização e avaliação de genótipos de pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense*). 81p (Masters thesis). Universidade Federal de Amazonas, Manaus.
- Amme, S; et al. (2005). A proteome approach defines protective functions of tobacco leaf trichomes. *Proteomics.*, 5(10):2508-2518.
- Anilkumar, C. et al. (2019). Genetics of fruit yield and its component traits under different fruiting habit backgrounds in chili (*Capsicum annum* L.). *J. Genet. Genomics*, 98(3):1-10.
- Arancibia, R.A.; Motsenbocker, C.E. (2004). Pectin ultra-degradation decreases the force required to detach ripe fruit from the calyx in tabasco pepper. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 129:642-648.
- Baba, V.Y. et al. (2016). Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 63: 1371-1381.
- Bernardo, R. (2002). *Breeding for quantitative traits in plants* (Vol. 1, p. 369). Woodbury, MN: Stemma press.
- Bernardo, R. (2014). *Essentials of plant breeding*. Stemma Press.
- Büttow, M.W. et al. (2010). Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciênc. rural*, 40:1264-1269.
- Bosland, P.W., Votava, E. J., Votava, E. M. (2012). Peppers: vegetable and spice capsicums. (Vol. 22), Cabi.
- de Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L.D.B., Bustamante, P. G., and da Silva, D.B. (2003). Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças. *Embrapa Hortaliças-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B.; Ribeiro, C.S.C.; Lopes, C.A. (2006). Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças, 27p.
- Carvalho, S. I. C. D. (2014). Estudos filogenéticos e de diversidade em *capsicum* e sua aplicação na conservação e uso de recursos genéticos das espécies *C. frutescens* e *C. chinense*.
- Costa, L.V. (2012). Caracterização morfológica e produtiva de pimentas (*Capsicum* spp).
- Embrapa Hortaliças, Sistemas de Produção, 2, (2007), Available at: [https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html].
- Dias, G.B. et al. (2013). Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genet. Mol. Res.*, 12:6488-6501.

- Errington, N., Mitchell, J.R., Tucker, G.A. (1997). Changes in the force relaxation and compression responses of tomatoes during ripening: the effect of continual testing and polygalacturonase activity. *Postharvest Biol. Technol.*, 11(3):141-147.
- Fenwick, K.M. et al. (1996). Polymer mobility in cell walls of transgenic tomatoes with reduced polygalacturonase activity. *Phytochemistry.*, 42(2):301-307.
- Fonseca, R.M. et al.. (2008). Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro – Amazonas. *Crop. Breed. Appl. Biotechnol.*, 8:187-194.
- Gersch, K. P. (1996). Analysis of the Influence of Genotype on Cayenne Pepper Fruit-Receptacle Detachment. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.
- Gonçalves L.G.V. et al. (2013). Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.*, 36(1):31- 40.
- IPGRI, A. (1995). CATIE. Descriptors for Capsicum (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; the Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan, and the Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. *Turrialba, Costa Rica, 110*.
- Klein, D.E. et al. (2004). The structure of colleters in several species of Simira (Rubiaceae). *Ann. Bot.*, 94(5):733-740.
- Knapp, S. (2002). Tobacco to tomatoes: A phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.*, 53(377):2001-2022.
- Kraus, J.E.; Arduin, M. (1997) Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR.
- Lannes, S.M. et al. (2007). Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Sci. Hort.*, 3:266-270.
- Maiti, R.K. et al. (2002). Some aspects on pharmacology of ten species of the family Solanaceae utilized in traditional medicine. *Caldasia*, 24:317–321.
- Moscone, E.A. et al. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Hort.*, 745:137-169.
- Moreira, G.R.M. et al. (2006). Espécies e variedades de pimenta. Belo Horizonte: EPAMIG, *Informe Agropecuário.*, 27(235):16-29.
- Metcalfe, CR; Chalk, L. 1972. Anatomy of the Dicotyledones: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press, v.2.
- Neitzke, R.S. et al. (2010). Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. *Hort. Bras.*, 28:47-53.
- Padilha, H. K. M. (2014). Caracterização morfológica, avaliação agrônômica e análise de compostos bioativos em acessos de pimentas (*Capsicum annuum*) (Masters thesis). Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

- Paiva, J.G.A de. et al. (2006). Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. *Acta bot. bras.*, 20(2):257-264.
- Paran, I.; Van Der Knaap, E. (2007). Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J. Exp. Bot.*, 58(14):3841-3852.
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Ann. Bot.*, 100(5):925-940.
- Rao, G.U. and Paran, I. (2003). Polygalacturonase: a candidate gene for the soft flesh and deciduous fruit mutation in *Capsicum*. *Plant Mol. Biol.*, 51(1):135-141.
- Setiamihardja, R.; Knavei, D.E. (1990). Association of pedicel length and diameter with fruit length and diameter and ease of fruit detachment in pepper. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 115(4):677-681.
- Sundberg, M. et al. (2003). Anatomy of fruit detachment in tabasco pepper (*Capsicum frutescens*) Solanaceae. *J. Torrey Bot. Soc.*, 130:231–237.
- Sudré, C.P. et al. (2010). Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genet. Mol. Res.*, 9: 283-294.
- Villalon, B., and Bryan, H. H. (1970). Evaluation of fruit-pedicel separation of fresh market tomato varieties for mechanical harvest. In *Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society*. (No. 83, pp. 127-130). Miami Beach, USA.
- Wahua, C., Okoli, B. E., & Edwin-Wosu, N. L. (2014). Morphological, anatomical, cytological and phytochemical studies on *Capsicum annum* Linn. (Solanaceae). *J. Exp. Biol.*, 4(1), 464-471.