

MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS MOLECULARES  
PARA ASSEGURAR A PROPRIEDADE INTELECTUAL E DIREITOS  
PATRIMONIAIS ADVINDOS DE PROGRAMAS DE  
MELHORAMENTO DE *Capsicum annuum L.*

**CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2019

MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS MOLECULARES  
PARA ASSEGURAR A PROPRIEDADE INTELECTUAL E DIREITOS  
PATRIMONIAIS ADVINDOS DE PROGRAMAS DE  
MELHORAMENTO DE *Capsicum annuum* L.

**CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

A994

Azevedo, Carlos Diego de Oliveira.

MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ASSEGURAR A PROPRIEDADE INTELECTUAL E DIREITOS PATRIMONIAIS ADVINDOS DE PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE *Capsicum annuum* L. / Carlos Diego de Oliveira Azevedo. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

96 f. : il.

Bibliografia: 69 - 84.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientadora: Rosana Rodrigues.

1. Registro de cultivares. 2. Proteção de Cultivares. 3. Melhoramento de Plantas. 4. Hortaliças. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS MOLECULARES  
PARA ASSEGURAR A PROPRIEDADE INTELECTUAL E DIREITOS  
PATRIMONIAIS ADVINDOS DE PROGRAMAS DE  
MELHORAMENTO DE *Capsicum annuum* L.

**CARLOS DIEGO DE OLIVEIRA AZEVEDO**

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

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:



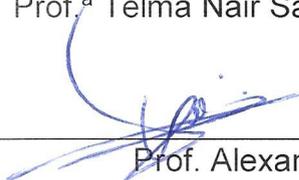
---

Dr.<sup>a</sup> Cláudia Silva da Costa Ribeiro (Ph.D., Genética e Melhoramento de Plantas)  
EMBRAPA



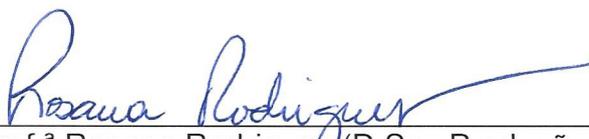
---

Prof.<sup>a</sup> Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) – UENF



---

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



---

Prof.<sup>a</sup> Rosana Rodrigues (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

A DEUS dedico toda Honra, toda Glória e todo Louvor pela idealização, realização e conclusão desta Tese. “Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas; Glória, pois, a Ele eternamente. Amém!” – Rm 11.36

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua maravilhosa Graça e por todas as bênçãos e vitórias em minha vida, em especial, pelas bênçãos que me conduziram ao bom êxito acadêmico e profissional;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, por todo o crescimento acadêmico e profissional conquistado;

Aos meus pais que sempre investiram na minha educação, torceram por mim e me incentivaram a buscar meus objetivos;

A minha esposa Alinne, pela compreensão, apoio e pelas trocas de informações durante o período em que estive escrevendo esta tese, por todo amor, carinho, atenção, paciência e companheirismo;

Aos meus avós, Luiz e Dilma, que sempre me incentivaram a progredir nos estudos e vibraram com cada conquista;

A minha madrinha, Fátima, pela torcida e incentivo constantes;

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Rosana Rodrigues, por ter acreditado no meu potencial acadêmico e científico, pela oportunidade de orientação ao longo do meu curso de doutorado e, pelos conhecimentos transmitidos;

Às minhas conselheiras, Dr<sup>a</sup>. Telma Nair Santana Pereira e Dr<sup>a</sup> Helaine Christine Cancela Ramos, pelos conhecimentos transmitidos e por todo o suporte na execução dos meus experimentos e elaboração desta tese.

Ao Prof. Manuel Antônio Molina Palma, diretor da Agência UENF de Inovação, obrigado pelo apoio e compreensão durante o meu doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, cuja participação ao longo do curso possibilitou o meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional;

A FAPERJ pelo apoio financeiro concedido;

Ao CNPq pelo financiamento;

Este trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1.INTRODUÇÃO .....	1
2.OBJETIVOS .....	5
3.CAPÍTULOS.....	6
3.1. APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA SOLUÇÃO DE INCONSISTÊNCIAS NO REGISTRO DE CULTIVARES DE <i>Capsicum</i> EM BANCO DE DADOS OFICIAL BRASILEIRO .....	6
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	6
3.1.2. REVISÃO .....	9
3.1.2.1. Origem e domesticação de <i>Capsicum</i> spp. ....	9
3.1.2.2. Importância econômica.....	11
3.1.2.3. Botânica.....	12
3.1.2.4. Cariótipo e estrutura do genoma de <i>Capsicum</i> spp.....	13
3.1.2.5. Complexos gênicos de <i>Capsicum</i> spp.....	15
3.1.2.6. Melhoramento de <i>Capsicum</i> spp. ....	17
3.1.2.7. Caracterização Morfológica .....	19
3.1.2.8. Marcadores Moleculares .....	20
3.1.2.9. Caracterização Molecular .....	23
3.1.2.10 Registro de Cultivares .....	24
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26

3.1.3.1. Germoplasma .....	26
3.1.3.2. Extração de DNA.....	27
3.1.3.3. Reações de Amplificação .....	27
3.1.3.4. Eletroforese .....	34
3.1.3.5. Análise de Dados .....	34
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
3.1.5. CONCLUSÃO .....	44
3.2. <i>DNA FINGERPRINTING</i> DE CULTIVARES DE <i>Capsicum annuum</i> L. DESENVOLVIDAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE <i>Capsicum</i> DA UENF .....	45
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	45
3.2.2. REVISÃO.....	47
3.2.2.1. Propriedade Intelectual.....	47
3.2.2.2. Proteção de Cultivares .....	49
3.2.2.3. Aplicação de Marcadores Moleculares na Proteção de Cultivares ....	52
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.2.3.1. Germoplasma .....	53
3.2.3.2. Extração de DNA.....	57
3.2.3.3. Reações de Amplificação .....	57
3.2.3.4. Eletroforese .....	61
3.2.3.5. Análise de Dados .....	61
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
3.2.5. CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## RESUMO

AZEVEDO, Carlos Diego de Oliveira; DSc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro, 2019; MICROSSATÉLITES COMO FERRAMENTAS MOLECULARES PARA ASSEGURAR A PROPRIEDADE INTELECTUAL E DIREITOS PATRIMONIAIS ADVINDOS DE PROGRAMAS DE MELHORAMENTO DE *Capsicum annum* L.; Orientadora: Rosana Rodrigues; Conselheiras: Telma Nair Santana Pereira e Helaine Christine Cancela Ramos.

A horticultura destaca-se como um relevante setor da agricultura no Brasil, apresentando uma produção de mais de 16 milhões de toneladas e ocupando uma área de 537 mil ha. Todo o setor foi responsável por movimentar aproximadamente US\$ 19 bilhões em 2016. A produção de sementes de hortaliças no Brasil em 2017 foi equivalente a 737 toneladas, arrecadando cerca de US\$ 446 milhões. Por esta razão, tanto o setor público (universidades e centros de pesquisa) quanto o setor privado (empresas) têm investido em programas de melhoramento genético de hortaliças, a fim de desenvolverem cultivares mais produtivas e adaptadas às demandas do setor produtivo. Entretanto, faz-se necessário a adoção de medidas legais que assegurem aos obtentores e/ou melhoristas, bem como aos mantenedores e/ou produtores de sementes a não violação de seus direitos. Por isso, as sementes e demais propágulos das novas cultivares, produzidas tanto por instituições públicas ou privadas, são protegidos e/ou registrados antes de serem disponibilizados no mercado. Porém, a aplicação das medidas legais supracitadas não tem coibido a prática de crimes contra a propriedade intelectual, o direito patrimonial ou as

relações de consumo. Logo, há a necessidade de criar estratégias para fortalecimento dos mecanismos fiscalizatórios vigentes tanto para o registro quanto para a proteção de cultivares, visando conferir maior segurança jurídica para obtentores, melhoristas, produtores de sementes e mudas e, por fim, maior garantia aos produtores rurais. O presente trabalho propõe a aplicação de marcadores microssatélites como ferramentas moleculares para checagem e certificação da pureza e identidade genética de cultivares de *Capsicum* spp. registradas e protegidas no Brasil. No primeiro capítulo, marcadores microssatélites foram usados para sanar inconsistências quanto à informação da espécie do gênero *Capsicum* atribuída a cultivares registradas, estando estes dados disponíveis no banco de dados oficial do Registro Nacional de Cultivares (RNC). Para tanto, foram usados 80 marcadores microssatélites, os quais foram empregados na caracterização molecular de sete genótipos de *Capsicum* spp., a saber: 'UENF Campista', 'Cascadura Ikeda', 'Amarela Comprida', 'De Cayenne', 'Cayenne Long Slin', 'Malagueta' e UENF 2154. Os resultados das análises realizadas na condução deste trabalho revelaram que de fato existe inconsistência quanto à informação da espécie do gênero *Capsicum* atribuída as cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin no CultivarWeb, banco de dados oficial do Registro Nacional de Cultivares. No segundo capítulo, o objetivo foi obter o perfil genético (DNA *fingerprinting*), por meio de microssatélites, de cultivares de *Capsicum annuum* desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da UENF. Por isso, além das cultivares de interesse (UENF Campista, UENF Carioca e UENF Carioquinha) outras seis cultivares (Cascadura Ikeda, All Big, Yolo Wonder, Amarelo SF 134, Quadrado Vermelho e Picante para vaso) foram usadas neste ensaio de *DNA fingerprinting* com aplicação de 30 marcadores microssatélites. A partir deste ensaio foi possível a discriminação das cultivares de interesse das cultivares comerciais com um alto nível de confiabilidade da informação gerada. Ainda, a partir do conjunto de marcadores microssatélites foi possível à detecção de *DNA fingerprints* para duas das cultivares UENF (UENF Campista e UENF Carioca).

**Palavras-chave:** Registro de cultivares, Proteção de Cultivares, Melhoramento de Plantas, Hortaliças.

## ABSTRACT

AZEVEDO, Carlos Diego de Oliveira; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2019; MICROSSATELLITES AS MOLECULAR TOOLS TO ASSURE THE INTELLECTUAL PROPERTY AND PROPERTY RIGHTS RESULTING FROM BREEDING PROGRAMS OF *Capsicum annuum* L.; Advisor: Rosana Rodrigues; Counselors: Telma Nair Santana Pereira and Helaine Christine Cancela Ramos.

Horticulture stands out as an important sector of agriculture in Brazil, presenting a production of more than 16 million tons and occupying an area of 537 thousand ha. The entire industry was responsible for handling approximately US\$ 19 billion in 2016. The production of vegetable seeds in Brazil in 2017 was equivalent to 737 tons, raising about US\$ 446 million. For this reason, both the public sector (universities and research centers) and the private sector (companies) have invested in genetic improvement programs in order to develop cultivars that are increasingly productive and adapted to the demands of the productive sector. However, it is necessary to adopt legal measures to ensure that obtentors and/or breeders, as well as seed keepers and/or producers, do not have their rights violated. Therefore, the seeds and other propagules of new cultivars, produced either by public or private institutions, are protected and / or registered before being made available in the market. However, the application of the aforementioned legal measures has not curtailed the practice of crimes against intellectual property, property law or consumer relations. Therefore, there is a need to create strategies to strengthen existing control mechanisms for both

registration and protection of cultivars, in order to provide greater legal certainty obtentors, breeders, seed and seedling producers and, finally, a greater guarantee to farmers. In this sense, the present work proposes the application of microsatellite markers as molecular tools for checking and certification of the purity and genetic identity of cultivars of *Capsicum* spp. registered and protected in Brazil. In the first chapter, microsatellite markers were used to detect inconsistencies regarding information of the species of *Capsicum* that is attributed to registered cultivars, and this data is available in the official database of the National Register of Cultivars (RNC). For this purpose, 80 microsatellite markers were used in the molecular characterization of seven genotypes of *Capsicum* spp., namely: 'UENF Campista', 'Cascadura Ikeda', 'Amarela Comprida', 'De Cayenne', 'Cayenne Long Slin ', ' Malagueta 'and UENF 2154. The results of the analyzes carried out in this work revealed that, in fact, there is an inconsistency regarding the information of the species of the genus *Capsicum* attributed to the cultivars Amarela Comprida, De Cayenne and Cayenne Long Slin in CultivarWeb, database of the National Register of Cultivars. In the second chapter, the objective was to obtain the DNA fingerprinting, through microsatellites, of *Capsicum annuum* cultivars developed by the breeding program of UENF. Thus, besides the cultivars of interest ('UENF Campista', 'UENF Carioca' and 'UENF Carioquinha'), six other commercial cultivars ('Cascadura Ikeda', 'All Big', 'Yolo Wonder', 'Amarelo SF 134', 'Quadrado Vermelho' and 'Picante para vaso') were used in this DNA fingerprinting assay with 30 microsatellite markers. From this DNA fingerprinting assay it was possible to discriminate the cultivars of interest from the commercial cultivars with a high level of reliability of the generated information. In addition, the set of microsatellite markers allowed the detection of DNA fingerprints for two of the cultivars of UENF (UENF Campista and UENF Carioca).

**Keywords:** Cultivar Registration, Plant Variety Protection, Plant Breeding, Vegetables.

## 1. INTRODUÇÃO

A horticultura destaca-se como um dos mais relevantes setores da agricultura no Brasil, apresentando uma produção de mais de 16 milhões de toneladas e ocupando uma área de 537 mil ha (CNA, 2017). Todo o setor foi responsável por movimentar aproximadamente US\$ 19 bilhões em 2016 (CNA, 2017).

O Sudeste brasileiro é o maior produtor e consumidor de hortaliças no País. Respectivamente, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro são os principais produtores da horticultura nacional (Anuário brasileiro de hortaliças, 2017).

Diversas espécies de hortaliças são produzidas em todo o país, porém os principais produtos, de acordo com as estatísticas de produção de 2017, são: abóbora, abobrinha, alface, alho, batata, beterraba, cebola, cenoura, coentro, couve-flor, pimentão e tomate (CNA, 2017). Toda essa diversidade garante sabor, cor, aroma e nutrição na mesa do brasileiro.

Esse prospecto econômico tem mantido aquecido o mercado de hortaliças antes, dentro e depois da porteira. Com destaque, o setor voltado para as atividades antes da porteira (insumos, máquinas e equipamentos) movimenta anualmente US\$ 5 milhões (CNA, 2017). Especificamente, a produção de sementes de hortaliças no Brasil em 2017 foi equivalente a 737 toneladas (IBGE, 2017), arrecadando cerca de US\$ 446 milhões (CNA, 2017).

Por esta razão, tanto o setor público (universidades e centros de pesquisa) quanto o setor privado (empresas) têm investido em programas de melhoramento

genético de hortaliças, a fim de desenvolverem cultivares cada vez mais produtivas e adaptadas às demandas do setor produtivo.

Dentre os principais programas públicos de melhoramento genético de hortaliças no Brasil, estão aqueles conduzidos pelos seguintes órgãos: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC); Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo; Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA); EMBRAPA Hortaliças; EMBRAPA Clima Temperado e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (Neto et al., 2009). Além desses, cabe ser citado o programa de melhoramento genético de hortaliças da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), o qual já desenvolveu cultivares de abóbora, pimentão, pimenta e feijão-de-vagem.

Por outro lado, dentre as empresas produtoras de sementes de hortaliças no Brasil, destacam-se: AGRISTAR/TOPSEED, AGRITU, AGROCINCO, FELTRIN ISLA, HORTEC, HORTIAGRO, HORTIVALE, SAKATA, TECNOSEED e VIDASUL (Neto et al., 2009).

Em um mercado competitivo como este, torna-se necessário a adoção de medidas legais que assegurem aos obtentores e/ou melhoristas, bem como aos mantenedores e/ou produtores de sementes a não violação de seus direitos. Por isso, as sementes e demais propágulos das novas cultivares, produzidas tanto por instituições públicas ou privadas são protegidos e/ou registrados antes de serem disponibilizados no mercado.

O registro de cultivares habilita a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas no Brasil, assegurando ao consumidor a compra de sementes e mudas certificadas e avaliadas nas condições edafoclimáticas brasileiras. O registro é fundamentado na Lei nº 10.711, de 05 de Agosto de 2003, a qual dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas.

A proteção de cultivares confere direito de exploração econômica exclusiva sobre a nova cultivar e cultivar essencialmente derivada, o que garante que apenas o obtentor (titular dos direitos) ou permissionários podem vender, oferecer à venda, reproduzir, importar, exportar, bem como embalar ou armazenar para esses fins, ou ceder a qualquer título, material de propagação da cultivar protegida. A proteção da cultivar é regida pela lei nº 9.456, de 25 de Abril de 1997.

Entretanto, a adoção de tais medidas legais não tem sido um óbice para a prática de crimes contra a propriedade intelectual, o direito patrimonial ou as relações de consumo, como por exemplo: comercialização de sementes ou propágulos de cultivares protegidas sem o consentimento do titular dos direitos; uso de falso registro e proteção; disponibilização no mercado de sementes ou propágulos de cultivares não inscritas no RNC; registro e/ou proteção de cultivares com informações imprecisas quanto a sua natureza e identidade genética. Desta forma, infelizmente, práticas criminosas têm lesado programas de melhoramento, produtores de sementes e produtores rurais (Kumar et al., 2001; Rooijen, 2011).

Portanto, é evidente a necessidade de instituir procedimentos fiscalizatórios que supram as debilidades dos procedimentos vigentes tanto para o registro quanto para a proteção de cultivares, a fim de certificar e/ou atestar a veracidade dos dados declarados aos bancos de dados oficiais na requisição de salvaguarda dos direitos, bem como solucionar possíveis conflitos de interesse. Não há dúvida de que isto beneficiaria produtores e consumidores do mercado de sementes.

Tanto os procedimentos para requisição de direitos quanto aqueles fiscalizatórios têm sido oficialmente baseados em descritores morfológicos contidos em listas disponibilizadas pelos órgãos competentes. Todavia, sabe-se que alguns marcadores morfológicos, além de serem passíveis de maior efeito ambiental, podem não ser suficientes para detecção de sutis diferenças entre obtenções vegetais (Aviani e Santos, 2011).

Por esta razão, a União Internacional para a Proteção das Obtenções vegetais (UPOV) por meio do Grupo de Trabalho em Técnicas Bioquímicas e Moleculares (BMT) tem produzido documentos técnicos (UPOV, 2010; 2011) com orientações para o uso de marcadores moleculares como ferramentas na comprovação da origem genética da cultivar, identificação de uso fraudulento ou indevido de cultivares e para atividades fiscalizatórias (Aviani e Santos, 2011).

De acordo com os documentos técnicos elaborados pelo BMT da UPOV (UPOV, 2010; 2011), os critérios para a escolha dos marcadores moleculares como ferramentas auxiliares nos procedimentos de proteção de cultivares são: codominância, nível de polimorfismo, robustez (reprodutibilidade e repetibilidade) e ter a região no genoma conhecida. Conseqüentemente, são recomendados os

seguintes marcadores: *Single Sequence Repeat* (SSR) ou Microsatélites; *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP).

O presente trabalho propõe a aplicação de marcadores microsatélites como ferramentas moleculares para checagem e certificação da pureza e identidade genética de cultivares de *Capsicum* spp. registradas e protegidas no Brasil. No primeiro capítulo, será enfatizado o uso de marcadores para elucidação de possíveis inconsistências quanto a espécie do gênero *Capsicum* atribuída a cultivares registradas, estando estes dados disponíveis no banco de dados oficial do Registro Nacional de Cultivares (RNC). No segundo capítulo, o enfoque se dá na realização do perfil genético (DNA *fingerprinting*), por meio de microsatélites, de cultivares de *Capsicum annuum* desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da UENF.

## 2.OBJETIVOS

**2.1. Objetivo Geral:** Comprovar a eficácia de marcadores microssatélites como ferramentas moleculares auxiliares aos processos de registro e proteção de cultivares no Brasil.

**2.2. Objetivos Específicos:**

- Promover a caracterização molecular de cultivares de *Capsicum* spp. por meio de marcadores microssatélites;
- Elucidar inconsistências em informações sobre cultivares de *Capsicum* spp. disponíveis em banco de dados oficial para cultivares registradas no Brasil;
- Realizar o *DNA fingerprinting* de cultivares de *Capsicum annuum* L. desenvolvidas na UENF por meio de marcadores microssatélites.

### **3. CAPÍTULOS**

#### **3.1. APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA SOLUÇÃO DE INCONSISTÊNCIAS NO REGISTRO DE CULTIVARES DE *Capsicum* EM BANCO DE DADOS OFICIAL BRASILEIRO**

##### **3.1.1.INTRODUÇÃO**

A produção de sementes no Brasil correspondeu a 3.815.655t em 2016 em uma área plantada equivalente a 59.760.500 ha, o que produziu uma receita de R\$ 10 bi (ABRASEM 2016). Especificamente, a produção de sementes de hortaliças alcançou a marca de 737 toneladas (IBGE, 2017), arrecadando cerca de US\$ 446 milhões (CNA, 2017).

O Registro Nacional de Cultivares (RNC) tem a competência de habilitar previamente cultivares e espécies para a produção e a comercialização de sementes e mudas no País, independente do grupo a que pertencem (e.g.: florestais, forrageiras, frutíferas, grandes culturas, olerícolas, ornamentais, entre outros) (Carvalho et al., 2018). O registro de cultivares é um instrumento importante tanto para proteger o agricultor quanto o melhorista. No que diz respeito ao agricultor, o registro de cultivares garante a não ocorrência da compra de sementes e mudas não certificadas e avaliadas nas condições edafoclimáticas

brasileiras. No que concerne aos melhoristas e programas de melhoramento, o registro de cultivares, além de assegurar a identidade genética e a qualidade varietal das cultivares, resguarda as cultivares melhoradas contra a degradação decorrentes de misturas mecânicas, cruzamentos, trocas de nomes ou denominações e outras ocorrências acidentais (Carvalho *et al.* 2009).

O registro é frequentemente confundido com a proteção de cultivares. Entretanto, ambos possuem finalidades e procedimentos distintos. Enquanto o registro habilita a comercialização das estruturas propagativas no país, a proteção concede a guarda da propriedade intelectual, bem como garante o direito de exploração econômica exclusiva (Carvalho *et al.* 2009).

Apesar disso, o processo de registro de cultivares pode ser beneficiado pela existência prévia do processo de proteção de cultivares, quando os ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) são utilizados também para fornecer dados ao registro (Carvalho *et al.* 2009; Pimenta *et al.* 2016).

O RNC, tal como existe atualmente, foi estabelecido com a promulgação da Portaria nº 527 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicado em 31 de dezembro de 1997. Mais tarde, no início do século XXI, o RNC passou a ser regido pela Lei nº 10.711, publicada em 05 de agosto de 2003, e regulamentado pelo Decreto nº 5.153, publicado em 23 de julho de 2004. Desde então, o RNC está sob a responsabilidade da Coordenação de Sementes e Mudas (CSM), do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas (DFIA), da Secretaria de Defesa Agropecuária (DAS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Portanto, a partir da promulgação da legislação vigente, para que a produção e a comercialização de sementes, mudas e outras estruturas propagativas sejam realizadas no Brasil, ficou determinado que o produtor/obtentor, devidamente registrado no RENASEM (Registro Nacional de Sementes e Mudas), deve submeter a cultivar a ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), antes de solicitar a inscrição da cultivar no RNC (Lei nº 10.711/2003).

Toda documentação formal para solicitar a inscrição da cultivar no RNC encontra-se disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/registro-nacional-de-cultivares-2013-rnc-1/formularios-para-registro-de-cultivares>.

Por meio de um banco de dados mantido em seu portal na internet, denominado *CultivarWeb*, o MAPA possibilita conhecer as cultivares registradas no Brasil dentro do gênero ou espécie de interesse. Em Dezembro de 2018, o sistema apontava a existência de 5.118 registros de cultivares no país. Todavia, como as informações disponíveis são obtidas mediante declaração formal do mantenedor, por meio da documentação de solicitação de inscrição de cultivar, algumas imprecisões ou inconsistências podem ocorrer.

Este estudo surgiu a partir da hipótese de inconsistência quanto à informação da espécie atribuída as três cultivares: Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin. A hipótese é devida ao fato de que no banco de dados oficial (*CultivarWeb*) essas cultivares são apresentadas como sendo pertencentes a espécie *Capsicum frutescens*, porém, os caracteres agrônômicos apontam que tais cultivares são, na verdade, pertencentes a espécie *C. annuum*.

Marcadores moleculares, sobretudo microssatélites, são ferramentas úteis para caracterização de germoplasma tanto para *Capsicum* spp. quanto para as demais espécies vegetais. A caracterização molecular tem sido aplicada para estimar a diversidade genética de acessos silvestres e cultivados, por exemplo, em abóbora (Priori *et al.* 2012), pimentão e pimentas (Nicolai *et al.* 2013; Villela *et al.* 2014; Dhaliwal *et al.* 2014) e tomate (Vargas *et al.* 2015). Além disso, uma aplicação da caracterização molecular que está em expansão, consiste em utilizá-la para atestar ou comprovar a identidade e pureza genética de cultivares comerciais para fins de proteção intelectual e defesa de direitos do obtentor ou mantenedor. Em relação à segurança e proteção de direitos de propriedade intelectual, podem ser encontrados trabalhos de caracterização molecular de cultivares de abóbora (Sim *et al.* 2015), batata (Favoretto *et al.* 2011), pimentas e pimentões (Kumar *et al.* 2001; Kwon *et al.* 2005).

O presente trabalho utilizou marcadores microssatélites para caracterizar molecularmente genótipos de *Capsicum* spp., a fim de checar em nível de DNA, a espécie do gênero *Capsicum* a que pertencem as cultivares 'Amarela Comprida', 'De Cayenne' e 'Cayenne Long Slin' e, desta forma, promover a checagem das informações disponíveis no *Cultivarweb* quanto a espécie dessas cultivares.

### 3.1.2. REVISÃO

#### 3.1.2.1. Origem e domesticação de *Capsicum* spp.

A origem e distribuição inicial do gênero *Capsicum* é difícil de determinar devido a um longo histórico de dispersão antrópica desde tempos pré-históricos (Walsh and Hoot, 2001). Além disso, a ausência de registros fósseis completos tem limitado uma reconstrução mais precisa da origem, domesticação e dispersão destas plantas (Perry et al., 2007).

Contudo, evidências arqueológicas foram obtidas no México e, apontam que humanos já usavam espécies silvestres de *Capsicum* como fonte de alimento há aproximadamente 7.200 anos A.C. (Pickersgill, 1966; Heiser, 1969; Walsh and Hoot, 2001; Kraft et al., 2014).

Segundo McLeod et al. (1982), a Bolívia deve ser considerada um importante centro de diversidade para o gênero *Capsicum* e, especificamente, a região centro sul da Bolívia é o núcleo da migração para as demais regiões consideradas como centro de diversidade secundários como as regiões mesoamericanas, andinas e amazônicas.

A partir de uma combinação de evidências arqueológicas e análises genéticas, diferentes trabalhos sugerem que tanto as espécies silvestres quanto as domesticadas foram originadas em diferentes regiões na América Central e América do Sul. Assim, quanto à origem das cinco espécies de importância econômica, acredita-se que *C. annuum* foi inicialmente domesticada no México ou Norte da América Central; *C. frutescens* no Caribe; *C. baccatum* em terras baixas na Bolívia; *C. chinense* no norte da Amazônia; e, *C. pubescens* no sul dos Andes (Pickersgill, 2007; Perry et al., 2007; Ibiza et al., 2012).

Desde o início, o processo de domesticação das espécies do gênero *Capsicum*, implicou em importantes mudanças evolutivas para as plantas deste gênero que contribuíram para que estas espécies apresentassem a diversidade genética e fenotípica que exibem na atualidade (Pickersgill, 2007).

Em geral, as diferenças morfológicas entre as espécies silvestres e cultivadas são notórias. Assim, as espécies silvestres de *Capsicum* apresentam frutos com cores e tamanhos que são atrativos para pássaros, além desses frutos

serem decíduos, ou seja, caem no chão quando muito maduros e suas sementes são espalhadas no solo enquanto estão ainda viáveis. Por outro lado, as espécies domesticadas apresentam formato e cor de fruto que variam segundo o interesse do homem, sendo que algumas espécies podem apresentar gigantismo de frutos, flores, sementes e folhas. Além disso, os frutos são retidos no pedúnculo mesmo depois de maduros (Cochran, 1940; Eshbaugh, 1976; Pickersgill, 2007).

Apesar do processo de domesticação das plantas de *Capsicum* ter sido iniciado pelos povos pré-colombianos há mais de 7000 anos A.C., o grande impulso para a domesticação das pimentas e pimentões ocorreu após a introdução dos frutos de tais plantas no continente Europeu, sobretudo da espécie *C. annum*, pelo navegador expansionista, Cristóvão Colombo, depois de regressar de sua viagem exploratória ao “Novo Mundo”. Isto porque, após a introdução na Península Ibérica, as pimentas e pimentões conquistaram rapidamente todo o mundo (Walsh and Hoot, 2001).

As principais implicações evolutivas da domesticação das espécies de *Capsicum* devem-se ao fato do processo de domesticação ter ocorrido de forma independente em diferentes regiões do mundo, o que culminou em diferentes mudanças no sistema reprodutivo das espécies, nos mecanismos de dispersão e, na estrutura genética das populações (Oyama et al, 2006).

Pickersgill (2007) aponta que a seleção artificial antrópica durante o processo de domesticação das espécies de *Capsicum* conduziu, sobretudo, às seguintes modificações: i) aumento no tamanho, principalmente do fruto, devido ao aumento no tamanho e número de células, sem que isso fosse resultante de alteração de ploidia ou quantidade de DNA; ii) diversidade de cores e formatos de frutos; iii) grau de pungência dos frutos; e iv) adaptações a diferentes condições edafoclimáticas e diferentes altitudes.

O isolamento reprodutivo, uma consequência das mudanças induzidas pelo processo de domesticação independente dessas espécies, impossibilita a ocorrência natural de híbridos interespecíficos, bem como dificulta a obtenção de híbridos sintéticos (Pickersgill, 1971; Walsh and Hoot, 2001; Pickersgill, 2007)

Ibiza et al. (2012) estudaram a diversidade genética de diferentes populações das espécies *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. baccatum* oriundas da Bolívia, Equador e Peru. Esses autores concluíram que havia divergência genética notável entre tais populações de pimentas de mesma

espécie, mas que foram amostradas em países vizinhos. Pickersgill (2007) e Ibiza et al. (2012) afirmam que estas espécies sofreram diferentes processos de domesticação de acordo com a preferência alimentar dos povos ancestrais que habitavam essas regiões e, esta seleção contínua, conduziu a alterações na estrutura genética das populações e, conseqüentemente, diferenciação ao nível fenotípico e genético.

### 3.1.2.2. Importância econômica

As espécies do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas no mundo, desde os tempos pré-colombianos, sobretudo em regiões tropicais, sendo utilizados para consumo *in natura* ou como matéria-prima para as indústrias alimentícia (molhos e pápricas), farmacêutica, cosmética e bélica (*spray* de pimenta) (Andrews, 1984; Than et al., 2008; Büttow et al., 2010).

De acordo com a FAO (2016), os cinco maiores produtores de pimentas e pimentões no mundo são China, México, Turquia, Indonésia e Espanha, sendo que a produção de pimentas pela China ultrapassou naquele ano a marca de 17 milhões de toneladas de frutos. Em adição, o continente asiático é responsável por cerca de 70% da produção mundial de pimentas (FAO, 2016).

O cultivo de pimentões e pimentas no Brasil está principalmente relacionado à agricultura familiar e aos complexos agroindustriais (Rufino e Penteado, 2006), sendo que as principais regiões produtoras são Nordeste, Sul e Sudeste (IBGE, 2017).

Além da produção para consumo *in natura*, a produção de pimentões e pimentas para uso como condimento de diversos produtos alimentícios industrializados cresceu significativamente nos últimos anos. Esses produtos são utilizados no preparo de alimentos, no processamento de conservas e na indústria de embutidos. Os frutos também são comercializados na forma de geleias, molhos e *blends* (vidros com misturas de frutos usados como peças para decoração de casas) (Nascimento et al., 2012).

Quanto à importância nutricional, os frutos de *Capsicum* destacam-se por serem fontes de vitamina C, carotenoides, vitamina E, vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, B-6 e ácido fólico), vitamina A, além de tocoferóis, flavonoides e capsaicinoides (Wahyuni et al., 2013). Os frutos possuem também

proteínas, glicídios, lipídeos e minerais, sendo, ainda, fontes importantes de fibras (Reifschneider, 2000).

No que diz respeito à importância medicinal, destacam-se: i) a aplicação farmacêutica da capsaicina na fabricação de antioxidantes, anticancerígenos, antiartrites e analgésicos; ii) produção de analgésicos para dores musculares a partir da oleoresina extraída dos frutos; iii) produção de anti-inflamatórios naturais; iv) O uso como termogênico e moderador de apetite natural (Adams, 2007; Akbar et al., 2010; Ashrafi et al., 2012; Lim, 2013).

Em relação ao potencial bélico da pimenta, os índios brasileiros Caetés foram pioneiros a usar a pimenta como arma, sem imaginar que séculos depois a oleoresina de pimenta em aerossol ou em espuma, os famosos 'pepper spray' e 'pepper foam', seriam utilizados pela polícia (Da Costa e Henz, 2007).

Por fim, plantas do gênero *Capsicum* podem também ser utilizadas como ornamentais, em razão da folhagem variegada, do porte anão e dos frutos com diferentes cores no processo de maturação (Moreira et al., 2006; Hill et al., 2013; Silva et al., 2015).

### 3.1.2.3. Botânica

O gênero *Capsicum* compreende cerca de 35 espécies, sendo que apenas as espécies *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., e *C. pubescens* Ruiz et Pav. são domesticadas e economicamente importantes (McLeod et al., 1982; Oyama et al., 2006; Perry et al., 2007; Ibiza et al., 2012, Carrizo et al., 2013).

Em geral, as plantas de *Capsicum* são arbustivas e perenes, entretanto, são normalmente cultivadas como plantas herbáceas anuais em regiões temperadas (Heiser, 1995), e apresenta considerável variação morfológica, como por exemplo: pubescência de folhas e caules, que varia de não pubescente a muito pubescente; inflorescências, variando de solitárias a até sete flores em um mesmo nó; o cálice, que pode variar de longo com sépalas verdes ou sépalas truncadas, ou ainda com projeções semelhantes a espinhos; a corola, que pode ser circular ou campanulada, com alta variação na coloração entre as espécies; as sementes que são cor de creme, exceto aquelas de *C. pubescens*, que são pretas (Lippert et al. 1966; Moscone et al. 1993; Walsh and Hoot, 2001).

Os frutos são do tipo baga, sendo ocós como uma cápsula e, variam de acordo com a coloração, formato e pungência. Quanto à coloração, os frutos maduros são, geralmente, vermelhos, mas também podem ser amarelos, verdes, roxos e até pretos. Em relação ao formato, esta característica varia entre as espécies ou ainda dentro das espécies, podendo haver frutos alongados, globosos, campanulados, oblongos, cônicos e retangulares (Carvalho e Bianchetti, 2004).

Uma característica marcante deste gênero é a presença do alcaloide capsaicina, o qual confere a pungência aos frutos, sendo produzida por glândulas na placenta dos frutos de algumas das espécies. A explicação evolutiva para a pungência das pimentas deriva da hipótese da capsaicina ser uma estratégia natural para evitar que mamíferos se alimentassem desses frutos e, assim, evitar que as sementes fossem inviabilizadas por seus aparelhos digestivos. Contudo, as aves, por não comprometerem a viabilidade das sementes em seu aparelho digestivo, evoluíram para não serem afetadas pela pungência. Este fato não somente contribuiu para o enriquecimento da dieta das aves, mas, sobretudo, para ampliar o alcance da dispersão das sementes destas plantas (Borges, 2001).

#### **3.1.2.4. Cariótipo e estrutura do genoma de *Capsicum* spp.**

As espécies do gênero *Capsicum*, salvo algumas exceções, são diploides ( $2n = 24$  e, às vezes,  $2n = 26$ ) (Pickersgill, 1977). Normalmente, atribui-se o número cromossômico  $n = 12$  para espécies domesticadas e  $n = 13$  para as espécies silvestres (Lippert et al., 1966; Moscone et al., 1993; Walsh and Hoot, 2001; Pozzobon et al., 2006; Scaldaferrro et al., 2013; Cheema e Pant, 2013).

Limaye e Patil (1989) estudaram a cariomorfologia de 21 espécies e variedades de *Capsicum*. Eles perceberam que cromossomos em todas as espécies e/ou variedades avaliadas apresentavam um tamanho médio com centrômeros submetacêntricos. Em adição, assim como percebido por Lippert et al. (1966), Limaye e Patil (1989) perceberam que havia variações no comprimento dos cromossomos entre as espécies e/ou variedades avaliadas, o que sugeriria, simultaneamente, uniformidade e diversidade.

Scaldaferrro et al. (2013) analisando o tipo, quantidade e distribuição de heterocromatina em 11 espécies silvestres de pimentas (*Capsicum* spp.)

sugeriram que um ancestral do gênero *Capsicum* deveria apresentar um número básico de cromossomos  $x = 12$ , um genoma pequeno, fórmula do cariótipo composta por cromossomos  $11m + 1 st$ , duas RONS ativas no complemento básico, pouca heterocromatina *GC-rich* e um padrão de bandeamento simples como um cariótipo simétrico. Ainda, foi sugerido que a origem de espécies com  $x = 13$  ocorreu em dois eventos independentes, os quais resultaram em dois subgrupos de espécies que apresentavam  $2n = 26$  e, as fórmulas cariotípicas dessas espécies tendem a apresentar mais de um cromossomo *sm* ou *st*, ou ainda, um cromossomo *t*.

O conteúdo de DNA nuclear é uma característica cariológica bastante útil para estudos de sistemática e evolução (Bennett e Leitch, 1995). Assim, partindo desse pressuposto, Moscone et al. (2003) avaliaram por meio das técnicas de citometria de fluxo e densitometria de Feulgen o tamanho do genoma de espécies domesticadas e silvestres e, concluíram que o tamanho do genoma das espécies do gênero *Capsicum* varia entre 3273 a 5655 Mb, possuindo assim o segundo maior genoma dentro da família Solanaceae. Em acréscimo, segundo Qin et al (2014), o genoma das espécies desse gênero, sobretudo das cultivadas, apresenta cerca de 35.000 genes codificadores de proteínas conhecidas, sendo que cada gene é formado em média por 3.000pb.

Segundo Scaldaferrero et al. (2013) e Cheema e Pant (2013), mudanças na heterocromatina, bem como em sequências repetidas no genoma (tais como elementos de transposição) tiveram um papel fundamental na evolução do cariótipo de espécies de *Capsicum*. Em acréscimo, Scaldaferrero et al. (2013), em concordância com Moscone et al (2003), concluem que a quantidade de heterocromatina constitutiva é positivamente correlacionada com o comprimento do cariótipo e tamanho do genoma.

Tam et al. (2009) sugerem que eventos de retrotransposição tiveram um importante papel durante a especiação do gênero *Capsicum* e, portanto, permitem estabelecer relações filogenéticas entre as espécies, bem como contribuíram para a diversidade genética entre os genomas das diferentes espécies deste gênero. Por outro lado, Tam et al. (2009) apontam que inserções não promoveram mudanças genéticas com implicações filogenéticas para o gênero *Capsicum*, o que revela que as inserções são bem toleradas pelos genomas das espécies deste gênero.

### 3.1.2.5. Complexos gênicos de *Capsicum* spp.

O gênero *Capsicum* é dividido em três complexos gênicos (Pickersgill, 1971; Ibiza et al., 2012). De acordo com Harlan e De Wet (1971), a divisão em complexos gênicos remete a capacidade de cruzamento entre as espécies e a fertilidade dos híbridos resultantes destes cruzamentos.

Inicialmente, taxonomistas distribuíram as espécies do gênero *Capsicum* em dois grupos: um caracterizado por frutos pequenos e vermelhos e outro caracterizado por frutos grandes (Cochran, 1940; Eshbaugh, 1976; Eshbaugh 1980; Pickersgill, 1969; Walsh and Hoot, 2001). Esta classificação primária foi eficaz em separar as espécies silvestres daquelas domesticadas, porém não possui relevância evolucionária (Walsh e Hoot, 2001).

Segundo Pickersgill (1988), a despeito da separação das espécies em diferentes complexos gênicos e a aparente incompatibilidade entre espécies de grupos distintos, é possível obter híbridos interespecíficos de *C. baccatum*, *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* em diferentes combinações, entretanto, a espécie *C. pubescens* demonstra ser a mais isolada geneticamente das demais. Além disso, normalmente, as espécies cultivadas são autocompatíveis, assim, a autofecundação é naturalmente favorecida em detrimento da polinização cruzada. Entretanto, a polinização cruzada pode ser obtida com alterações provocadas na morfologia floral e a presença de insetos polinizadores.

De acordo com Walsh e Hoot (2001), a atual classificação taxonômica e os complexos gênicos do gênero *Capsicum* foram construídos de acordo com análises isoenzimáticas, análises de híbridos, análises citogenéticas e comparação de caracteres morfológicos, além de técnicas de biologia molecular.

Assim, de acordo com os trabalhos de Pickersgill (1971), McLeod et al. (1982), Pickersgill (1991), Walsh e Hoot (2001) e Ibiza et al. (2012) as espécies do gênero *Capsicum* estão distribuídas entre os seguintes complexos gênicos:

**1) Complexo *C. annuum*:** compreende as espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. galapagoense* (Pickersgill, 1971; Ibiza et al., 2012). Este grupo não apresenta caracteres morfológicos que permitam unir as suas espécies, porém ele é plausivelmente defendido por análises isoenzimáticas e análises de combinações híbridas (McLeod et al., 1982; Walsh and Hoot, 2001). A

espécie *C. annuum* inclui diversas variedades e cultivares, sendo caracterizada por corolas brancas, verdes ou púrpuras, além de frutos de colorações, tamanhos e formatos diversos. A espécie *C. frutescens* apresenta corola branco-esverdeada e frutos vermelhos ou alaranjados, carnosos, globosos ou subcônicos e com aproximadamente 2,5 cm de comprimento. A espécie *C. chinense* apresenta corola branca (raramente esverdeada) frutos carnosos com aproximadamente 1,5 cm de comprimento de diversos formatos e cores. A espécie *C. galapagoense* é a mais distinta de todas as espécies deste grupo (extrema pubescência; folhas pequenas; frutos vermelhos, anões e globosos, semelhantes a frutas silvestres; flores brancas; além de emanarem odor agradável quando tocadas). Toda essa diferença morfológica deve ser atribuída ao fato de que esta espécie é endêmica das ilhas Galápagos (Walsh and Hoot, 2001).

**2) Complexo *C. baccatum*:** compreende as espécies *C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* e *praetermissum*), *C. chacoense* (Pickersgill, 1991; Walsh and Hoot, 2001; Ibiza et al., 2012) e *C. tovarii* (Tong e Bosland, 1999; Ibiza et al., 2012). Este grupo é caracterizado por ser morfológicamente diverso. Acredita-se que o grupo *Baccatum* tenha surgido no centro-sul da Bolívia em ambientes secos e de baixa altitude.

*C. baccatum* (variedades *baccatum*, *pendulum* e *praetermissum*) possui corola branca ou creme (exceto var. *praetermissum* que tem flores com bordos violáceos) com um par de pontos amarelados na base de cada pétala, os frutos tem formato distinto para cada variedade.

*C. chacoense* apresenta corola branca e frutos pequenos (1,5 cm de comprimento), oblongos e vermelhos. Apesar de Pickersgill (1971) sugerir a inclusão da espécie *Capsicum chacoense* no Complexo *C. annuum*, os trabalhos de Walsh and Hoot (2001) e Ibiza et al. (2012) afirmam que o posicionamento dessa espécie em algum dos complexos gênicos do gênero *Capsicum* ainda não está resolvido.

*C. tovarii* apresenta corola creme (às vezes com bordos violáceos), com um par de pontos amarelados na base de cada pétala e frutos globosos, vermelhos e pequenos (1 cm). Tong e Bosland (1999) e Ince et al (2010) defendem o agrupamento de *C. tovarii* no complexo *C. baccatum*, baseando-se

em hibridações bem sucedidas e análises moleculares, respectivamente. Todavia, alguns trabalhos questionam a inclusão *C. tovarii* no complexo *C. baccatum*, alegando que as relações filogenéticas de *C. tovarii* com as demais espécies do complexo *C. baccatum* ainda não estão totalmente esclarecidas (Walsh and Hoot, 2001; Moscone et al., 2007; Ibiza et al., 2012).

**3) Complexo *C. pubescens*:** *C. cardenasii*, *C. eximium* e *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Ibiza et al., 2012). Estas espécies formam híbridos naturais que são mais férteis do que alguns cruzamentos entre variedades de mesma espécie (Ibiza et al., 2012). As espécies deste grupo podem ser encontradas desde regiões xerofíticas de baixas altitudes até as montanhas dos Andes (Walsh and Hoot, 2001).

*C. cardenasii* e *C. eximium* apresentam flores com corolas de cor púrpura com bases amarelo-esverdeadas, além de frutos pequenos (1 cm), vermelhos e esféricos. Apesar de suas semelhanças morfológicas, estas espécies são distinguidas entre si por 12 diferenças moleculares. *C. pubescens* apresenta flores com corolas cor púrpura (às vezes creme com margens púrpura) e frutos grandes (2 cm) e globosos, que apresentam diversidade de cores. Acredita-se que esta diversidade deve-se à domesticação e cultivo (Walsh and Hoot, 2001; Bosland e Votava, 2012).

#### **3.1.2.6. Melhoramento de *Capsicum* spp.**

Na antiguidade, as pimentas e pimentões foram cultivados e selecionados para diferentes propósitos pelos povos nativos das Américas, aos quais é atribuído o título de “primeiros melhoristas” do gênero *Capsicum*. Muitas das variedades cultivadas de pimentas e pimentões, na atualidade, foram desenvolvidas por estes povos ancestrais (Padilha e Barbieri, 2016).

Os métodos de melhoramento mais aplicados às plantas do gênero *Capsicum* são: seleção massal, método genealógico, retrocruzamento, seleção recorrente, *Single seed descente* (SSD) e hibridação (Padilha e Barbieri, 2016). A escolha do método depende do objetivo do programa de melhoramento (Padilha et al., 2015).

Tradicionalmente, os programas de melhoramento de *Capsicum* spp. visam os seguintes resultados: incremento de produtividade, aprimoramento de características dos frutos (cor, sabor e pungência), resistência a pragas e doenças e tolerância a estresses abióticos (Manzur et al., 2014).

No Brasil, o programa de melhoramento de *Capsicum* spp. mais antigo relatado na literatura é o mantido pela Embrapa Hortaliças, o qual está em vigência desde 1981 (Reifschneider et al., 2016). Ao longo de 37 anos de existência, este programa foi responsável pelo lançamento de 19 cultivares de *Capsicum* spp. (RNC, 2018).

O programa de melhoramento genético de *Capsicum* spp. realizado pela UENF teve início em 1998, a partir de um projeto de pesquisa visando a identificação de fontes de resistência à mancha bacteriana do pimentão, bem como estudar a capacidade combinatória entre genótipos de *C. annuum* L. para a obtenção de híbridos resistentes (Costa et al., 2002). Desde então, diversos projetos de pesquisa envolvendo o pimentão e também com outras espécies do gênero *Capsicum* vêm sendo executados para múltiplas finalidades. Os principais métodos de melhoramento utilizados ao longo deste programa foram os métodos genealógico e o SSD (*single seed descent*).

Dentre os trabalhos concluídos no âmbito do programa de melhoramento genético de *Capsicum* spp da UENF, destacam-se os seguintes resultados específicos para o melhoramento da espécie *Capsicum annuum* L: identificação dos acessos UENF 1381, UENF 1496, UENF 1498, UENF 1558, UENF 1573, UENF 1578 e UENF 1585, como fontes de resistência à mancha bacteriana (Sudré, 2003); a indicação da combinação UENF 1421 x UENF 1381, como superior para obtenção de cultivares resistentes à mancha bacteriana com características agrônomicas desejáveis (Costa et al., 2002); identificação de três genes recessivos, controlando a resistência à mancha bacteriana no cruzamento UENF 1421 x UENF 1381 (Riva et al., 2004); identificação de 18 linhas endogâmicas recombinadas promissoras para resistência à mancha bacteriana (Riva, 2006; Riva-Souza et al., 2009); identificação e seleção de oito linhas dentre as 18, identificadas nos trabalhos anteriores, sendo estas linhas resistentes à mancha bacteriana e portadoras de características agrônomicas desejáveis (Moreira, 2008; Moreira et al. 2009; 2010); ensaios preliminares de DHE e VCU para as oito linhas selecionadas por Moreira (2012); Conclusão dos ensaios de

DHE e VCU, seguidos pela proteção e registro das cultivares 'UENF Campista', 'UENF Carioca' e 'UENF Carioquinha' (Pimenta, 2015; Pimenta et al., 2016)

As cultivares 'UENF Campista', 'UENF Carioca' e 'UENF Carioquinha' derivam de linhas em F<sub>9</sub>, respectivamente as linhas L1, L8 e L6, obtidas pelo método SSD, a partir do cruzamento entre os acessos UENF 1421 e UENF 1381. O acesso UENF 1421 é suscetível à mancha bacteriana, entretanto, apresenta produtividade e qualidade de fruto que atendem as demandas do Mercado. O acesso UENF 1381 é considerado como fonte de resistência à mancha bacteriana, cujo controle genético é exercido por três genes recessivos (Riva et al., 2004; Pimenta, 2015; Pimenta et al., 2016).

### **3.2.1.7. Caracterização Morfológica**

A caracterização morfológica tem sido utilizada em estudo de diversidade genética (Costa et al., 2015), na conservação de recursos genéticos vegetais (Vilella et al., 2014), na seleção em programas de melhoramento (Moreira, 2012), durante os ensaios para obtenção da proteção e registro de cultivares (Pimenta, 2016).

A Biodiversity International, desde 1976, tem disponibilizado listas de descritores morfológicos a serem utilizados para caracterização de acessos das mais diversas espécies vegetais, visando facilitar a documentação dos recursos genéticos vegetais e o uso destes recursos em benefício da agricultura (Gotor e Cherfas, 2010).

Os descritores morfológicos disponibilizados pela Biodiversity International tem sido suficientes para realização de estudos de diversidade genética e avaliação de recursos genéticos vegetais (Vilella et al., 2014; Costa et al., 2015).

Todavia, quando o objetivo da caracterização morfológica é a proteção e registro de obtensões vegetais, suas respectivas leis estabelecem descritores morfológicos específicos a cada caso.

Na forma da Lei 9.456/97, os ensaios prévios à proteção de cultivares (ensaios de Distingüibilidade, Homogeneidade e Estabilidade – DHE), uma lista oficial de descritores mínimos para a espécie deve ser disponibilizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Enquanto, para obter o registro da cultivar, é preciso realizar ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), os quais requerem os seguintes dados: genealogia, principais características morfológicas, biológicas e/ou fisiológicas que identificam a cultivar, relatório técnico indicando a produtividade, comportamento ou reação às principais pragas e doenças, região de adaptação e outros dados que justifiquem a sua importância para o mercado nacional e internacional (Carvalho *et al.*, 2009).

Entretanto, a caracterização morfoagronômica, não oferece total segurança devido à insuficiência ou escassez de polimorfismo, plasticidade ambiental, dependência do estágio de desenvolvimento da planta e do tipo de herança dos caracteres (Costa *et al.*, 2009).

Nesse sentido, os marcadores moleculares podem ser úteis ferramentas auxiliares para os casos em que não podem ser solucionados apenas com base em caracterização morfológica devido as suas limitações. Portanto, de acordo com Aviani e Santos (2011), os marcadores podem ser empregados na comprovação da origem genética da cultivar (teste de paternidade), na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização.

### **3.2.1.8. Marcadores Moleculares**

Marcadores moleculares são sequências de nucleotídeos usados para investigação e detecção de possíveis polimorfismos em sequências de nucleotídeos no genoma de indivíduos distintos. Polimorfismos são variações nas sequências de nucleotídeos e podem ser ocasionados por: inserção, deleção, duplicação e translocação (Nadeem *et al.*, 2017).

Portanto, um marcador molecular ideal é aquele que apresenta uma boa cobertura no genoma, reprodutibilidade e alto poder de detecção de polimorfismos (Mondini *et al.*, 2009).

Diferentes marcadores moleculares têm sido aplicados com sucesso em plantas para estudos evolutivos e filogenéticos, investigação de heterose, genotipagem de cultivares, estudos de diversidade genética, monitoramento da introgressão de genes em retrocruzamentos, mapeamento genético, mapeamento de QTLs, seleção genômica ampla, seleção assistida por marcadores, entre

outras abordagens (Nadeem *et al.*, 2017). Dentre estes marcadores moleculares, destacam-se: RFLP, RAPD, AFLP, SSR ou microssatélites, ISSR, CAPS, SCAR e SNP.

*Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) foi à primeira técnica de marcadores moleculares e a única baseada em hibridização. A técnica consiste na extração de DNA puro e mistura com enzimas de restrição derivadas de bactérias, que são usadas para cortar DNA em *loci* específicos (sítios de restrição). Isso resulta em um grande número de fragmentos com diferentes comprimentos (polimorfismo). A separação destes fragmentos é feita por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, produzindo uma série de bandas com diferentes comprimentos. Deleções, mutações, inversões, translocações e transposições de pares de bases são as principais causas da variação. Essas variações levam ao ganho ou perda de sítios de restrição, resultando em polimorfismo (Madhumati, 2014).

A técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) foi desenvolvida por Williams *et al.* (1990) e Welsh e McClelland (1990), independentemente. A amplificação do DNA genômico é obtida por PCR usando um único *primer* aleatório de 10 nucleotídeos. Os fragmentos amplificados são totalmente dependentes do comprimento e tamanho do genoma e do *primer*. O produto de PCR é então separado em gel de agarose corado com brometo de etídio. O polimorfismo presente nos sítios de ligação ou entre os *primers* pode ser detectado na eletroforese pela confirmação da presença ou ausência de bandas específicas (Nadeem *et al.*, 2017).

As limitações presentes na técnica de RAPD e RFLP foram superadas pelo desenvolvimento de marcadores AFLP. Os marcadores AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) combinam a tecnologia RFLP e PCR, na qual a digestão do DNA é feita por duas enzimas de restrição e, em seguida, a PCR é realizada. Cada extremidade dos fragmentos resultantes é ligada com os oligonucleotídeos de acordo com a sua especificidade. Isto leva à amplificação apenas dos fragmentos que foram cortados por estes cortadores. Para o desenvolvimento de *primers*, sequências conhecidas de adaptadores são usadas para pescar uma sequência de DNA desconhecida. Após a realização da PCR, a visualização é feita em gel de agarose ou gel de poliacrilamida corado com AgNO<sub>3</sub> (Vos *et al.*, 1995).

Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) foram primeiramente aplicados em plantas, mais precisamente, em soja, por Akkaya et al. (1992). Conforme descrito por Akkaya et al. (1992), SSR é uma técnica baseada em PCR que apresenta marcadores codominantes e multialélicos com alto conteúdo informativo e alto poder de discriminação. Os *primers* usados nesta técnica também são conhecidos como microssatélites e podem ser repetições de di-, tri- e tetra- ou penta-nucleotídeos. Interpretação e avaliação dos padrões de bandas são realizadas e a avaliação dos produtos de PCR é realizada para investigação do polimorfismo, seja em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida.

A técnica *Inter Simple sequence Repeat* (ISSR) foi desenvolvida por Zietkiewicz et al. (1994). Baseia-se na amplificação de segmentos de DNA (PCR) localizados entre duas regiões de repetição de microssatélites idênticas, mas orientadas de forma oposta, a uma distância que permite a amplificação. Normalmente, *primers* longos com tamanho de 15 a 30 bases são usados nesta técnica. O ISSR permite o uso bem sucedido de alta temperatura de anelamento (cerca de 45-60°C); os produtos amplificados têm 200-2000 pb de comprimento e podem ser visualizados em gel de agarose ou poliacrilamida. Segregando-se por leis de herança mendelianas, são caracterizados como marcadores dominantes (Zietkiewicz et al., 1994).

Marcadores do tipo *Cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS) foram inicialmente chamados de marcadores PCR-RFLP devido à combinação de RFLP e PCR (Maeda et al., 1990). Nesta técnica, o DNA alvo é amplificado usando PCR e, em seguida, sua digestão é realizada com enzimas de restrição. Gel de agarose ou gel de acrilamida é usado para a visualização de produtos CAPS (Jarvis et al., 1994).

*Sequence-characterized amplified region* (SCAR) foi desenvolvido em 1993 por Paran e Michelmore. Os marcadores SCAR são co-dominantes, mono-locus e mais específicos e reprodutíveis do que o RAPD. O desenvolvimento de marcadores SCAR inclui a purificação de fragmentos de PCR e o desenho do *primer* SCAR. Bandas polimórficas são detectadas usando gel de agarose e então a sequência de nucleotídeos do fragmento de DNA selecionado é investigada. A análise da sequência deste DNA polimórfico é feita comparando-o com o banco de dados de sequências de DNA conhecido. Em seguida, essa sequência de

nucleotídeos do DNA polimórfico é utilizada para a síntese de *primers* SCAR específicos (Paran and Michelmore, 1993; Yang *et al.*, 2013; Bhagyawant, 2016).

As mudanças em sequências de um único de par de bases presentes no genoma de um indivíduo são conhecidas como SNPs. Os SNPs podem ser transições (C / T ou G / A) ou transversões (C / G, A / T, C / A ou T / G) com base na substituição de nucleotídeos. Uma base de nucleotídeo único é a menor unidade de herança e o SNP pode fornecer o número mais simples e máximo de marcadores. Os SNPs estão presentes em abundância em plantas e animais e são amplamente distribuídos dentro do genoma. Diferentes tipos de ensaios de genotipagem de SNPs foram desenvolvidos com base em diferentes mecanismos moleculares. Entre eles, a extensão do iniciador, a clivagem invasiva, a ligação oligonucleotídica e a hibridização específica do alelo são as mais importantes. Além disso, vários métodos de genotipagem de alto rendimento, como NGS, GBS e NGS baseado em chips, PCR específico de alelo, tornam os SNPs os marcadores mais atraentes para a genotipagem (Sobrino *et al.*, 2005).

### **3.1.2.9. Caracterização Molecular**

A caracterização molecular consiste no uso de marcadores moleculares para acessar informações genéticas de populações e indivíduos (espécies silvestres, raças locais e cultivares). Portanto, a caracterização molecular tem sido uma importante aliada do melhoramento genético e conservação de recursos genéticos vegetais.

No tocante à conservação de recursos genéticos vegetais, a caracterização molecular tem facilitado a estimativa sobre a diversidade genética das coleções de germoplasma; a diferenciação, avaliação e identificação de acessos; a identificação de duplicatas; e o estabelecimento de coleções nucleares (Rodrigues *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao melhoramento genético vegetal, a caracterização molecular tem possibilitado a investigação, o monitoramento e o acesso à diversidade genética; o monitoramento da introgressão de genes; a seleção de genótipos; o mapeamento genético; e o *DNA fingerprinting* de cultivares (Nadeem *et al.*, 2017).

Especificamente, a caracterização molecular visando o *DNA fingerprinting* de cultivares tem sido aplicada no apoio aos processos para o registro e proteção de cultivares (Aviani e Santos, 2011), bem como na solução de disputas judiciais pelo abuso do direito patrimonial de outrem (Kumar et al., 2001; Kwon et al., 2005; Favoretto et al., 2011; Sim et al., 2015).

Diversos trabalhos foram publicados na última década, tendo como alvo a caracterização molecular de cultivares das mais distintas espécies e utilizando as diferentes técnicas e marcadores moleculares.

Santos et al. (2010) promoveram a caracterização molecular de 44 cultivares de cebola, usando 30 marcadores microssatélites. Martins et al. (2011) efetuaram a caracterização molecular de sete variedades de abacate (*Persea americana*) com cinco marcadores microssatélites. Purkayastha et al. (2012) caracterizaram molecularmente seis acessos da pimenta 'Butt Jolokia' por meio de marcadores ITS. Prasad et al. (2013) obtiveram a caracterização molecular de 10 cultivares de *Capsicum annuum* L. por meio de marcadores RAPD. Vilella et al. (2014) realizaram a caracterização molecular de 20 variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*) com 08 marcadores microssatélites. Campos et al. (2016) fizeram a caracterização molecular de 21 acessos do gênero *Capsicum* via marcadores ISSR. Souza et al. (2017) executaram a caracterização molecular de 34 cultivares de café (*Coffea arabica*), empregando 31 marcadores microssatélites.

### **3.1.2.10. Registro de Cultivares**

A regulamentação da produção, comércio e beneficiamento de sementes foi primariamente realizada pelo Decreto nº 81.771, de 7 de junho de 1978. A partir dessa legislação, foram criados o Sistema Brasileiro de Avaliação e Recomendação de Cultivares (Portaria nº 178, de 21 de julho de 1981) e o Sistema Brasileiro de Registro de Cultivares (Portaria nº 271, de 06 de outubro de 1982), sob coordenação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Carvalho et al., 2009).

Posteriormente, o Registro Nacional de Cultivares (RNC) foi instituído por meio da Portaria nº 527, de 30 de dezembro de 1997, publicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA.

Atualmente, o RNC é regido por meio da Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003, e regulado pelo Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004. O RNC é de responsabilidade da Coordenação de Sementes e Mudas - CSM, do Departamento de Fiscalização de Insumos Agrícolas - DFIA, da Secretaria de Defesa Agropecuária – DAS, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA.

O RNC tem por finalidade habilitar, no Brasil, a produção, o beneficiamento e a comercialização de sementes e mudas de cultivar pertencente a qualquer espécie (Brasil, 2003).

De acordo com a Lei nº 10.711/03 (Brasil, 2003), cultivar consiste na variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja distinguível, homogênea e estável quanto aos descritores morfológicos, possua denominação própria, e seja cultivável nas condições edafoclimáticas nacionais ou regionais.

A inscrição de cultivar no RNC deverá ser requerida por pessoa física ou jurídica que: a) tenha desenvolvido a nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada no País e, portanto, detém o status de obtentor de acordo com a Lei nº 9.456, de 25 de abril de 1997; b) seja o obtentor da cultivar no exterior e que tenha introduzido a nova cultivar no país; ou c) seja um permissionário do obtentor (Brasil, 2004). A pessoa física ou jurídica que detém o direito patrimonial sobre a cultivar registrada é denominada mantenedor (Brasil, 2003).

Assim, o procedimento formal para o registro de nova cultivar requer que o solicitante apresente: comunicação prévia da instalação de ensaios para avaliação de Valor de Cultivo e Uso (VCU); carta de encaminhamento/requerimento; Guia de Recolhimento da União (GRU) e comprovante de pagamento; formulário específico para a espécie contendo os descritores mínimos da cultivar, os resultados dos ensaios de VCU e a declaração da existência de estoque mínimo de material básico.

O VCU consiste no valor intrínseco de combinação das características agrônômicas da cultivar com as suas propriedades de uso em atividades agrícolas, industriais, comerciais e/ou de consumo in natura (Brasil, 2003).

Os ensaios de VCU devem obedecer aos critérios estabelecidos pelo MAPA, além de apresentar delineamento estatístico que permita a observação e avaliação dos caracteres agrônômicos da cultivar, bem como a avaliação do seu desempenho agrônômico (Brasil, 2004).

Em Dezembro de 2018, havia 5.118 cultivares registradas no banco de dados do RNC (*CultivarWeb*) para as mais distintas espécies, sendo 763 registros relativos a cultivares da espécie *Capsicum annuum* L.

### 3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.3.1. Germoplasma

Sete genótipos do gênero *Capsicum* foram usados para a realização deste ensaio de caracterização molecular. Os genótipos utilizados foram correspondentes as cultivares registradas 'UENF Campista', 'Cascadura Ikeda', 'Amarela Comprida', 'De Cayenne', 'Cayenne Long Slin', 'Malagueta' e ao acesso UENF 2154.

As cultivares UENF Campista e Cascadura Ikeda constituíram padrões para a espécie *Capsicum annuum*, enquanto a cultivar 'Malagueta' e o acesso UENF 2154 constituíram padrão para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense*, respectivamente.

As cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin, compuseram o objeto de estudo deste ensaio de caracterização molecular com o intuito de checar a espécie de *Capsicum* a que pertencem, uma vez que, a informação de espécie disponível no CultivarWeb não é a mesma observada na embalagem das sementes, e as características descritas para as cultivares não correspondem à descrição existente na literatura para as espécies que lhes são atribuídas.

Para checagem do nível de homozigose das cultivares amostradas e da pureza genética das sementes, cada cultivar foi representada por um *bulk* composto por uma amostra de cinco plantas.

As plantas foram cultivadas por 45 dias em vasos de 500 mL em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa do *Campus* Leonel Brizola da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Após esse período, as plantas estavam prontas para a coleta de amostras foliares para a etapa de extração de DNA.

### 3.1.3.2. Extração de DNA

Para extração do DNA foram utilizadas amostras foliares de cada uma das sete cultivares supracitadas e, aproximadamente, 300 mg de tecido foliar foi macerado e transferido para tubos de 1,5 µL e imersos em N<sub>2</sub> líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990), com modificações.

A quantificação do DNA foi realizada com uso do fluorímetro Qubit 3.0 (INVITROGEN). Posteriormente, as amostras foram diluídas e padronizadas a concentração de 5 ng.µl<sup>-1</sup>, para serem submetidas as reações de polimerase em cadeia (PCR).

### 3.1.3.3. Reações de Amplificação

Oitenta marcadores microssatélites disponíveis na literatura (Lee et al. 2004; Yi et al. 2006; Minamiyama et al. 2006) foram selecionados com base em informações sobre o nível de polimorfismo, especificidade para *C. annuum* e posição no genoma (Tabela 1). É importante destacar que a escolha por marcadores microssatélites foi embasada nas recomendações constantes no documento técnico da UPOV (*International Union for the Protection of New Varieties of Plants*) (UPOV 2010).

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 13 µL, contendo os seguintes reagentes: 0,12 µl de Taq DNA polimerase, 1,3 µl de tampão 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,3), 1,0 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,5 µl de dNTP (0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1,0 µl de *primer* a 5Mm e 6,08 ul de água ultrapura.

Em seguida, as reações foram conduzidas em termociclador modelo Veriti da *Applied Biosystems*, da seguinte forma: 4 min a 94°C para desnaturação inicial; 38 ciclos incluindo 94°C por 1 min, 52-60°C por 1 min (dependendo do *primer* utilizado), 72°C por 3 min; e uma extensão final a 72°C por 7 min.

**Tabela 1.** Listagem dos marcadores microssatélites específicos para *Capsicum* spp. usados para caracterização molecular de genótipos de *Capsicum* spp..

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>Hpms 1-1*</b>	F tcaacccaatattaaggtcacttcc	R ccaggcggggattgtagatg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-3</b>	F tgggaaataggatgcgctaaacc	R aacttaagactcaaaatccataacc	9	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-5</b>	F ccaaacgaaccgatgaacactc	R gacaatgttgaaaaaggtggaagac	6	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-41</b>	F gggatcatccggtgaaagtagg	R caagaggtatcacaacatgagagg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-43</b>	F aaccagcaatcccatgaaaacc	R gggctttggggagaatagtgtg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-62</b>	F catgaggtctcgcgatgattcac	R ggagaaggaccatgtactgcagag	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-69</b>	F cggtggcatgtagtttctggag	R aagacatgaaatccacaagtttc	4	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-117</b>	F acccaaattgccttgttgat	R aatccataaccttatcccataaa	9	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-139</b>	F ccaacagtaggacccgaaaatcc	R atgaaggctactgctgcatcc	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-148</b>	F ggcggagaagaactagacgattagc	R ccaccaatccacatagacg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-155</b>	F acgaggcccaagctgttatgtc	R ttgtcccgactctccattgacc	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-165</b>	F ggctatttccgacaaaccctcag	R ccattggtgtttcactgtgtg	4	Lee <i>et al.</i> 2004

Tabela 1 – Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>Hpms 1–168</b>	F gccccgatcaatgaatttcaac	R tgattttgggtggagagaaaacc	16	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–172</b>	F gggtttgcgatgactaagcatttt	R cgctggaatgcattgtcaaaga	11	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–173</b>	F tgctgggaaagatctcaaaagg	R atcaaggaagcaaaccaatgc	3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–214</b>	F tgcgagtaccgagtctttctag	R ggcagtcctgggacaactcg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–216</b>	F tgcttggtgtttaccctcagc	R agtgaaaggtgggcaacagc	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–227</b>	F cgtggcttcaagatggactgc	R ggggcggaacttttctatcc	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–274</b>	F tcccagaccctcgtgatag	R tcctgctcctccacaactg	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1–281</b>	F tgaggcagtggtatggtctgc	R cccgagttcgtctgccaatag	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–2</b>	F gcaaggatgcttagtgggtgtc	R tcccaaaattacctgcagcac	11	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–13</b>	F tcacctcataagggttatcaatc	R tccttaaccttacgaaaccttg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–21</b>	F ttttcaattgatgcatgaccgata	R catgtcattttgtcattgattgg	10	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–23</b>	F ccctcggctcaggataaaatacc	R ccccagactcccactttgtg	5	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–24</b>	F tcgtattggcttgattaccg	R ttgaatcgaataccgcaggag	9	Lee <i>et al.</i> 2004

Tabela 1 – Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>Hpms 2–26</b>	F gggatgtaggaacaaccctaacc	R tgcactctttctcatccccttc	1,3,5	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2–45</b>	F cgaaaggtagtttgggccttg	R tgggcccaatatgcttaagagc	5	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsAT2–14</b>	F tttagggttccaactcttctcc	R ctaaccccaccaagcaaaacac	4	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsAT2–20</b>	F tgcactgtctgtgttaaaatgacg	R aaaattgcacaaatatggctgctg	6	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsCaSIG19</b>	F catgaattcgtcttgaaggctcc	R aagggtgatcgtacgcagcctta	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmshpMADS</b>	F tgctttcaaaacaatttgcattg	R vgcgtctaatagcaaaacacacattac	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>CACCEL1</b>	F ctctaataaggcaatagctcacatgc	R gcagtctcccagaacgttgctc	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AA840689</b>	F gacaacataggcggaccttgg	R tgcttaggtctacgtccttgac	3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AA840692</b>	F tggaagtgattactggaaacatgc	R ggggttagtcatggaatctttgc	3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AA840721</b>	F cacttgatagctgaacacttcc	R agtttgactggtcctgctc	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AF242731</b>	F gggctgacggccattaagaac	R cagacagctagaaagagaggaattctg	16	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AF244121</b>	F tacctcctcgccaatccttctg	R ttgaaagttctttccatgacaacc	1,3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>CAN010950</b>	F gattttggtggcagaagaattgg	R tgcactttcgaagcaaaacaacc	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AF208834</b>	F tgcaccaaggtccagtaagggtg	R ccaaccaccatggttcatacaag	6	Lee <i>et al.</i> 2004

Tabela 1 – Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>HpmsE001</b>	F tgccaccataaaaattcttaaacca	R tgcaagatcccaaattgaaatga	2	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE003</b>	F tttctgaattccccttgttca	R cagcagagccttcagtagcagc	2	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE004</b>	F tgggaagagaaattgtgaaagca	R caatgccaacaatggcatccta	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE005</b>	F tgccctcagtttccaaccct	R accaacaccgtaacgcaccc	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE006</b>	F gctgaccgtttctgtttggg	R caaaattcaaccgcaccaaca	4	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE007</b>	F cccatttccccttcccata	R gaggggtcatgtgaaggcaa	9	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE008</b>	F ccccttaactttaattctagatctgc	R tcgttgttctccatcacctca	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE009</b>	F tgcacaaacatcatacacctca	R cccatgactgatagtcggggtc	2	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE010</b>	F ctgtttgccaatcaccatcagg	R gctattttccggcgtgtgagag	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE011</b>	F gcagaagaccaaagccctagca	R tggtttcattgtcactgtatgc	6	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE012</b>	F aaacgctgaaaaaggcgttgac	R tgcaccaacttcttccatgcac	11	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE013</b>	F gcgccaagtgagttgaattgat	R caccaatccgcttgctgttgta	10	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE014</b>	F ctttgaacatttctttggggg	R gcggacgtagcagtaggtttgg	6	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE015</b>	F ttgtgagggttgacactggga	R ccgagctcgatgaggatgaact	5	Yi <i>et al.</i> 2006

Tabela 1 – Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>HpmsE016</b>	F ccaagttcaggcccaggagtaa	R tgcagagaagactcaccagtcc	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE019</b>	F aagtcacagctgcaaagacca	R ttcaacatgcatccagcttctt	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE020</b>	F cccccgagaggaacagaatcat	R ttccattttggtccagctacca	7	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE021</b>	F cacactaagcattctgctttcaca	R ggaggggaatagtagcggtttggga	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE022</b>	F gcaccagcatcaacatcagcat	R cagcaggtgaaggacttgacaga	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE023</b>	F ttaaacacctcttaaccgtcacc	R gcgatttcagcccatcaacaat	11	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE024</b>	F cgagcctaaccacccaaatcag	R aagggaacggaggacgactac	12	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE025</b>	F tgagcatcccgttatctcaaatca	R cccaattcttcaggcaatctcc	9	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE026</b>	F ccaaagtcacatcgacgtctcaa	R atcaaatggcaaaccaggagga	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE027</b>	F tggagaattggtgttacatgaagg	R ttcggacccttctccatcactt	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE029</b>	F gatggagaagatcgccgacaag	R tacatcagcaggtttgcctcca	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE030</b>	F gaagcaggggcccagagctaga	R gcccccaattctcaaacagaga	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE031</b>	F ccctaaatcaaccccaaattcaa	R ccccatcactgactgcaaaa	10	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE033</b>	F tggatcctccttctacttcaaca	R aagggtggtgaaaaggggattt	1	Yi <i>et al.</i> 2006

Tabela 1 – Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>CAMS-156</b>	F ccctatgctttcacaactcct	R gacgtggttatgacgataggc	10	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-215</b>	F cgtgggtgttctaggatgat	R gctggcaagtcaactctggat	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-311</b>	F ggtgcgctagagatggagag	R tttgagtgttcgggactggt	6	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-340</b>	F tttatgcccattcacaaaataa	R ggacgaattcaccgagtgc	10	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-398</b>	F atggtccatggtcagcagat	R gggcagaacagtggatgatt	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-405</b>	F ttcttgggtcccacactttc	R aggttgaaaggagggaata	11	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-424</b>	F tccacagcccacagtgtcta	R gcttgtggttccgtgatttt	6	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-451</b>	F tgcattggtgggctaacata	R gctcttgacacaacccaat	11	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-460</b>	F cctttcaactcagcccacat	R accatccgctaagacgagaa	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-606</b>	F gactagtccccgttcaacca	R tttgcgagaagatgcttcag	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-811</b>	F gaagaaacgaaggatgaacaaaa	R cctgtttcctcttcctcagc	9	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-844</b>	F gcaaagaaaaagaaaagcctga	R ctgcaactgctgcttcattc	1	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-855</b>	F aagtgtcaaggaaggggaca	R cctaaccacccccaaaagtt	8	Minamiyama <i>et al.</i> 2006

#### **3.1.3.4. Eletroforese**

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose de alta resolução concentrado a 4% por um sistema de eletroforese horizontal. Os produtos da PCR, antes de serem submetidos à eletroforese, foram corados com uma solução de *Blue Juice* e *Gel Red* (1:1). Posteriormente, os géis foram submetidos à fotodocumentação por luz ultravioleta (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System).

Após esta etapa, apenas os marcadores microssatélites considerados polimórficos para o material em estudo foram usados para a “construção” de uma planilha de codificação numérica baseada no padrão das bandas observadas nas imagens dos géis.

#### **3.1.3.5. Análise de Dados**

Inicialmente, utilizou-se os programas GenAEx (Peakall & Smouse, 2012) e PowerMarker (Liu & Muse 2005) para a determinação matemática dos seguintes estimadores de diversidade genética para os acessos avaliados: número de alelos; número de alelos efetivos; número de loci com alelos privados por acesso; índice de fixação; heterozigidade observada e índice de Shannon.

Em seguida, a análise de diversidade genética entre as cultivares foi realizada pelo programa Genes (Cruz, 2013), sendo os dados processados utilizando-se o complemento do índice de similaridade ponderado. Esta análise gerou uma matriz com medidas de dissimilaridade entre os genótipos, a qual foi usada para a análise de agrupamento pelo método hierárquico de ligação média entre grupo (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*) pelo programa Genes e a Análise de Coordenadas Principais no programa GenAEx.

### **3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um total de 33 dentre os 80 marcadores microssatélites testados mostraram-se polimórficos para o germoplasma em estudo e, por esta razão, somente esses foram computados e usados para a análise dos dados.

Os 33 marcadores microssatélites analisados geraram 76 alelos (Na), apresentando uma média de 2,3 alelos por loco. Esse número deve-se ao fato de que os genótipos avaliados são linhas em nível avançado de homozigose. O número de alelos efetivos (Ne) variou de 1,153 (CAMS-451) a 3,000 (Hpms E016), com uma média igual a 1,691. Esses valores são esperados quando os genótipos investigados são pertencentes a espécies autógamas e intimamente relacionadas geneticamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados da análise de locos microssatélites realizada pelo programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012) para sete genótipos de *Capsicum* spp. para estimativa do número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), Índice de Shannon (I), heterozigosidade observada (Ho) e índice de Fixação (F).

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>F</b>
<b>Hpms 11</b>	2,000	1,508	0,520	0,143	0,576
<b>Hpms 13</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms 15</b>	3,000	1,342	0,509	0,143	0,440
<b>Hpms 141</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms 143</b>	2,000	1,960	0,683	0	1,000
<b>Hpms 162</b>	2,000	1,849	0,652	0,143	0,689
<b>Hpms 1117</b>	3,000	1,556	0,656	0,143	0,600
<b>Hpms 1139</b>	2,000	1,960	0,683	0,857	-0,750
<b>Hpms 1148</b>	3,000	1,815	0,796	0,286	0,364
<b>Hpms 1173</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms 1216</b>	2,000	1,324	0,410	0	1,000
<b>Hpms 1281</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms 221</b>	3,000	2,178	0,876	0,857	-0,585
<b>Hpms AT214</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000

Tabela 2. Cont.

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>F</b>
<b>Hpms AT220</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms hpMADS</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>AA840692</b>	2,000	1,324	0,410	0	1,000
<b>AF242731</b>	2,000	1,960	0,683	0	1,000
<b>Hpms E003</b>	2,000	1,324	0,410	0	1,000
<b>Hpms E004</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms E007</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>Hpms E009</b>	2,000	1,324	0,410	0	1,000
<b>Hpms E014</b>	3,000	2,333	0,956	0	1,000
<b>Hpms E016</b>	3,000	3,000	1,099	0	1,000
<b>CAMS-215</b>	3,000	1,412	0,566	0,167	0,429
<b>CAMS-340</b>	2,000	1,471	0,500	0	1,000
<b>CAMS-398</b>	3,000	2,178	0,876	0,857	-0,585
<b>CAMS-424</b>	2,000	1,690	0,598	0	1,000
<b>CAMS-451</b>	2,000	1,153	0,257	0,143	-0,077
<b>CAMS-460</b>	2,000	1,324	0,410	0	1,000
<b>CAMS-606</b>	2,000	1,508	0,520	0,143	0,576
<b>CAMS-811</b>	3,000	1,556	0,656	0,286	0,200
<b>CAMS-855</b>	3,000	1,556	0,656	0,143	0,600
<b>Total</b>	76,000	55,811	---	---	---
<b>Média</b>	2,303	1,691	0,611	0,130	0,681

O índice de Shannon, o qual também é uma estimativa de diversidade, variou de 0,257 (CAMS-451) a 1,099 (Hpms E016) com uma média de 0,611, enquanto, a heterozigosidade observada (Ho) variou de 0,857 a 0 (locos fixados) e, apresentou valor médio de 0,130.

Ao considerar os valores das estimativas de diversidade genética (Ho e I), percebe-se que diversidade genética entre os acessos pode ser considerada

baixa, o que corrobora o fato dos genótipos avaliados serem linhagens de espécies autógamas pertencentes a um mesmo complexo gênico (Complexo *C. annuum*). Este complexo contempla quatro espécies *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. chacoense*. Portanto, era esperado que os locos tendessem a um nível médio a baixo de polimorfismo e, conseqüentemente, resultasse na constatação de um baixo nível de diversidade genética entre cultivares de espécies diferentes e entre cultivares da mesma espécie.

Os valores observados no Índice de Fixação (F) ( $F = -0,750$  a  $1,000$ ) apontam para um nível de médio a alto de homozigose dos acessos *per se* considerando os locos investigados. Destaca-se que o índice de Fixação (F) pode apresentar valores na faixa de  $-1$  a  $+1$ . Valores próximos a zero indicam cruzamento ao acaso; valores negativos indicam excesso de heterozigidade, devido à seleção de heterozigotos e acasalamento tendencioso entre fenótipos semelhantes; por fim, elevados valores positivos indicam elevada endogamia (Peakall & Smouse, 2012). Em adição, pode-se conjecturar que o índice de fixação ainda corresponde a uma estimativa de diferenciação entre e dentro acessos, bem como fazem um diagnóstico da variabilidade de cada loco em termos do nível de homozigose ou heterozigose.

Em outra análise, percebeu-se entre os locos analisados a ocorrência de alelos privados ( $A_p$ ) para cada genótipo. A cultivar 'De Cayenne' apresentou o maior número de alelos privados ( $A_p = 18$ ), enquanto a cultivar 'Malagueta' exibiu o menor número de alelos privados ( $A_p = 6$ ) (Tabela 3). Os genótipos de *C. annuum* apresentaram um quantitativo de alelos privados muito superior àquele observado para as espécies *C. frutescens* e *C. chinense*.

**Tabela 3.** Análise de Alelos Privados realizada pelo programa GenAIEx (Peakall & Smouse, 2012) a partir dos dados da análise molecular via microssatélites a que foram submetidos cada genótipo de *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense* analisados.

<b>Cultivar</b>	<b>Ap</b>	<b>Locos com Alelos privados</b>
<b>UENF CAMPISTA</b>	16	Hpms 13; Hpms 141; Hpms 143; Hpms 162; Hpms 1148; Hpms 1173; Hpms 1281; Hpms 221; Hpms AT214; Hpms AT220; Hpms hpMADS; AF242731; Hpms E004; Hpms E014; CAMS-398; CAMS-424.
<b>IKEDA</b>	15	Hpms 13; Hpms 141; Hpms 162; Hpms 1148; Hpms 1173; Hpms 1281; Hpms 221; Hpms AT214; Hpms AT220; Hpms hpMADS; AF242731; Hpms E004; Hpms E014; CAMS-398; CAMS-424.
<b>AMARELA COMPRIDA</b>	16	Hpms 13; Hpms 141; Hpms 162; Hpms 1148; Hpms 1173; Hpms 1281; Hpms 221; Hpms AT214; Hpms AT220; Hpms hpMADS; AF242731; Hpms E004; Hpms E014; CAMS-340; CAMS-398; CAMS-424.
<b>DE CAYENNE</b>	18	Hpms 13; Hpms 141; Hpms 143; Hpms 162; Hpms 1148; Hpms 1173; Hpms 1281; Hpms 221; Hpms AT214; Hpms AT220; Hpms hpMADS; Hpms E004; Hpms E007; Hpms E014; Hpms E016; CAMS-398; CAMS-424; CAMS-451.
<b>CAYENNE LONG SLIN</b>	17	Hpms 13; Hpms 141; Hpms 143; Hpms 162; Hpms 1148; Hpms 1173; Hpms 1281; Hpms 221; Hpms AT214; Hpms AT220; Hpms hpMADS; Hpms E004; Hpms E007; Hpms E014; Hpms E016; CAMS-398; CAMS-424.
<b>MALAGUETA</b>	6	Hpms 15; Hpms 1117; CAMS-215; CAMS-398; CAMS-460; CAMS-855.
<b>UENF 2154</b>	8	Hpms 1117; Hpms 1216; Hpms 221; AA840692; Hpms E003; Hpms E009; CAMS-811; CAMS-855.

A detecção de alelos privados, além de ser um indicador da ocorrência de fluxo gênico ou não, reflete o nível de relacionamento genético entre os acessos ou populações em estudo (Szpiech & Rosenberg, 2011). Assim, quanto maior o número de alelos privados, menor o fluxo gênico e, conseqüentemente, o portador do maior número de alelos privados tende a ser o mais distante geneticamente dentre os demais de uma mesma espécie, gênero ou população.

Considerando essa variável, observa-se que há grande divergência genética entre as cultivares reconhecidamente pertencentes às espécies *C. frutescens* e *C. chinense* (respectivamente, 'Malagueta' e UENF 2154) das cultivares 'Amarela Comprida', 'De Cayenne' e 'Cayenne Long Slin', bem como das cultivares usadas como padrão para a espécie *C. annuum* (Cascadura Ikeda e UENF Campista).

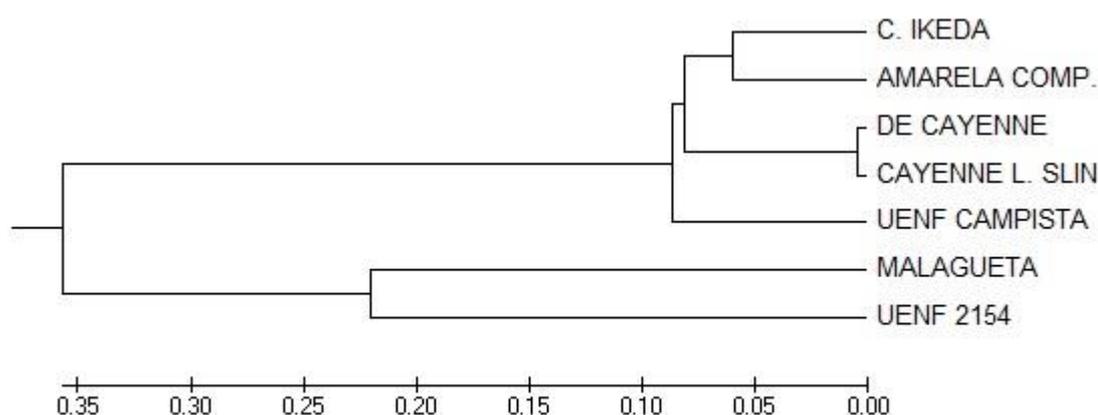
Devido ao expressivo número de alelos privados que foram detectados por genótipo, esses marcadores podem ser recomendados para trabalhos de caracterização molecular de acessos de *Capsicum* spp., ou em outros ensaios visando a obtenção de *DNA fingerprints*.

A análise de diversidade genética entre os acessos realizada pelo programa GENES (Cruz, 2013) gerou uma matriz de dissimilaridade, a qual apresentou uma correlação com a matriz de valores cofenéticos no valor de 0,99. Quanto mais próximo o valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) for de 1, menor é a distorção do agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA (Silva & Dias, 2013). Assim, o elevado valor de coeficiente de correlação cofenética observado no presente trabalho corresponde a uma alta consistência e confiabilidade dos agrupamentos observados no dendrograma a partir da matriz de dissimilaridade foi possível obter o dendrograma por meio da análise de agrupamento realizada pelo programa MEGA aplicando o método UPGMA.

No dendrograma (Figura 1), pode ser observada a formação de três grupos de cultivares, as quais estão reunidas por espécie do gênero *Capsicum*. O estabelecimento dos grupos foi feito de forma subjetiva, tendo por base as mudanças acentuadas nos níveis, associado ao conhecimento prévio do material em estudo, desse modo, estabelecendo o ponto de corte em 0.225.

O primeiro grupo reuniu as cultivares relacionadas à espécie *C. annuum*: UENF Campista, Cascadura Ikeda, Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin. A composição do primeiro grupo, tal como exposta acima, era

esperada, uma vez que as cultivares UENF Campista e Cascadura Ikeda foram usadas como padrão para a espécie *C. annuum* e, havia a hipótese de que as cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin também pertenciam a esta espécie. O segundo grupo apresentou apenas a cultivar da espécie *C. frutescens* Malagueta, a qual foi usada como padrão para esta espécie nesse estudo. O terceiro grupo ou grupo da espécie *C. chinense* apresentou apenas o acesso UENF 2154, o qual está catalogado no Banco de Germoplasma de *Capsicum* da UENF como pertencente a esta espécie.

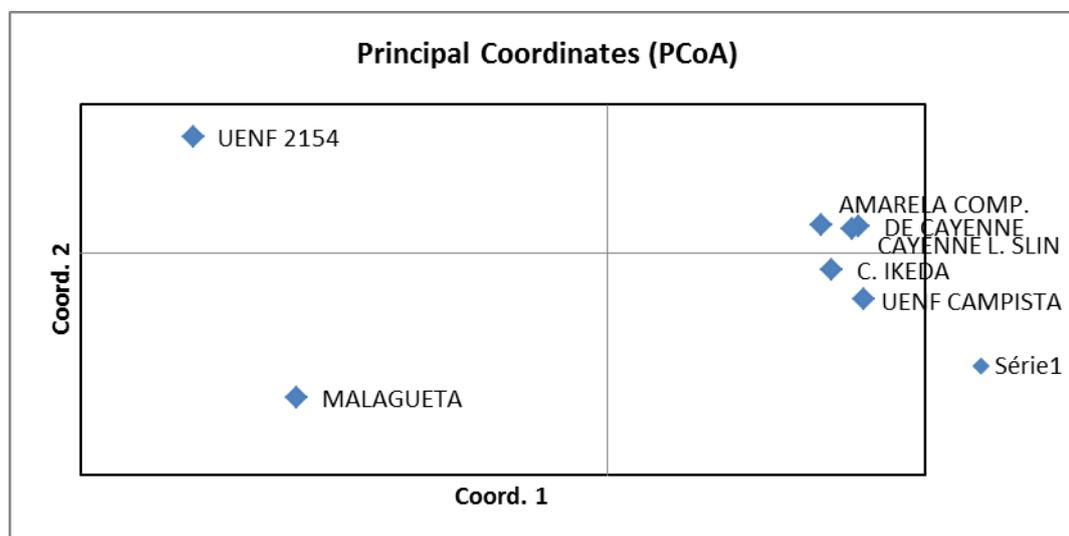


**Figura 1.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA resultante da análise de agrupamento a que foram submetidos os genótipos de *Capsicum* em estudo.

A análise de agrupamento, especificamente no que tange à composição do primeiro grupo, comprova que as cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin não pertencem à espécie *C. frutescens*, conforme consta no quadro de informações destas cultivares no banco de dados *CultivarWeb*, mas à espécie *C. annuum*.

A Análise de Coordenadas Principais (PCOA) apresentou um gráfico (Figura 2), no qual as cultivares foram distribuídas e agrupadas em três grupos de acordo com o relacionamento genético e, conseqüentemente, segundo suas respectivas espécies. A porcentagem da variação explicada pelos eixos 1 e 2 foram, respectivamente, 83,70% e 11,96%. Isso significa que aproximadamente

95% de toda variabilidade contida nos genótipos em estudo pode ser explicada no plano bidimensional com baixo nível de distorção das informações.



**Figura 2.** Gráfico de Coordenadas Principais obtido pela matriz de dissimilaridade resultante da análise de diversidade genética entre os genótipos de *Capsicum* spp. em estudo.

Assim, analisando o gráfico de PCOA, nota-se que as cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin são geneticamente mais próximas das cultivares usadas como padrão para a espécie *C. annuum* do que das cultivares representantes das espécies *C. frutescens* e *C. chinense* (respectivamente, 'Malagueta' e UENF 2154).

Trabalhos envolvendo caracterização morfológica também são capazes de promover a diferenciação entre genótipos de diferentes espécies do gênero *Capsicum* (Campos et al., 2016). Para tanto, são utilizados descritores morfológicos e agrônômicos propostos para *Capsicum* pelo IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*, renomeado *Biodiversity International*). Entretanto, essa metodologia demanda mais tempo e recursos que a aplicação de marcadores moleculares, além de apresentarem maior suscetibilidade à influência ambiental.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para uma provável imprecisão na identificação das cultivares testadas ('Amarela Comprida', 'De

Cayenne' e 'Cayenne Long Slin') quanto à espécie no banco de dados *CultivarWeb*.

A situação ainda se torna pior, quando é levado em consideração a realização de uma busca simples na plataforma *CultivarWeb* usando a expressão "Cayenne long" e, dois resultados são apresentados, aparentemente, remetendo a cultivares distintas. Em um resultado é exibida a cultivar Cayenne Long Slin, a qual é associada à espécie *C. frutescens* (esta cultivar foi testada no presente trabalho), enquanto, o segundo resultado apresenta a cultivar Cayenne long Slim, a qual é atribuída à espécie *C. annum*.

Quando se restringe a busca à palavra-chave "Cayenne", são apresentados sete resultados, os quais estão distribuídos entre a espécie *C. frutescens* (cultivares Ardidá Cayenne, Ardidá Vermelha Cayenne, Cayenne, Cayenne Long Slin, De Cayenne) e a espécie *C. annum* (cultivares Cayenne Long Slim e Dedo de Moça - Cayenne).

Os resultados das buscas efetuadas no *CultivarWeb*, conforme mostrado nos parágrafos anteriores, trazem informações incorretas, sobretudo, porque é reconhecido na literatura que pimentas do tipo *cayenne* ou *caiena* são pertencentes, exclusivamente, a espécie *C. annum* (Barbero et al., 2014).

Especificamente, ao compararmos as cultivares Cayenne Long Slin e Cayenne Long Slim, paira a dúvida se há diferença entre elas, além do erro ortográfico da língua inglesa na escrita da palavra *slim* (fino em espessura, magro) no nome da cultivar Cayenne Long Slin.

Além disso, a cultivar Amarela Comprida, apesar de estar registrada como pertencente à espécie *C. frutescens*, é reconhecida e comercializada como pertencente à espécie *C. annum* (Acesso disponível em: <http://pimentasartesanais.com.br/produtos.asp?produto=2511>).

Estes relatos, somados aos resultados deste trabalho, consistem em apenas uma amostra do quão confuso está o mercado de sementes no Brasil.

Assim como para o caso relatado no presente trabalho, é possível que outras inconsistências possam existir nas informações de cultivares registradas disponibilizadas pelo MAPA no *CultivarWeb* em relação a cultivares de *Capsicum*, bem como para os demais gêneros e espécies.

A detecção de inconsistências dessa natureza fragiliza a confiança tanto do produtor rural quanto dos melhoristas nas garantias que lhes são propostas pelos

órgãos governamentais, a saber: confiabilidade da identidade e qualidade genética da cultivar, além da pureza genética do material propagativo comercializado.

É importante ainda ressaltar que muitas das cultivares de *Capsicum* e outras hortaliças registradas na Plataforma *CultivarWeb* são importadas de outros países, não tendo sido resultado de programas de melhoramento genético conduzidos no país. Isso poderia ser uma das razões de inconsistência nas informações prestadas, pois a identificação incorreta das espécies poderia vir desde o país em que a cultivar foi desenvolvida. Especialmente no caso das plantas de *Capsicum*, não é incomum observar confusão na nomenclatura e identificação das espécies.

Recomenda-se ao MAPA que estabeleça mecanismos mais rigorosos de checagem e certificação das informações fornecidas pelo requerente nos documentos de solicitação de registro de cultivares, a fim de evitar a divulgação de informações imprecisas. Além disso, sugere-se uma revisão criteriosa das informações contidas em todos os processos de registro de cultivares que já foram concluídos e cujas informações já estão disponíveis ao público na plataforma *CultivarWeb*. É notório que a fiscalização desse tipo de informação recebida é complexa, pois todo o registro é feito com base em informações enviadas pela instituição pública ou privada interessada no registro das cultivares. Associado a isso, o número de fiscais agropecuários e as instalações atualmente disponíveis para análise das cultivares registradas ou em requisição é insuficiente para atender de forma eficaz a demanda. Por esse motivo, propõe-se que seja considerada a possibilidade de estabelecer o credenciamento de centros de pesquisa e universidades públicas como certificadores das informações declaradas a respeito da cultivar. Com a adoção de soluções como o estabelecimento instituições certificadoras parceiras, problemas de inconsistências nas informações constantes no banco de dados oficial para cultivares registradas, podem ser evitadas e se tornar inexistentes em médio prazo

### 3.1.5. CONCLUSÃO

Constatou-se que existe inconsistência quanto à informação da espécie do gênero *Capsicum* atribuída as cultivares Amarela Comprida, De Cayenne e Cayenne Long Slin no *CultivarWeb*, banco de dados oficial do Registro Nacional de Cultivares. Isso abre precedente para a necessidade de checar as informações apresentadas para as demais cultivares registradas constantes no *CultivarWeb*.

Portanto, recomenda-se ao MAPA que adote medidas para fortalecer os procedimentos atualmente empregados para a checagem e certificação das informações fornecidas pelo requerente nos documentos de solicitação de registro de cultivares, bem como medidas que promovam uma revisão e correção de possíveis inconsistências nas informações que já estão disponíveis à consulta pública através do *CultivarWeb*.

## **3.2. DNA FINGERPRINTING DE CULTIVARES DE *Capsicum annuum* L. DESENVOLVIDAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *CAPSICUM* DA UENF**

### **3.2.1. INTRODUÇÃO**

A propriedade intelectual é direito de propriedade sobre as criações intelectuais e, portanto, determina a titularidade dos direitos, a abrangência da proteção e delimita o uso e exploração econômica das criações. A propriedade industrial, os direitos autorais e as proteções *sui generis* são as principais áreas da propriedade intelectual (Barbosa, 2010).

As proteções *sui generis* abrangem a proteção aos direitos sobre as criações de topografia de circuitos integrados, obtenções vegetais (cultivares) e conhecimento tradicional associado (Barbosa, 2010). O termo *sui generis* (singular em latim) é atribuído a essa área da propriedade intelectual, uma vez que os objetos de proteção são tão singulares em suas características que não podem ser enquadrados nas legislações específicas das demais áreas da propriedade intelectual.

A União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV, sigla em francês para *Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales*) foi criada em 1961 durante a Conferência da União de Paris (UPOV, 1961). A missão da UPOV é promover um sistema de padronização internacional para proteção de variedades vegetais que reconheça e proteja os direitos de

propriedade aos melhoristas e obtentores, visando estimular o desenvolvimento de novas variedades vegetais para o benefício da sociedade.

A UPOV recomenda aos países signatários do acordo internacional a adoção de um modelo *sui generis* ou patentário para proteção dos direitos sobre as variedades vegetais em caráter temporário, sendo que os seguintes requisitos básicos devem ser observados ao conceder qualquer tipo de proteção: novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria (UPOV, 1961).

Portanto, a proteção de cultivares no Brasil adota a modalidade *sui generis*, sendo regida pela Lei nº 9456/97 (Lei de Proteção de Cultivares - LPC). A responsabilidade legal pela concessão da proteção sobre novas cultivares cabe ao Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), o qual foi criado pela LPC e está sob a regulamentação do Decreto nº 2.366/97. Além disso, compete ao SNPC à manutenção e atualização do Cadastro Nacional de Cultivares Protegidas, um banco de dados oficial. No Brasil, em dezembro de 2018 estavam protegidas 2.495 cultivares.

No domínio da proteção de cultivares, marcadores moleculares têm sido utilizados para a confirmação da origem genética da cultivar, a identificação de cultivares para soluções de conflito, nas atividades de fiscalização e na produção de informações complementares ao processo de proteção por meio da determinação do perfil genético da cultivar (Aviani e Santos, 2011). Entretanto, a UPOV recomenda por meio de documentos técnicos uma série de critérios a serem observados na escolha da técnica bem como dos marcadores a serem utilizados. Os marcadores que são indicados pela UPOV são os marcadores SSR e SNP (UPOV, 2010).

O presente trabalho utilizou marcadores SSR ou microssatélites para realizar um ensaio de DNA *fingerprinting* das três cultivares protegidas de *Capsicum annuum* L. desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de *Capsicum* da UENF com a finalidade de produzir informações complementares àquelas fornecidas durante o processo de proteção.

## 3.2.2. REVISÃO

### 3.2.2.1. Propriedade Intelectual

Conceitualmente, a propriedade intelectual é a propriedade imaterial resultante do intelecto humano. De acordo com Massaguer (2010), propriedade intelectual compreende a imaterialidade dos produtos da mente e da consciência humana, os quais devem ser passíveis de tangibilidade, difusão, reprodução, monopolização e proteção jurídica.

Existem dois principais motivos para que um país proteja juridicamente as criações intelectuais, a saber: i) a proteção jurídica das criações intelectuais concede direitos econômicos e morais ao criador, bem como assegura o direito do acesso público as criações, ao passo que estimula a geração de recursos que serão aplicados em futuras inovações; ii) a proteção da propriedade intelectual impulsiona o livre comércio, crescimento econômico, geração de emprego e renda, além de melhorar a qualidade de vida (WIPO, 2008).

Destaca-se que os direitos sobre a propriedade intelectual não visam à proteção do bem material fruto da criação intelectual, mas a proteção do bem imaterial que consiste na criação intelectual *per se* (Massaguer, 2010).

Em termos gerais, a legislação internacional acerca da propriedade intelectual resguarda os direitos de criadores e inventores, além de beneficiá-los com direitos de exploração econômica exclusiva sobre suas criações em caráter temporário (WIPO, 2008).

No âmbito jurídico brasileiro, a propriedade intelectual diz respeito aos direitos de propriedade sobre criações intelectuais, as quais constituem bens móveis imateriais. Os direitos de propriedade derivados das criações intelectuais são conferidos ao titular dos direitos (pessoa física ou jurídica) em caráter exclusivo e temporário, constituindo na prática um monopólio legal sobre a exploração econômica de sua criação (Bocchino *et al.*, 2010).

Difunde-se que foi na idade média que a propriedade intelectual começou a ser reconhecida em diferentes nações. Neste primeiro momento, cada nação concedia os direitos de propriedade ao artista ou inventor, segundo critérios próprios, mas reconhecendo o monopólio temporário para a exploração da referida invenção (FRANCO, 2001).

Entretanto, historicamente, os primeiros documentos oficiais que comprovam a proteção à propriedade intelectual remetem as cidades italianas de Florença e Veneza do século XV (Nard, 2007).

Nos séculos XVII e XVIII, surgiram na Europa, as primeiras leis sobre o tema da propriedade intelectual. Porém, a sistematização da propriedade intelectual apenas no âmbito nacional não conseguia suprir as demandas do mercado pós-revolução industrial, o que induziu a necessidade de criação de um sistema internacional de proteção da propriedade intelectual (SMITH, 2000).

Portanto, as primeiras discussões diplomáticas envolvendo a temática da padronização internacional da proteção dos direitos de propriedade relativos às criações intelectuais ocorreram a partir de 1880, durante uma Conferência Diplomática realizada em Paris, França. Entretanto, apenas em 1883, o sistema internacional de propriedade industrial foi instituído com a assinatura da Convenção da União de Paris (CUP). Desde então, sete revisões realizadas ao longo dos anos, introduziram modificações no texto de 1883. Roma sediou a primeira reunião em 1886, porém os atos assinados não foram ratificados por nenhum país. Seguiram-se as Revisões de Bruxelas (1900), Washington (1911), Haia (1925), Londres (1934), Lisboa (1958) e Estocolmo (1967) (Bodenhausen, 1968). O Brasil, país signatário original, aderiu à Revisão de Estocolmo em 1992 (Barbosa, 2010).

A WIPO (sigla em inglês para Organização Mundial da Propriedade Intelectual) foi criada durante a reunião da CUP de 1967 em Estocolmo. De acordo com a Convenção da WIPO a propriedade intelectual foi definida como o conjunto dos direitos inerentes às obras literárias, artísticas e científicas, às interpretações dos artistas intérpretes e às execuções dos artistas, aos fonogramas e às emissões de radiodifusão, às invenções em todos os domínios da atividade humana, às descobertas científicas, aos desenhos e modelos industriais, às marcas industriais, comerciais e de serviço, bem como às firmas comerciais e denominações comerciais, à proteção contra a concorrência desleal e proteção às demais criações intelectuais nos ramos industrial, científico, literário e artístico (WIPO, 1967).

A propriedade intelectual é dividida pela OMPI/WIPO em três áreas: propriedade industrial, direitos autorais e proteções *sui generis*. A propriedade industrial inclui patentes de invenção e modelo de utilidade, marcas, desenho

industrial e indicações geográficas. Os direitos autorais abrangem: o direito de autor sobre obras artísticas, científicas e literárias; os direitos conexos, os quais remetem aos direitos de artistas e intérpretes, bem como aos direitos sobre fonogramas e radiodifusão; os direitos sobre programas de computador, especificamente a proteção do código-fonte. Por fim, as proteções *sui generis* compreendem a proteção aos direitos sobre as criações de topografia de circuitos integrados, obtenções vegetais (cultivares) e conhecimento tradicional associado (Barbosa, 2010).

No Brasil, a proteção da propriedade intelectual é regulada pelas seguintes leis: Lei nº 9.279/96 (Lei da Propriedade industrial), a qual trata de patentes de invenção e modelo de utilidade, marcas, desenho industrial e indicações geográficas e repressão à concorrência desleal; Lei nº 9.609/98 (Lei de *Software*), a qual dispõe sobre a proteção da propriedade intelectual de programa de computador, sua comercialização no País, e dá outras providências; Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), a qual regula os direitos de autor e os que lhes são conexos; Lei nº 9.456/97 (Lei de Proteção de Cultivares), a qual concede proteção à nova cultivar e cultivar essencialmente derivada; Lei nº 11.484/2007 (Lei de Chip), a qual dispõe, dentre outros assuntos, sobre a proteção à propriedade intelectual das topografias de circuitos integrados; Lei nº 13.123/2015 (Lei de Biodiversidade), a qual dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.

### **3.2.2.2. Proteção de cultivares**

No final do século XIX, o mercado de sementes europeu começa a demandar a ampliação do escopo da proteção da propriedade intelectual para agricultura nos moldes da propriedade industrial. Entretanto, no início do século XX, os discursos em favor da proteção intelectual na agricultura perderam fôlego devido ao surgimento da preocupação com a possibilidade de elevação de preços dos produtos agrícolas derivados do direito de exploração econômica exclusiva (Dhar, 2002).

Apesar da iniciativa europeia, os EUA foram pioneiros na concessão e garantia de direitos de propriedade intelectual sobre novas obtenções vegetais,

quando em 1930 pela promulgação do *Plant Patent Act*, decidem alterar sua legislação para permitir o patenteamento de novas variedades de plantas de reprodução assexuada. Portanto, neste primeiro momento, a legislação excluía as novas variedades de plantas de reprodução sexuada, pois o entendimento à época era de que apenas as variedades assexuadas atendiam aos critérios mínimos de homogeneidade e estabilidade. Além disso, a legislação americana apenas exigiu que as novas variedades vegetais atendessem aos critérios de novidade e atividade inventiva, ficando estas dispensadas de relatório descritivo e comprovação de aplicação industrial (Barbosa, 2010).

A promulgação da legislação americana em favor da proteção das novas obtenções vegetais estimulou o processo de proteção das obtenções vegetais em vários países, o que ficou evidenciado com o surgimento das legislações nacionais na Holanda e Alemanha, bem como de associações internacionais sobre o tema (*International Association for the Protection of Industrial Property – AIPPI* e *Association of Plant Breeders for the Protection of Plant Varieties - ASSINSEL*) (Dhar, 2002).

O Brasil foi um dos primeiros países a se inspirar no modelo americano de proteções das obtenções vegetais, ao incorporar regras semelhantes no Art. 219 do Decreto-Lei 7903/45 que compunha seu primeiro Código da Propriedade Industrial. Entretanto, este dispositivo legal jamais foi regulamentado (Barbosa, 2010).

Em 1958, durante a Conferência Diplomática de Lisboa para revisão da Convenção da União de Paris, uma importante contribuição foi dada para a criação de um sistema de proteção *sui generis* para as variedades vegetais, o que conduziria a criação da União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (Dhar, 2002).

Na Conferência de Paris em 1961, foi criada a União Internacional para a Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV, sigla em francês para *Union Internationale pour la Protection des Obtentions Vegetales*). O acordo original da UPOV foi assinado em 02 de dezembro de 1961 e entrou em vigor em 1968. Contudo, três revisões do acordo original promoveram as modificações que deram origem aos Atos de 1972, 1978 e 1991 (Aviani e Machado, 2011).

A missão da UPOV é promover um sistema efetivo de proteção de variedades vegetais visando estimular o desenvolvimento de novas variedades vegetais para o benefício da sociedade.

Os propósitos fundamentais da UPOV são: i) reconhecer e assegurar os direitos do melhorista ou titular sobre a obtenção vegetal em todos os gêneros e espécies; ii) estabelecer um padrão legal internacional e acordo multilateral para a proteção das obtenções vegetais entre os países membros (UPOV, 1961).

Com a promulgação da Convenção da UPOV, fica estabelecida a recomendação de um modelo *sui generis* ou patentário para proteção dos direitos sobre as variedades vegetais em caráter temporário, sendo que os seguintes requisitos básicos devem ser observados ao conceder qualquer tipo de proteção: novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria (UPOV, 1961).

No Brasil, uma legislação nos moldes das recomendações da UPOV começa a tomar forma em 1976 no Ministério da Agricultura. Entretanto, apenas em 25 de abril de 1997 é promulgada a lei nº 9.456/97, a qual dispõe sobre a proteção de cultivares. Finalmente, em 1999, dois decretos são publicados confirmando a adoção da Ata de 1978 da UPOV pelo Brasil e a participação do Brasil como membro efetivo da UPOV, respectivamente o Decreto legislativo nº 28 e o Decreto nº 3.109 (Santos et al., 2012).

De acordo com Viana (2011), a proteção de cultivares no Brasil é conferida na modalidade *sui generis* (termo do latim que significa singular), posto que a legislação nacional sobre o tema apresenta características únicas e particulares adequadas ao objeto da proteção – novas variedades vegetais. Portanto, em conformidade com os preceitos da Ata de 1978 da Convenção da UPOV e em contrariedade aos requisitos fundamentais para a proteção patentária (novidade, atividade inventiva, aplicação industrial e suficiência descritiva), para a proteção das obtenções vegetais no Brasil faz-se necessário à adequação aos requisitos de novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria.

Nota-se que a singularidade jurídica da proteção de cultivares é marcada pela exclusão dos critérios de suficiência descritiva e aplicação industrial. Essa é uma exclusão lógica, uma vez que as variedades vegetais não podem ser geradas no contexto fabril e também não podem ser reproduzidas a partir de uma

simples descrição metodológica, pois dependem de características intrínsecas do germoplasma utilizado no programa de melhoramento.

Assim, segundo a Lei nº 9.456/97, cultivar consiste na variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior passível de uso pelo complexo agroflorestal (incluindo as linhagens parentais de híbridos) que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, seja homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas e possua denominação própria (Brasil, 1997).

Em acréscimo, na forma da Lei nº 9.456/97, os titulares dos direitos patrimoniais e morais sobre as novas obtenções vegetais (cultivares) são respectivamente, o obtentor e o melhorista. O obtentor é a pessoa física ou jurídica que obtiver nova cultivar ou cultivar essencialmente derivada no país e que, por isso, detém os direitos de propriedade. O melhorista é a pessoa física que obtiver cultivar e estabelecer descritores que a diferenciem das demais (Brasil, 1997).

Com base na Lei nº 9.456/97, os direitos de propriedade sobre as obtenções vegetais são de abrangência nacional e possuem vigência de 15 anos para espécies anuais e 18 anos para espécies perenes (Brasil, 1997).

Por meio do artigo 45 da Lei nº 9.456/97, foi criado no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares – SNPC (Brasil, 1997a), o qual é regulamentado pelo Decreto nº 2.366/97 (Brasil, 1997b). O SNPC recebeu a incumbência legal pela proteção de cultivares no Brasil e por manter o Cadastro Nacional de Cultivares Protegidas. O Cadastro Nacional de Cultivares Protegidas é acessado pelo banco de dados online “CultivarWeb” e, até dezembro de 2018, o quantitativo era de 2.495 de cultivares protegidas.

### **3.2.2.3. Aplicação de Marcadores Moleculares na Proteção de Cultivares**

De acordo com Aviani e Santos (2011), marcadores moleculares têm sido empregados como técnicas auxiliares nas análises dos processos de proteção de cultivares para as seguintes finalidades: i) confirmação da origem genética da

cultivar; ii) identificação de cultivares para soluções de conflitos; iii) atividades fiscalizatórias.

Portanto, a principal aplicação dos marcadores moleculares no âmbito da proteção de cultivares é na realização de ensaios comparativos entre cultivares, visando à obtenção do perfil genético ou *DNA fingerprinting* de uma cultivar de interesse. As informações obtidas destes ensaios são aceitas pelo SNPC como complementares ao processo de proteção (Aviani e Santos, 2011).

Todavia, existem recomendações internacionais elaboradas pelo Grupo de Trabalho em Técnicas Bioquímicas e Moleculares (BMT) da UPOV, as quais podem ser encontradas nos documentos “Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (“BMT GUIDELINES”)” e “Possible use of molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS)” (UPOV, 2010; 2011). O objetivo da elaboração e divulgação destes documentos é harmonizar as metodologias para obter dados moleculares de alta qualidade.

De acordo com os documentos técnicos elaborados pelo BMT/UPOV (UPOV, 2010), a seleção da técnica de análise molecular deve respeitar os seguintes critérios: reprodutibilidade; repetibilidade; poder discriminatório; potencial uso na construção de bancos de dados; acessibilidade da metodologia. Em adição, a escolha dos marcadores moleculares *per se* deve ser baseada nos requisitos: codominância; nível de polimorfismo gerado pelo marcador; robustez (reprodutibilidade e repetibilidade); possuir a posição no genoma conhecida.

Com base nestes critérios, as técnicas moleculares recomendadas pelo BMT para aplicação em ensaios de *DNA fingerprinting* ou caracterização molecular de cultivares visando dar suporte aos processos de proteção, são: *Simple Sequence Repeat* (SSR) e *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (UPOV, 2010).

### **3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.3.1. Germoplasma**

Nove cultivares de *Capsicum annum* L. foram usadas para a realização deste ensaio de *DNA fingerprinting* para as cultivares desenvolvidas no âmbito do programa de melhoramento genético de *Capsicum* spp. da UENF. Portanto, foram submetidas à metodologia de *DNA fingerprinting* as seguintes cultivares: 'UENF Campista', 'UENF Carioca', 'UENF Carioquinha', 'Cascadura Ikeda', 'All Big', 'Yolo Wonder (Quadrado)', 'Quadrado Vermelho', 'Amarelo SF 134' e 'Picante para vaso'. Todas as cultivares encontram-se registradas no Registro Nacional de Cultivares (RNC), porém apenas as cultivares UENF estão protegidas e podem ser encontradas no banco de dados do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares.

As cultivares UENF, objeto do presente trabalho de *DNA fingerprinting*, foram desenvolvidas pelo método de melhoramento SSD (*Single Seed Descent*), sendo todas linhagens endogâmicas obtidas após nove ciclos de autofecundação (Tabela 1). Além disso, todas as cultivares UENF são comprovadamente resistentes à mancha bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) (Pimenta, 2017).

A cultivar 'UENF Campista' é uma pimenta tipo *Hungarian Wax* e apresenta frutos pungentes de coloração vermelha intensa e com formato, comprido, estreito e triangular. A cultivar 'UENF Carioca' é uma pimenta tipo *Serrano* com frutos pungentes, vermelhos, pequenos e elípticos. A cultivar 'UENF Carioquinha' é uma pimenta tipo *Ancho* e possui frutos não pungentes, vermelhos, pequenos e triangulares.

As demais cultivares foram selecionadas para o presente trabalho por representarem uma amostra da diversidade dentre as cultivares de *Capsicum annum* L. quanto ao formato (cônico, quadrado, triangular), tamanho (pequeno, médio e grande), coloração (verde, amarela e vermelha) e pungência (doce ou pungente) dos frutos, bem como ao porte das plantas (Tabela 2).

**Tabela 1** – Características principais dos frutos das cultivares de *Capsicum annuum* desenvolvidas no âmbito do programa de melhoramento de *Capsicum* spp da UENF.

Cultivar	Tamanho do fruto	Formato do fruto	Cor do fruto maduro	Pungência	Imagem do fruto
<b>UENF CAMPISTA</b>	MÉDIO (7cmx3cm)	Estreito e triangular	VERMELHA	PUNGENTE	
<b>UENF CARIOCA</b>	PEQUENO (5,3cmx2,1cm)	ELÍPTICO	VERMELHA	PUNGENTE	
<b>UENF CARIOQUINHA</b>	PEQUENO (3,5 cm x 2,4 cm)	TRIANGULAR	VERMELHA	NÃO PUNGENTE	

**Tabela 2** – Características principais dos frutos das cultivares comerciais de *Capsicum annuum* utilizadas neste ensaio de *DNA fingerprinting*.

<b>Cultivar</b>	<b>Tamanho do fruto</b>	<b>Formato do fruto</b>	<b>Cor do fruto maduro</b>	<b>Pungência</b>	<b>Imagem do fruto</b>
<b>CASCADURA IKEDA</b>	GRANDE (14cmx7cm)	CÔNICO	VERDE	NÃO PUNGENTE	
<b>ALL BIG</b>	GRANDE (12cmx10cm)	RETANGULAR	VERDE	NÃO PUNGENTE	
<b>YOLO WONDER (QUADRADO)</b>	MÉDIO (11cmx9cm)	QUADRADO	VERDE	NÃO PUNGENTE	
<b>QUADRADO VERMELHO</b>	MÉDIO (10cmx8cm)	QUADRADO	VERMELHA	NÃO PUNGENTE	
<b>AMARELO SF 134</b>	GRANDE (12cmx7cm)	CÔNICO	AMARELA	NÃO PUNGENTE	
<b>PICANTE PARA VASO</b>	PEQUENO (10mmx4mm)	TRIANGULARES	VERMELHA	PUNGENTE	

Quanto à montagem do experimento em casa de vegetação para obtenção das amostras foliares para extração de DNA, cada cultivar foi representada por cinco plantas. As razões para o uso de cinco plantas por cultivar foram: assegurar a obtenção de amostras foliares para cada cultivar, evitar perda de dados por erros no processo de análise molecular, bem como checar o nível de homozigose das cultivares testadas e da pureza genética das sementes.

As plantas foram cultivadas por 45 dias (de Julho a Agosto de 2017) em vasos de 500 mL em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa do *Campus* Leonel Brizola da UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Após esse período, amostras foliares foram colhidas individualmente para a etapa de extração de DNA.

### **3.2.3.2. Extração de DNA**

Para extração do DNA foram utilizadas amostras foliares de cada uma das nove cultivares supracitadas e, aproximadamente, 300 mg de tecido foliar foi macerado e transferido para tubos de 1,5 µL e imersos em N<sub>2</sub> líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1990), com modificações.

A quantificação do DNA foi realizada através do fluorímetro Qubit 3.0 (INVITROGEN). Posteriormente, as amostras foram diluídas e padronizadas a concentração de 5 ng.µl<sup>-1</sup>, para serem submetidas as reações de polimerase em cadeia (PCR).

### **3.2.3.3. Reações de Amplificação**

Trinta marcadores microssatélites disponíveis na literatura (Lee et al. 2004; Yi et al. 2006; Minamiyama et al. 2006) foram selecionados com base em informações sobre o nível de polimorfismo, especificidade para *C. annuum* L. e posição no genoma (Tabela 3). Ressalta-se que a escolha por marcadores microssatélites foi fundamentada nas recomendações constantes no documento técnico da UPOV (UPOV, 2010), bem como em função do polimorfismo observado em testes preliminares.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 13  $\mu\text{L}$ , contendo os seguintes reagentes: 0,12  $\mu\text{l}$  de Taq DNA polimerase, 1,3  $\mu\text{l}$  de tampão 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,3), 1,0  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,5  $\mu\text{l}$  de dNTP (0,1 mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos), 1,0  $\mu\text{l}$  de *primer* a 5Mm e 6,08  $\mu\text{l}$  de água ultrapura.

Em seguida, as reações foram conduzidas em termociclador modelo Veriti da *Applied Biosystems*, da seguinte forma: 4 min a 94°C para desnaturação inicial; 38 ciclos incluindo 94°C por 1 min, 52-60°C por 1 min (dependendo do *primer* utilizado), 72°C por 3 min; e uma extensão final a 72°C por 7 min.

**Tabela 3.** Listagem dos marcadores microssatélites específicos para *Capsicum* spp. usados no presente trabalho para detecção de DNA *fingerprints*.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>Hpms 1-3</b>	F tgggaaataggatgctgctaaacc	R aactttaagactcaaaaatccataacc	9	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-5</b>	F ccaaacgaaccgatgaacactc	R gacaatgttgaaaaaggtggaagac	6	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-41</b>	F gggatcatccggtgaaagtagg	R caagaggtatcacacatgagagg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-43</b>	F aaccagcaatcccataaaaacc	R gggctttggggagaatagtgtg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-62</b>	F catgaggctctgcatgatttcac	R ggagaaggaccatgtactgcagag	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-117</b>	F acccaaattgcctgtgtgat	R aatccataaccttatcccataaa	9	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-139</b>	F ccaacagtaggacccgaaaatcc	R atgaaggctactgctgcatcc	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-148</b>	F ggcggagaagaactagacgattagc	R ccaccaatccacatagacg	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-173</b>	F tgctgggaaagatctcaaaagg	R atcaaggaagcaaaccaatgc	3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-216</b>	F tgctgtgtttttaccctcagc	R agtgaaaggtgggcaacagc	7	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 1-281</b>	F tgaggcagtggtatggtctgc	R cccgagttcgtctgccaatag	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>Hpms 2-21</b>	F ttttcaattgatgcatgaccgata	R catgtcattttgtcattgattgg	10	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsAT2-14</b>	F tttagggtttccaactcttctcc	R ctaacccaccaagcaaaacac	4	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsAT2-20</b>	F tgcaactgtctgtgtaaaatgacg	R aaaattgcacaaatattggctgctg	6	Lee <i>et al.</i> 2004

Tabela 3. Cont.

<b>Loco</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer</b>	<b>Grupo de Ligação</b>	<b>Fonte</b>
<b>HpmsHPMADS</b>	F tgctttcaaaacaatttgcattg	R vgcgtctaatgcaaaacacacattac	1	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AA840692</b>	F tggaagtgattactggaaccatgc	R ggggttagtcatggaatctttgc	3	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>AF242731</b>	F gggctgacggccattaagaac	R cagacagctagaaagagaggaattctg	16	Lee <i>et al.</i> 2004
<b>HpmsE004</b>	F tggaagagaaattgtgaaagca	R caatgccacaatggcatccta	1	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE007</b>	F cccatttcccctccata	R gaggggtcatgttgaaggcaa	9	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE009</b>	F tgcacaaacatcatacacctca	R cccatgactgatagtcgggctc	2	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE014</b>	F ctttgaacatttcttggggg	R gcggacgtagcagtaggttgg	6	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>HpmsE016</b>	F ccaagttcaggcccaggagtaa	R tgcagagaagactcaccagttc	3	Yi <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-215</b>	F cgtgggtggtctaggatgat	R gctggcaagtactctggat	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-340</b>	F tttatgcccattcacaaaataa	R ggacgaattcaccgagtgc	10	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-398</b>	F atggtccatggtcagcagat	R gggcagaacagtggatgatt	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-424</b>	F tccacagcccacagtgctca	R gcttggttccgtgatttt	6	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-451</b>	F tgcattggtgggtaacata	R gctcttgacacaacccaat	11	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-606</b>	F gactagtccccgttcaacca	R tttgcgagaagatgcttcag	7	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-811</b>	F gaagaaacgaaggatgaacaaaa	R cctgttctcttctcagc	9	Minamiyama <i>et al.</i> 2006
<b>CAMS-855</b>	F aagtgtcaaggaaggggaca	R cctaaccacccccaaaagtt	8	Minamiyama <i>et al.</i> 2006

#### **3.2.3.4. Eletroforese**

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose de alta resolução concentrado a 4% por um sistema de eletroforese horizontal. Os produtos da PCR, antes de serem submetidos à eletroforese, foram corados com uma solução de Blue Juice e Gel Red (1:1). Posteriormente, os géis foram submetidos à fotodocumentação por luz ultravioleta (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System).

Após esta etapa, apenas os marcadores microssatélites considerados polimórficos para o material em estudo foram usados para a “construção” de uma planilha de codificação numérica baseada no padrão das bandas observadas nas imagens dos géis.

#### **3.2.3.5. Análise de Dados**

Inicialmente, utilizou-se os programas GenAEx (Peakall & Smouse 2012) e PowerMarker (Liu & Muse 2005) para a determinação matemática dos seguintes estimadores de diversidade genética para os acessos avaliados: número de alelos; número de alelos efetivos; identificação de alelos privados por cultivar; índice de fixação; heterozigidade observada e Índice de Shannon.

Em seguida, a análise de diversidade genética entre as cultivares foi realizada pelo programa Genes (Cruz, 2013), sendo os dados processados pelo complemento do Índice de similaridade ponderado. Esta análise gerou uma matriz com medidas de dissimilaridade entre os genótipos, a qual foi usada para a análise de agrupamento pelo método hierárquico de ligação média entre grupo (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*) pelo programa Genes e a Análise de Coordenadas Principais no programa GenAEx.

### **3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Um total de 11 dentre os 30 marcadores microssatélites testados foram polimórficos e, portanto, somente esses foram aproveitados para a análise dos dados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Dados da análise de locos microssatélites realizada pelo programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2012) para as cultivares de *Capsicum annuum* L. para estimativa do número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), Índice de Shannon (I), heterozigosidade observada (Ho) e índice de Fixação (F).

Locus	Na	Ne	I	Ho	F
Hpms 13	2,000	1,800	0,637	0,000	1,000
Hpms 141	2,000	1,800	0,637	0,000	1,000
Hpms 143	2,000	1,800	0,637	0,000	1,000
Hpms 162	2,000	1,246	0,349	0,000	1,000
Hpms 1281	2,000	1,246	0,349	0,000	1,000
Hpms E004	2,000	1,528	0,530	0,000	1,000
Hpms E014	2,000	1,800	0,637	0,000	1,000
Hpms E016	2,000	1,246	0,349	0,000	1,000
CAMS - 811	2,000	1,246	0,349	0,000	1,000
CAMS-855	2,000	1,246	0,349	0,000	1,000
Hpms 221	2,000	1,976	0,687	0,000	1,000
Mean	2,000	1,540	0,501	0,000	1,000
SE	0,000	0,090	0,045	0,000	0,000

A partir dos 11 marcadores microssatélites analisados foram obtidos 22 alelos (Na), sendo 2 alelos/loco. Em acréscimo, o número de alelos efetivos (Ne) para cada loco foi inferior ao número de alelos (Na) por loco, variando de 1,246 a 1,800, com uma média igual a 1,540, o que de acordo com Viegas et al. (2011), aponta a ocorrência de alelos raros ( $p < 0,05$ ) ou com baixa frequência ( $0,05 > p < 0,25$ ).

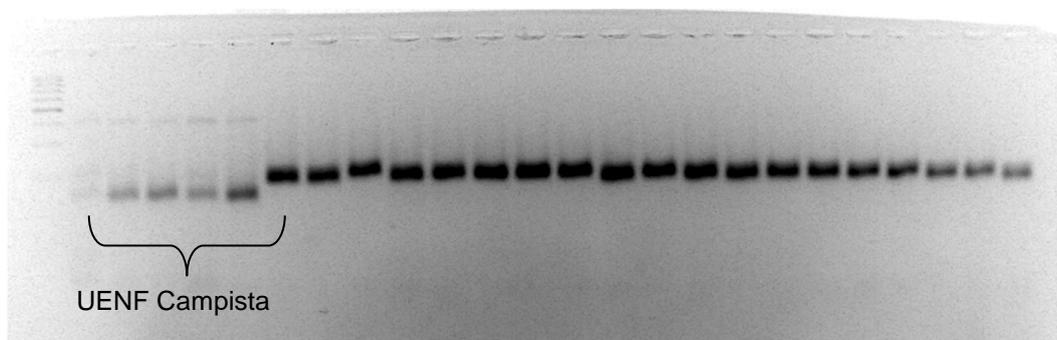
Os valores médios dos estimadores de diversidade genética, Índice de Shannon ( $I = 0,501$ ) e Heterozigosidade observada ( $H_o = 0$ ) revelam que há pouca diversidade genética entre as cultivares avaliadas com base no baixo nível de polimorfismo dos locos avaliados.

Além disso, o valor médio do Índice de Fixação (F) ( $F = 1,000$ ), de acordo com a interpretação dada por Peakall & Smouse (2012), indica alta endogamia das cultivares avaliadas, considerando os locos investigados.

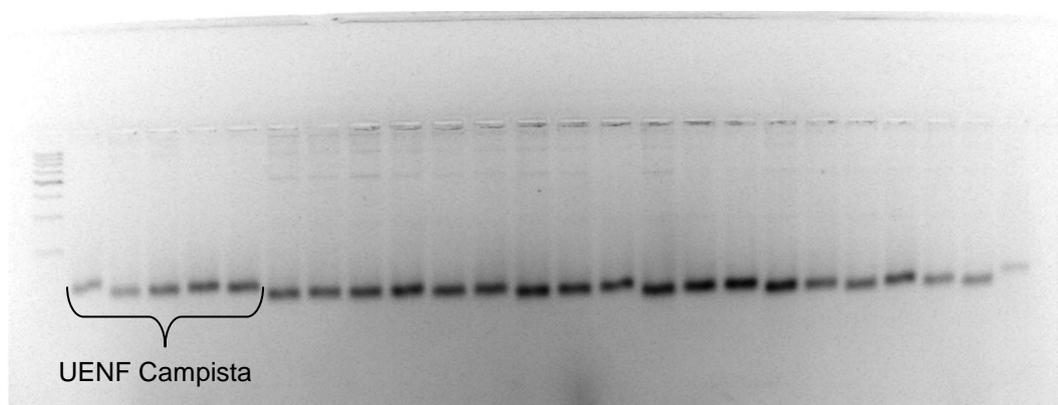
Todos esses dados, obtidos a partir da análise dos locos microssatélites, refletem a alta homozigosidade das cultivares em estudo, o que era esperado

porque todas são linhas em nível avançado de homozigose e pertencentes a uma mesma espécie autógama, *Capsicum annuum* L.

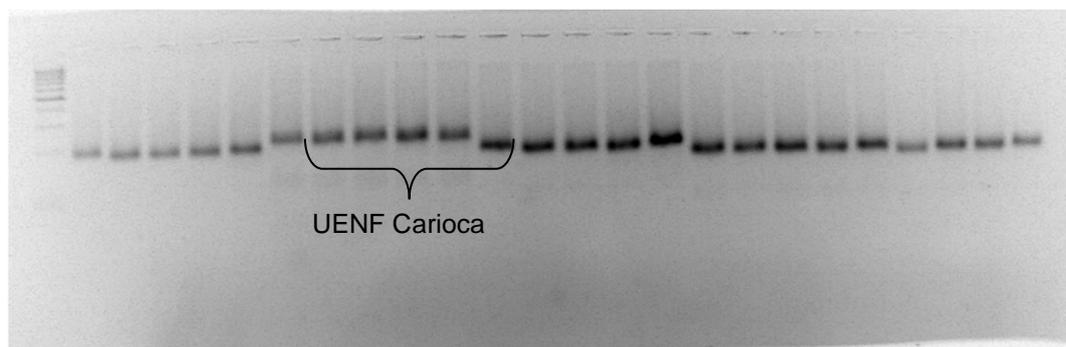
Quanto à avaliação de ocorrência de alelos privados, somente foram identificados alelos privados para as cultivares UENF Campista e UENF Carioca para os locos investigados. Para a cultivar UENF Campista foi detectado um alelo privado para o loco Hpms 162 e outro para o loco Hpms 1281, sendo o tamanho dos alelos, respectivamente, 180pb e 110pb (Figura 1 e Figura 2). Enquanto, para a cultivar UENF Carioca foi detectado um alelo privado apenas para o loco HpmsE016, o qual apresentou o tamanho de fragmento equivalente a 210pb (Figura 3).



**Figura 1** – Fotografia de gel de agarose 4% com destaque para o polimorfismo da Cultivar UENF Campista em relação as demais cultivares para o loco microssatélite Hpms 162.



**Figura 2** – Fotografia de gel de agarose 4% com destaque para o polimorfismo da Cultivar UENF Campista em relação as demais cultivares para o loco microssatélite Hpms 1281.



**Figura 3** – Fotografia de gel de agarose 4% com destaque para o polimorfismo da Cultivar UENF Carioca em relação as demais cultivares para o loco microssatélite HpmsE016.

Os alelos privados são importantes informações complementares para o processo de proteção de cultivares, pois estabelecem um *DNA fingerprint* para a cultivar analisada. A detecção de um *DNA fingerprint* não somente pode incrementar os dados de distinguibilidade da cultivar, bem como pode auxiliar na elucidação de crimes contra a propriedade intelectual (uso indevido e contrafação) (Kwon et al., 2005).

Infelizmente, não foi possível a detecção de um alelo privado para cultivar UENF Cariocinha. Entretanto, é sabido que a detecção de alelos privados entre indivíduos de uma mesma espécie autógama não é uma tarefa fácil de realizar.

Pimenta (2015) testou 19 marcadores microssatélites com o intuito de detectar polimorfismos e, conseqüentemente, alelos privados para as cultivares de *Capsicum annuum* L.: ‘UENF Carioca’, ‘UENF Cariocinha’ e a cultivar comercial ‘Jalapeño M’, usada como testemunha. Todavia, nenhum polimorfismo pode ser encontrado para os locos investigados nesse estudo.

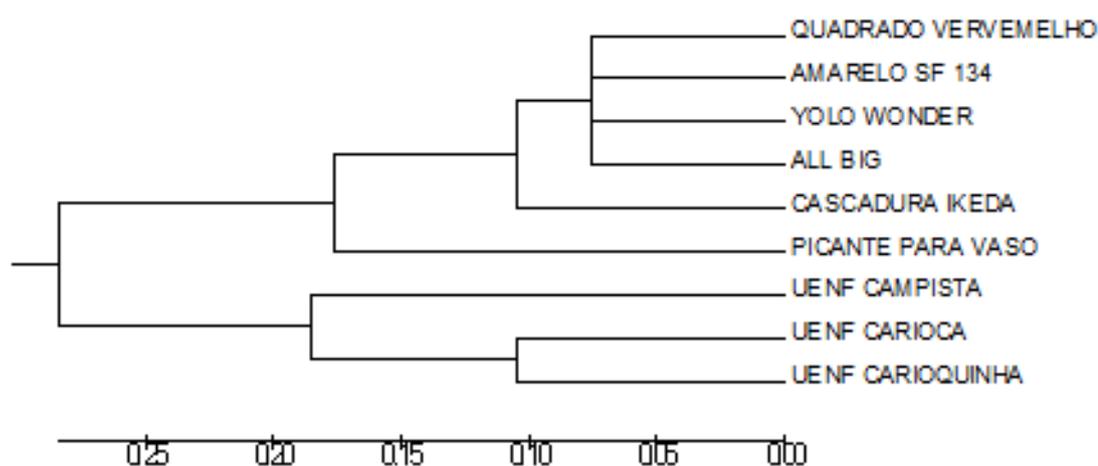
Kwon et al., (2005) usou 316 marcadores SSR para realizar a caracterização molecular de 66 cultivares de *Capsicum annuum* L., visando obter informações complementares aquelas resultantes dos respectivos ensaios de DHE. Contudo, apenas foi possível detectar polimorfismo em 27 dos 316 marcadores utilizados, os quais revelaram baixo nível de polimorfismo por loco e, por conseguinte, baixa diversidade entre as cultivares.

Além disso, de acordo com Kwon *et al.* (2005), é de domínio público a informação de que as cultivares de pimentão apresentam baixa variação a nível genético e, por esta razão, a capacidade de discriminação molecular é dificultada.

No entanto, é possível que com o uso de mais marcadores microsatélites, ou ainda, com a utilização de outra técnica molecular recomendada pela UPOV, o SNP, seja possível a identificação de *DNA fingerprints* para todas as cultivares investigadas neste trabalho (UENF Campista, UENF Carioca e UENF Carioquinha).

A análise de diversidade genética entre as cultivares realizada pelo programa GENES (Cruz, 2013) gerou uma matriz de dissimilaridade, com uma correlação com a matriz de valores cofenéticos no valor de 0,93. Sabe-se que quanto mais próximo o valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) for de 1, menor é a distorção do agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA (Silva & Dias, 2013). Desta forma, o valor de CCC verificado neste estudo implica na robustez dos agrupamentos.

Por meio da matriz de dissimilaridade foi possível obter o dendrograma pela análise de agrupamento realizada pelo programa MEGA aplicando o método UPGMA. Analisando-se o dendrograma (Figura 4), ao considerar como ponto de corte a distância 0,175, observa-se a formação de quatro grupos de cultivares. Ressalta-se que a determinação do ponto de corte, bem como o estabelecimento dos grupos foi feito de forma subjetiva, tendo por base as mudanças acentuadas nos níveis, associado ao conhecimento prévio do material em estudo.



**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo método UPGMA resultante da análise de agrupamento a que foram submetidas às cultivares de *Capsicum annuum* L. em estudo.

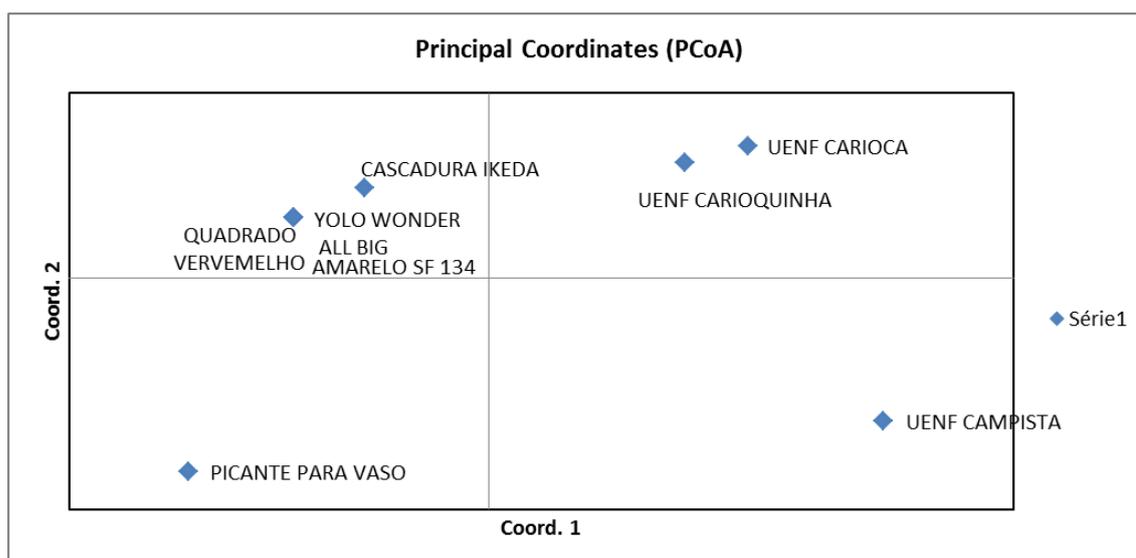
O primeiro grupo reuniu as cultivares UENF Cariquinha e UENF Carioca, as quais de acordo com Pimenta (2015) são cultivares oriundas de um mesmo cruzamento biparental, portadoras de resistência à mancha bacteriana, com frutos pequenos e vermelhos quando maduros, diferenciando-se apenas pelo formato do fruto (UENF Carioca é elíptica e UENF Cariquinha é triangular) e pungência (apenas UENF Carioca é pungente).

O segundo grupo apresentou apenas a cultivar UENF Campista, a qual também é resistente à mancha bacteriana e difere das demais cultivares UENF, principalmente, pela pungência e pelo tamanho e formato do fruto (frutos maiores, estreitos e triangulares). Isso justifica a menor distância genética entre essas cultivares, que pode ser percebida no dendrograma.

O terceiro grupo foi constituído apenas pela cultivar 'Picante para vaso', a qual, segundo o mantenedor, consiste em uma planta de pequeno porte, ideal para cultivo em vaso, com frutos pequenos e dotados de elevada pungência.

Por fim, o quarto grupo agregou as cultivares Cascadura Ikeda, All Big, Yolo Wonder, Amarelo SF 134 e Quadrado Vermelho. Todas as cultivares são dotadas de frutos grandes (> 10 cm) e doces (não pungentes). Entretanto, as cultivares diferem pelo formato do fruto entre cônico ('Cascadura Ikeda' e 'Amarelo SF 134') e quadrado ('All Big', 'Yolo Wonder' e 'Quadrado Vermelho') e também diferem em relação a cor do fruto maduro em verde ('Cascadura Ikeda', 'All Big' e 'Yolo Wonder'), amarelo (Amarelo SF 134) e vermelho (Quadrado Vermelho). Essas diferenças são evidenciadas no dendrograma pela separação dessas cultivares nas ramificações do grupo.

Em sequência, a Análise de Coordenadas Principais (PCOA) apresentou como resultado um gráfico (Figura 5), no qual as cultivares foram distribuídas e agrupadas em quatro grupos de acordo com o relacionamento genético. A porcentagem da variação explicada pelos eixos 1 e 2 foram, respectivamente, 77,43% e 21,44%. Isso significa que aproximadamente 98,87% de toda variabilidade contida nos genótipos em estudo pode ser explicada no plano bidimensional com baixo nível de distorção das informações (1,13%).



**Figura 5.** Gráfico de Coordenadas Principais obtido pela matriz de dissimilaridade resultante da análise de diversidade genética entre as cultivares de *Capsicum annuum* em estudo.

Percebe-se a partir da observação da **Figura 5** que a análise de coordenadas principais corrobora a análise de agrupamento que fora realizada neste trabalho, uma vez que apresentam resultados concordantes e de alta confiabilidade.

Muito embora não tenha sido possível, a partir da técnica empregada, encontrar um *DNA fingerprint* para todas as cultivares UENF, as demais análises (análise de Agrupamento e PCOA), indicam que houve a detecção de polimorfismos em quantidade suficiente para possibilitar, em linhas gerais, a diferenciação das cultivares UENF das cultivares testadas. Portanto, entende-se que o presente trabalho aplicou de forma eficiente e eficaz a ferramenta molecular.

### 3.2.5. CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites confirmaram ser úteis ferramentas moleculares para execução de trabalhos de *DNA fingerprinting*, pois possibilitaram a discriminação dentre as cultivares de interesse dos outros

genótipos comerciais com um alto nível de confiabilidade da informação gerada. Ainda a partir do conjunto de marcadores microssatélites foi possível à detecção de *DNA fingerprints* para duas das cultivares UENF (UENF Campista e UENF Carioca).

Apesar de não ter sido possível a identificação de *DNA fingerprints* para a cultivar UENF Carioquinha, sabe-se que este é um problema que pode ser contornado em futuros trabalhos envolvendo técnicas mais refinadas de análise molecular, como por exemplo, a técnica *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP).

As informações de *DNA fingerprinting* obtidas neste trabalho certamente acrescentarão maior peso às informações usadas para assegurar a distinguibilidade das cultivares nos ensaios de DHE. Em adição, essas informações também poderão ser usadas pelos melhoristas da UENF para sanar de forma indubitável quaisquer problemas envolvendo a identidade genética da cultivar e a segurança dos direitos de propriedade intelectual.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B.D. (2007) Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. *Nutrition and Food Science* 37:178-183.
- Akbar, N., Ahmad, H., Ghafoor, S., Begum, K., Afridi, S.G., Muhammad, I., Khan, I.A. (2010) Estimation of Genetic Diversity in Capsicum Germplasm Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Asian Journal of Agricultural Sciences* 2(2):53-56.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B. (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132(4): 1131–1139.
- Andrews, J. (1984) *Peppers: The Domesticated Capsicums*. Austin, Texas: University of Texas Press, 170p.
- Ashrafi, H., Hill, T., Stoffel, K., Kozik, A. and Yao, J. (2012) De novo assembly of the pepper transcriptome (*Capsicum annuum*): A benchmark for in silico discovery of SNPs, SSRs and candidate genes. *BMC Genomics* 13:571-580.
- Aviani, D.M., Santos, F.S. (2011) Uso de Marcadores Moleculares em Proteção de Cultivares. In: Aviani, D.M., Passos, F.J.V (Coord.), *Proteção de Cultivares no Brasil*. Brasília. Mapa, p. 155 a 158.

- Aviani, D.M., Machado, R.Z. (2011) União Internacional para Proteção das Obtenções Vegetais (UPOV). *In*: Aviani, D.M., Passos, F.J.V (Coord.), *Proteção de Cultivares no Brasil*. Brasília. Mapa, p. 17 a 22.
- Barbero GF; Ruiz AG; Liazid A; Palma M; Vera JC; Barroso, CG. (2014) Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry* 153: 200–206.
- Bennett, M.D. and Leitch, I.J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
- Bhagyawant, S.S. (2016) RAPD-SCAR markers: an interface tool for authentication of traits. *J Biosci Med.* 4:1–9.
- Bocchino, L.O., Oliveira, M.C.C., Maia, M.S., Parma, N., Von Jelita, R.R.R., Machado, R.F., Pena, R.M.V. (2010) Propriedade intelectual: conceitos e procedimentos. Brasília: AGU.
- Bodenhause, G.H.C. (1968) Guide to the application of the Paris Convention for the Protection of Industrial Property as revised at Stockholm in 1967. Geneva: BIRPI.
- Borges, R.M. (2001) Why are Chillies pungent? *Journal of Biosciences* 26 (3): 289-291.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2012) *Peppers: vegetable and spice capsicums*. 2nd edn. Cambridge, MA: CABI, 378p.
- Brasil (1997a) Lei nº 9.456, de 25 de Abril de 1997. Lei de Proteção de Cultivares. Brasília, DF.
- Brasil (1997b) Decreto nº 2.366, de 05 de Novembro de 1997. Regulamento da Lei de Proteção de Cultivares e do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. Brasília, DF.

- Brasil (2004) Decreto nº 5.153, de 23 de Julho de 2004. Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças - SNSM. Brasília, DF.
- Büttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzke, R.S., Heiden, G. e Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciência Rural* 40:1264-1269.
- Campos, A.L., Marostega, T.N., Cabral, N.S.S., Araújo, K.L., Serafim, M.E., Seabra-Júnior, S., Sudré, C., Rodrigues, R., Neves, L.G. (2016) Morphoagronomic and molecular profiling of *Capsicum* spp from southwest Mato Grosso, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 15(3): gmr.15038167.
- Carrizo, G.C., Sterpetti, M., Volpi, P., Ummarino, M., Saccardo, F. (2013) Wild Capsicums: identification and in situ analysis of Brazilian species. XVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and Eggplant. Torino, Italy. P. 205-213.
- Carvalho C *et al.* 2016. Anuário brasileiro das hortaliças. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 64 p.
- Carvalho, S.I.C. e Bianchetti, L.B. (2004) Sistema de produção de pimentas <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica.htm>. em julho de 2015, página mantida pela Embrapa Hortaliças.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Reifschneider, F.J.B. (2009) Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. *Horticultura Brasileira* 27: 135-138.
- Carvalho, S.I.C., Reifschneider, F.J.B., Ribeiro, C.S.C, Bianchetti, L.B., Fernandez, L. (2018) Experience with descriptors, registration and protection of vegetable cultivars: eggplant as a case study. *Horticultura Brasileira* 36: 146-155.

- Cheema, S.K. and Pant, M.R. (2013) Karyotype analysis of seven cultivated varieties of *Capsicum annuum* L. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* 66 (1): 70–75.
- Cochran, H.L. (1940) Characters for the classification and identification of varieties of *Capsicum*. *Bull Torrey Bot Club* 67:710–717.
- Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2009) Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. *Ciência Rural*, 38:1-9.
- Costa, L.V., Bentes, J.L.S., Lopes, M.T.G., Alves, S.R.M., Viana Júnior, J.M. (2015). Caracterização de acessos de pimentas do Amazonas. *Horticultura Brasileira* 33: 290-298.
- Cruz, C.D. (2013) GENES: software para análise de dados em estatística experimental e em genética quantitativa. *Acta Sci., Agron.* .35(3): 271-276.
- Da Costa, C.S.R. e Henz, G.P. (2004) Sistema de produção de pimentas [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/importanciaeconomica.html](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/importanciaeconomica.html), julho de 2015, página mantida pela Embrapa Hortaliças.
- Dhar, B. (2002) Sui Generis Systems for Plant Variety Protection. Quaker United Nations Office, Geneva, Switzerland. 30p.
- Dhaliwal, MS; Yadav, A; Jindal, SK. (2014) Molecular characterization and diversity analysis in chili pepper using simple sequence repeats (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 13 (31): 3137-3143.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

- Eshbaugh, W.H. (1976) Genetic and biochemical systematic studies of chili peppers (*Capsicum* - Solanaceae). *Bull Torrey Bot Club* 102:396–403.
- Eshbaugh, W.H. (1980) The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). *Phytologia* 47:153–166.
- FAO (2016) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION : <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> em NOVEMBRO DE 2018, página mantida pela FAO.
- Favoretto, P; Veasey, EA; Melo, PCT. (2011) Molecular characterization of potato cultivars using SSR markers. *Horticultura Brasileira* 29: 542-547.
- Franco Júnior, H. (2001) *A Idade Média: Nascimento do Ocidente*. 2ed. São Paulo: Brasiliense.
- Gotor, E., Cherfas, J., (2010) The history and usefulness of Bioversity International's descriptor lists. *Bioversity International Series of Impact Assessment Briefs*, no. 3. Bioversity International, 4 p.1235.
- Harlan, J.R. and De Wet, J.M.J. (1971) Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20: 509-517.
- Heiser, C.B. (1969) *Nightshades, the paradoxical plants*. San Francisco: WH Freeman.
- Heiser, C.B. (1995) Peppers *Capsicum* (Solanaceae). In: Smartt J, Simmonds NW (ed.) *Evolution of Crop Plants*. London: Longman, p. 265 –268.
- Hill, T.A., Ashrafi, H., Reyes-Chin-Wo, S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, M.J., Kozik, A., Michelmore, R.W., Van Deynze, A. (2013) Characterization of *Capsicum annuum* genetic diversity and population structure based on parallel polymorphism discovery with a 30k unigene pepper genechip. *Plos One* 8(2): 1-16.

- Ibiza, V.P., Blanca, J., Canizares, J. and Nuez, F. (2012) Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genet Resour Crop Evol* 59:1077–1088.
- Jarvis, P., Lister, C., Szabo, V., *et al.* (1994) Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 24(4):685–687.
- Kraft, K.H., Brownb, C.H., Nabhanc, G.P., Luedelingd, E., Ruize, J.J.L., d'Eeckenbruggef G.C., Hijmansg, R.J. and Gepts, P. (2014) Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *PNAS* 111(17): 6165-6170.
- Kumar, LD; Kathirvel, M; Rao, GV; Nagaraju, J. (2001) DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *Forensic Science International* 116: 63 – 68.
- Kwon, YS; Lee, JM; Yi, GB; Yi, SI; Kim, KM; Soh, EH; Bae, KM; Park, EK; Song, IH; Kim, BD. (2005) Use of SSR Markers to Complement Tests of Distinctiveness, Uniformity, and Stability (DUS) of Pepper (*Capsicum annum* L.) Varieties. *Mol. Cells* 19(3):428-435.
- Lee, J.M., Nahm , S.H., Kim, Y.M. and Kim, B.D. (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108: 619–627.
- Lim, T.K. (2013) *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. In: Lim TK (ed) *Edible Medicinal and Non-medicinal plants - Volume 6, Fruits*. Netherland: Springer, p. 197 – 204.
- Limaye, V.A., Patil, V.P. (1989) Karyomorphological studies in the genus *Capsicum* Linn. *Cytologia.* 54(3):455–464.

- Lippert, L.F., Smith, P.G., Bergh, B.O. (1966) Cytogenetics of the vegetable crops: garden pepper, *Capsicum* sp. *Bot Rev* 32:25–55.
- Liu, K; Muse, SV. (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9): 2128–2129.
- Madhumati, B. (2014) Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int J Pure App Biosci.* 2(1):169–188.
- Maeda, M., Uryu, N., Murayama, N., *et al.* (1990) A simple and rapid method for HLA-DP genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases. *Hum Immunol.* 27(2):111–121.
- Manzur, J.P., Oliva-Alarcón, M., Rodríguez-Burruezo, A. (2014). In vitro germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 170: 203-210.
- Martins, A.B.G., Rodrigues, M.G.F., Paula, D.R., Mendes, H.S.J., Arantes, F.C., Silva, C.L.S.P. (2011) Caracterização molecular e diversidade genética de diferentes variedades de abacate por marcadores microssatélites. *Rev. Bras. Frutic.*, 33(4): 1178-1184.
- Massaguer, J. (2010) Aproximación sistemática general al Derecho de la competencia y de los bienes inmateriales. *Revista General del Derecho*: 245-263
- McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H. (1982) Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Econ. Bot.* 36:361–368.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M. (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol Breeding* 18:157–169.
- Mondini, L., Noorani, A., Pagnotta, M.A. (2009) Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1 (1):19–35.

- Moreira, G.R., Caliman, F.R.B., Silva, D.J.H. e Ribeiro, C.S.C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário* 27:16-29.
- Moreira, S.O. (2008). Reação à mancha bacteriana e desempenho agrônômico de linhas recombinadas de *Capsicum annuum* L. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 115p.
- Moreira S.O.; Araújo R.R.M.L.; Sudré C.P.; Riva-Souza E.M. (2009). Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de pimenta em dois sistemas de cultivo. *Ciência Rural*. 39(5): 1387-1393.
- Moreira S.O.; Rodrigues R.; Araújo M.L; Riva-Souza E.M.; Oliveira R.L. (2010). Desempenho Agrônômico de Linhas Endogâmicas Recombinadas de *Capsicum annuum* L. em Sistema Orgânico Sob Cultivo Protegido. *Ciênc. agrotec.* 34(4): 886-891.
- Moreira, S.O. (2012). Caracterização morfológica e molecular de linhagens de *Capsicum annuum* L. Com resistência à mancha bacteriana. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 124p.
- Moscone, E.A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F., Hunziker, A.T. (2003) Analysis of Nuclear DNA Content in *Capsicum* (Solanaceae) by Flow Cytometry and Feulgen Densitometry. *Annals of Botany* 92: 21-29.
- Moscone, E.A., Lambrou, M., Hunziker, A.T. and Ehrendorfer, F. (1993) Giemsa C-banded karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). *Plant Syst Evol* 186: 213–229.
- Moscone, E.A., Scaldaferrro, M.A., Grabiele, M., Cecchini, N.M., Garcia, Y.S., Jarret, R., Davina, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of chili peppers (*Capsicum*—Solanaceae): a cytogenetic

perspective. *Proceedings of the VIth international Solanaceae conference. Solanaceae VI: Genomics Meets Biodiversity*, p. 137–169.

Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., Baloch, F.S. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32(2): 261-285.

Nard, C.A., Wagner, R.P. (2007) Patent Law. New York: Foundation Press.

Nascimento, K.O., Vicente, J., Saldanha, T., Barbosa Júnior, J.L., Barbosa, M.I.M.J. (2012) Caracterização química e informação nutricional de geleia de pimenta Cambuci orgânica (*Capsicum baccatum* L.). *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 7:283-288.

Neto, F.C.V., et al. (2009) O melhoramento genético no contexto atual. *Anais do I Simpósio Nordestino de Genética e Melhoramento de Plantas*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 210p.

Nicolaï, M; Cantet, M; Lefebvre, V; Sage-Palloix, AM; Palloix, A. (2013) Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genet Resour Crop Evol* 60:2375–2390.

Oyama, K., Hernández-Verdugo, S., Sanchez, C., González-Rodríguez, A., Sanchez-Pena, P., Garzon-Tiznado, J.A., Casas, A. (2006) Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 553–562.

- Padilha, H.K.M., Pereira, E.S., Munhoz, P.C., Vizzotto, M., Valgas, R.A, Barbieri, R.L. (2015). Genetic variability for synthesis of bioactive compounds in peppers (*Capsicum annuum*) from Brazil. *Food Science and Technology* 35(3): 516-523.
- Padilha, H.K.M, Barbieri, R.L. (2016) Plant breeding of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae) – A review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 10(15): 148-154.
- Paran, I., Michelmore, R.W. (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85(8):985–993.
- Peakall, R; Smouse, PE. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research- an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D.M., Piperno, D.R., Berman, M.J., Cooke, R.G., Rademaker, K., Ranere, A.J., Raymond, J.S., Sandweiss, D.H., Scaramelli, F., Tarble, K., Zeidler, J.A. (2007) Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 315: 986-988.
- Pickersgill, B. (1966) *The variability and relationships of Capsicum chinense Jacq.* PhD diss. Indiana University, Bloomington.
- Pickersgill, B. (1969) The archaeological record of chili peppers (*Capsicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. *Am Antiquity* 34:54–61.
- Pickersgill, B. (1971) Relationship between weedy and cultivated forms in some species of chilli peppers (genus *Capsicum*). *Evolution* 25: 683-691.
- Pickersgill, B. (1988) The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. *Biologisches Zentralblatt* 107:381-389.

- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya T, Gupta PK (eds.) *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B*. Amsterdam: Elsevier, p.139-160.
- Pickersgill, B. (2007) Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany* 100: 925–940.
- Pimenta, S. (2015) “UENF CARIOCA” e “UENF CARIOQUINHA”: novas cultivares de pimenta (*Capsicum annuum* var. *annuum*) resistentes à mancha bacteriana. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 92p.
- Pimenta, S; Menezes, D; Neder, DG; Melo, RA; Araujo, ALR; Maranhão, EAA. (2016) Adaptability and stability of pepper hybrids under conventional and organic production systems. *Horticultura Brasileira* 34: 168-174.
- 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? *Bot J Linn Soc* 151:259–269.
- Prasad, B., Khan, R.G., Radha, T., Ravi, C., Venkataiah, P., Subhash, K., Reuben, T.C. (2013) DNA profiling of commercial chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr. J. Biotechnol.*, 12(30): 4730-4735.
- Priori, D; Barbieri, R; Castro, CM; Oliveira, AC; Vilella, JCB; Mistura, CC. (2012) Caracterização molecular de variedades crioulas de abóboras com marcadores microssatélites. *Horticultura Brasileira* 30: 499-506.
- PURKAYASTHA, J., ALAM, S.I., GOGOI, H.K., SINGH, L., VEER, V. (2012) Molecular characterization of 'Bhut Jolokia' the hottest chili. *J. Biosci.* 37: 757–768.

- Qin et al (2014) Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *PNAS* 111 (14): 5135-5140.
- Reifschneider, F.J.B. (org.) (2000) *Capsicum. Pimentas e pimentões no Brasil*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, Brasília, 113p.
- Reifschneider, F.J.B., Lopes, C.A., Ribeiro, C.S.C. (2016) Continuity, focus and impact: a commented historical perspective on Embrapa Vegetables' extended *Capsicum* breeding program. *Horticultura Brasileira* 34: 155-160.
- Riva, E.M., R. Rodrigues, C.P. Sudré, M. Karasawa and M.G. Pereira. (2004b). Three recessive genes controlling bacterial spot resistance in pepper. Anais do 17th International Pepper Conference, Naples, USA. p.21.
- Riva, E.M. (2006). Uso dos métodos genealógico e —single seed descentll (SSD) para obtenção de linha de pimentão resistentes à mancha bacteriana. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 101p.
- Riva-Souza, E.M., R. Rodrigues, C.P. Sudré, M.G. Pereira, C. dos Santos Bento and F. de Pina Matta. (2009). Genetic parameters and selection for resistance to bacterial spot in recombinant F6 lines of *Capsicum annum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9(2). p.108-115.
- Rodrigues, R., Bento, C.S., Silva, M.G.M., Sudré, C.P. (2010) Atividades de caracterização e avaliação em bancos de germoplasma. *In: Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas*. Pereira, T.N.S. (Ed.). Viçosa, MG: Arca. p. 115-140.
- Rooijen, S.V. (2011) Exercício do direito do titular da proteção. *In: Aviani, D.M., Passos, F.J.V (Coord.), Proteção de Cultivares no Brasil*. Brasília. Mapa, p. 73 a 83.

- Rufino, J.L.S., Penteado, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário* 27:7-15.
- Santos, C.A.F., Oliveira, V. R., Rodrigues, M. A., Ribeiro, H.L.C. (2010) Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. *Pesq. agropec. bras.*, 45(1): 49-55.
- Santos, F.S., Aviani, D.M., Hidalgo, J.A.F., Machado, R.Z., Araújo, S.P. (2012) Evolution, importance and evaluation of cultivar protection in Brazil: the work of the SNPC. *S2*: 99-110.
- Scaldeferro, M.A., Grabielle, M. and Moscone, E.A. (2013) Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Genet Resour Crop Evol* 60:693–709.
- Silva, AR; Dias, CTS. (2013) A cophenetic correlation coefficient for Tocher's method. *Pesq. Agropec. Bras.* 48(6): 589-596.
- Silva, C.Q., Jasmim, J.M., Santos, J.O., Bento, C.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2015) Phenotyping and selecting parents for ornamental purposes in chili pepper accessions. *Horticultura Brasileira* 33: 66-73.
- Sim, SC; Hong, JH; Kwon, YS. (2015). DNA Profiling of Commercial Pumpkin Cultivars Using Simple Sequence Repeat Polymorphisms. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 56(6):811-820.
- Smith, B.L. (2000) The third industrial revolution: law and policy for the internet, in *Recueil des Cours*. New York: Foundation Press.
- Sobrinho, B., Brion, M., Carracedo, A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* 154(2):181–194.

- Sousa, T.V., Caixeta, E.T., Alkimim, E.R., Oliveira, A.C.B., Pereira, A.A., Zambolim, L., Sakiyama, N.S. (2017) Molecular markers useful to discriminate *Coffea Arabica* cultivars with high genetic similarity. *Euphytica* 213:75.
- Sudré, C.P. (2003) Divergência genética e avaliação de resistência à antracnose bacteriana em acessos de *Capsicum* spp. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 112p.
- Szpiech, ZA; Rosenberg, NA. (2011) On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theoretical Population Biology* 80(2): 100-113.
- Tam, S.M., Lefebvre, V., Palloix, A., Sage-Palloix, A.M., Mhiri, C. and Grandbastien, M.A. (2009) LTR-retrotransposons Tnt1 and T135 markers reveal genetic diversity and evolutionary relationships of domesticated peppers. *Theor Appl Genet* 119:973–989.
- Tong, N. and Bosland, P.W. (1999) *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. *Euphytica* 109: 71-77.
- UPOV (1961) International convention for the protection of new varieties of plants. Geneva, Switzerland. 30p.
- UPOV (2010) Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (“BMT GUIDELINES”). UPOV/INF/17/1. Geneva, Switzerland. 13p.
- UPOV (2011) Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). UPOV/INF/18/1. Geneva, Switzerland. 26p.
- Vargas, TO; Alves, EP; Abboud, ACS; Leal, MAA; Carmo, MGF. (2015) Diversidade genética em acessos de tomateiro heirloom. *Horticultura Brasileira* 33: 174-180. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620150000200007>.

- Viana, A.A.N. (2011) A Proteção de Cultivares no Contexto da Ordem Econômica Mundial. In: Aviani, D.M., Passos, F.J.V (Coord.), *Proteção de Cultivares no Brasil*. Brasília. Mapa, p. 11 a 26.
- Villela, JCB; Barbieri, RL; Castro, CM; Neitzke, RS; Vasconcelos, CS; Carbonari T; Mistura, CC; Priori, D. (2014) Caracterização molecular de variedades crioulas de pimentas (*Capsicum baccatum*) com marcadores microssatélites. *Horticultura Brasileira* 32: 131-137.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21):4407–4414.
- Walsh, B.M. and Hoot, S.B. (2001) Phylogenetic Relationships of *Capsicum* (Solanaceae) Using DNA Sequences From Two Noncoding Regions: The Chloroplast Atpb-Rbcl Spacer Region And Nuclear Waxy Introns. *Intr. J. Plant. Sci.* 162(6):1409-1418.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*18 (24):7213–7218.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6531–6535.
- World Intellectual Property Organization (2008) Intellectual Property Handbook. WIPO PUBLICATION No. 489 (E). 2<sup>nd</sup> Edition. ISBN 978-92-805-1291-5. 460p.
- Yang, L., Fu, S., Khan, A., *et al.* (2013) Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. *Springer Plus.* 2:501.
- Yi, G, Lee, J.M., Lee, S., Choi, D., Kim, B. (2006) Exploitation of pepper EST–SSRs and an SSR-based linkage map. *Theor Appl Genet* 114:113–130.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20(2):176–183.