

CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs
ASSOCIADOS A CARACTERES AGRONÔMICOS E DETECÇÃO DE
INIBIDORES DE PROTEASE EM *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

MONIQUE MOREIRA MOULIN

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2013

CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS A CARACTERES AGRONÔMICOS E DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE EM *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

MONIQUE MOREIRA MOULIN

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^a. Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO – 2013

CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS A CARACTERES AGRONÔMICOS E DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE EM *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

MONIQUE MOREIRA MOULIN

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 29 de outubro de 2013

Comissão Examinadora:

Prof^a. Elizanilda Ramalho do Rêgo (D.Sc. Genética e Melhoramento) - UFPB

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes (D.Sc. Ciências Biológicas) - UENF

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

Prof^a. Rosana Rodrigues (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A Deus, pela dádiva da vida.

Aos meus pais, Fernando e Cacilda, pelo amor incondicional, pelos esforços em prol das minhas realizações profissionais e pessoais, e por terem me ensinado o verdadeiro sentido da humildade.

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre se fazer presente me iluminando em todos os momentos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de qualificação;

À FAPERJ pelo suporte financeiro do projeto de doutorado;

Ao Instituto Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, pela liberação no último ano de doutorado e grande colaboração ao longo deste curso;

À Professora Dra. Rosana Rodrigues, pela orientação, ensinamentos, amizade, paciência e confiança a mim dispensada desde a Iniciação Científica;

Ao Professor Dr. Alexandre Pio Viana, pelo entusiasmo e pelas ótimas sugestões e ideias;

À Professora Dra. Helaine Christine Cancela Ramos, pela orientação, sugestões e apoio durante a realização deste trabalho;

À Professora Dra. Valdirene Moreira Gomes, pelos ensinamentos, atenção, colaboração e compreensão;

Ao Professor Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pela atenção dispensada e por disponibilizar recursos do Laboratório de Biotecnologia usados neste trabalho;

Aos demais professores do curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de aprendizagem, confiança e incentivo, fundamentais para minha formação acadêmica;

À Professora Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo pelas sugestões e disponibilidade de participação na banca;

Ao Professor Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, pelos auxílios com os programas estatísticos das análises bioquímicas, disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas e pela amizade;

À Suzanna de Fátima Ferreira Ribeiro, pela atenção, colaboração e apoio nos trabalhos de laboratório;

À Cíntia dos Santos Bento, pela amizade incondicional, pelos aconselhamentos, conversas e momentos de descontração, pela contribuição por ceder o material vegetal utilizado no mapeamento e pelo auxílio na coleta do material utilizado nas análises bioquímicas;

À Cláudia Pombo Sudré, pela valiosa e verdadeira amizade, ensinamentos, estímulo e contribuição direta na realização deste trabalho;

Às técnicas Vitória e Marcela pelo auxílio constante na execução dos trabalhos, paciência e disponibilidade;

Ao secretário Daniel, pela amizade, incentivo, paciência e informações quanto aos prazos e datas, por estar sempre disponível em me ajudar, e também pelos momentos de descontração;

Aos atuais e antigos amigos do Laboratório de Recursos Genéticos: Marilene, Hérica, Samy, Jardel, Artur, Pakizza, Camila, Daniele, Sarah, Elaine e Marlon, pela contribuição no meu desenvolvimento científico e pessoal;

Aos amigos do Laboratório 222: Eileen, Jôsie Cloviane, Cláudia Lougon, Daniele, Rodrigo, Guilherme, Nayara, Fernando, Rulfe e Silvana;

Aos amigos de curso: Monique, Keila, Maurício, Juliana, Giovana, Roberta, Lucas, Kellen e Nonato;

Aos amigos feitos ao longo desses quatro anos de trabalho no IFES, Campus Alegre, pelos incontáveis auxílios ao longo dessa jornada: Madella, Dinoráh, Charlini, Karen, Karla, Carla, Gabriela, Evânia, João, Meneguelli, Janderson, Nailson, Bruno, César e Carlos Alexandre;

À minha família, minha fonte de inspiração! Especialmente aos meus pais, Fernando e Cacilda, por todo amor, carinho e incentivo;

Ao Alexandre, pelo carinho, incentivo, compreensão e companheirismo;

Aos amigos de sempre, pelos bons momentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. CAPÍTULOS.....	6
3.1. MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS A DIFERENTES CARACTERES AGRONÔMICOS EM <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	6
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	6
3.1.2. REVISÃO.....	8
3.1.2.1. Origem, dispersão, aspectos botânicos e reprodutivos de <i>Capsicum</i>	8
3.1.2.2. Importância econômica e nutricional.....	10
3.1.2.3. Mapeamento Genético.....	13
3.1.2.3.1. Construção de mapas genéticos.....	13
3.1.2.3.2. Mapas genéticos em <i>Capsicum</i>	18
3.1.2.3.3. Marcadores Moleculares.....	20
3.1.2.4. Mapeamento de QTLs (<i>Quantitative Trait Loci</i>).....	24
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1.3.1. População de Mapeamento.....	27

3.1.3.2. Extração e quantificação do DNA.....	29
3.1.3.3. Marcadores Microsatélites.....	30
3.1.3.4. Marcadores ISSR e RAPD.....	32
3.1.3.5. Mapeamento Genético.....	34
3.1.3.6. Mapeamento de QTLs.....	34
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1.4.1. Mapa genético para população F2 de <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	36
3.1.4.2. Marcadores ISSR e RAPD.....	47
3.1.4.3. Polimorfismo e transferibilidade de marcadores microsatélites.....	55
3.1.4.4. Mapeamento de QTLs.....	68
3.1.4.4.1. Mapeamento de QTLs para características quantitativas.....	68
3.1.4.4.2. Mapeamento de QTLs para características qualitativas.....	76
3.1.5. CONCLUSÕES.....	78
3.2. DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM FOLHAS DE <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i> RESISTENTES AO <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV).....	80
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	80
3.2.2. REVISÃO.....	82
3.2.2.1. <i>Pepper yellow mosaic virus</i> (PepYMV).....	82
3.2.2.2. Inibidores de proteases.....	85
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
3.2.3.1. Material Vegetal.....	87
3.2.3.2. Procedimento de inoculação.....	88
3.2.3.3. Extração de proteínas e quantificação.....	89
3.2.3.4. Cromatografia de fase reversa em HPLC.....	89
3.2.3.5. Ensaio de inibição de tripsina.....	90
3.2.3.6. Análise estatística.....	90
3.2.3.7. Eletroforese em gel de tripsina.....	90
3.2.3.8. Revelação do gel com nitrato de prata.....	91
3.2.3.9. Análise da sequência de aminoácidos.....	92
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92

3.2.5 CONCLUSÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

RESUMO

MOULIN, Monique Moreira; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Outubro de 2013; CONSTRUÇÃO DE MAPA GENÉTICO, IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS A CARACTERES AGRONÔMICOS E DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASE EM *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Orientadora: Prof^a. Rosana Rodrigues; Conselheiros: Prof^a. Valdirene Moreira Gomes e Prof. Alexandre Pio Viana.

O gênero *Capsicum* possui cinco espécies domesticadas e entre estas, *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, que possui potencial econômico e elevada variabilidade genética, além de ser fonte de genes de resistência a doenças, inclusive ao *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). Entretanto, *C. baccatum* var. *pendulum* tem sido pouco trabalhada pelo melhoramento de plantas, principalmente em pesquisas voltadas para análise genômica, não existindo mapas genéticos desenvolvidos para a espécie. Este trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos: i) construir um mapa genético de referência para a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, com base em marcadores moleculares do tipo microssatélites, ISSR e RAPD; ii) avaliar a transferência de marcadores microssatélites disponíveis para *C. annuum* em *Capsicum baccatum* var. *pendulum*; iii) mapear possíveis QTLs associados a 16 características agronômicas de interesse para o melhoramento genético da espécie; e, iv) detectar a presença de inibidores de proteases, em especial inibidores de tripsina, em extratos foliares de plantas inoculados com PepYMV. Para a construção do

mapa genético foi utilizada uma população F₂ constituída por 203 indivíduos, obtida a partir do cruzamento entre UENF 1616 e UENF 1732, previamente fenotipada para caracteres qualitativos e quantitativos. Foram testados 152 pares de iniciadores SSR, 61 iniciadores ISSR e 24 RAPD. O mapa foi gerado com o programa JoinMap versão 4.0 e os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando-se LOD Score 3,0 e máximo de 40% de recombinação. O mapeamento de QTLs foi feito por intervalo padrão para as características qualitativas e quantitativas. Para a detecção de inibidores de tripsina, foram utilizados extratos foliares de plantas do acesso UENF 1624, resistente ao PepYMV inoculadas e não inoculadas com o vírus em sete diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas), mantidas em câmara de crescimento. O mapa genético obtido foi constituído por 183 marcadores, sendo 42 (22,95%) microssatélites, 85 (46,45%) ISSR e 56 (30,60%) RAPD, alocados em doze grupos de ligação maiores e quatro menores cobrindo uma distância total do genoma de 2547,5 cM. Entre os marcadores microssatélites testados, foram polimórficos e transferidos com sucesso 62 marcadores, sendo mapeados 42, e destes foi constatado um elevado percentual de similaridade (66,67%) entre os grupos de ligação dos marcadores mapeados para *C. baccatum* neste estudo e mapeados em outro trabalho para *C. annuum*. Utilizando-se o mapa desenvolvido, foram mapeados QTLs para as 16 características agronômicas estudadas. Para as treze características quantitativas, 71 QTLs de pequeno efeito foram identificados, e para os três caracteres qualitativos foram detectados 10 QTLs de pequeno efeito. Nos ensaios da atividade inibitória da tripsina constatou-se que esses inibidores são sintetizados constitutivamente nos tecidos foliares de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Neste estudo foi construído o primeiro mapa genético para a espécie, sendo um mapa de referência para outros trabalhos. O mapeamento e a transferibilidade de marcadores microssatélites desenhados para *C. annuum* representam uma importante informação, pois introduzem a espécie *C. baccatum* em estudos de sintenia com outras espécies do gênero *Capsicum* e da família Solanaceae. Além disso, foram obtidos os primeiros QTLs para características agronômicas relevantes, incluindo QTLs para componentes de produtividade, podendo futuramente ser úteis em programas de seleção assistida por marcadores.

ABSTRACT

MOULIN, Monique Moreira; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; October, 2013; CONSTRUCTION OF GENETIC MAP, IDENTIFICATION OF QTLs ASSOCIATED WITH AGRONOMIC CHARACTERS AND DETECTION OF PROTEASE INHIBITORS IN *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Advisor: Prof^a. Rosana Rodrigues; Committe members: Prof^a. Valdirene Moreira Gomes and Prof. Alexandre Pio Viana.

The genus *Capsicum* has five domesticated species and among these, *Capsicum baccatum* var. *pendulum* that has economic potential and high genetic variability. *Capsicum baccatum* var. *pendulum* is also a source of diseases resistance genes, including resistance to *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV). However, *C. baccatum* var. *pendulum* has been underexploited by plant breeding, especially in research for genomic analysis, and there are no genetic maps developed for the species. This work aimed: i) to construct a reference genetic map for *C. baccatum* var. *pendulum*, based on molecular markers; ii) to evaluate the transferability of microsatellite markers available for *Capsicum annuum* to *C. baccatum* var. *pendulum*, iii) to identify on the constructed map possible QTLs associated with 16 agronomic traits and, iv) to detect the protease inhibitors presence, including trypsin inhibitors, in leaf extracts of plants inoculated with PepYMV. For the construction of the genetic map 203 F₂ individuals from crosses between UENF1616 and UENF1732 were used. This population was previously phenotyped for qualitative and quantitative characters. One hundred and fifty two

pairs of SSRs, 61 ISSRs and 24 RAPDs primers were useful to map construction. The map was generated using JoinMap Version 4.0 software and linkage groups were formed and ordered using LOD Score 3.0 and maximum 40% of recombination. The QTL mapping was performed by standard interval for the qualitative and quantitative characteristics. Trypsin inhibitor was detected from leaf extracts from the accession UENF 1624 (resistant to PepYMV) inoculated and non-inoculated with the virus. Leaves for trypsin inhibitor assay were collected at seven different times (0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours), from plants maintained in growth chamber with controlled temperature and photoperiod. The genetic map was constructed consisting of 183 markers, of which 42 (22.95%) were microsatellites, 85 (46.45%) ISSR and 56 (30.60%) RAPD allocated in 12 large and four small linkage groups, covering 2547.5 cM of the genome. Among the microsatellite markers, 62 primers tested were polymorphic and successfully transferred from *C. annuum* to *C. baccatum* and 42 were mapped. It was observed a high similarity percentage (66.67%) among the linkage groups defined to *C. baccatum* in this study to those ones previously mapped for *C. annuum*. Using the map developed, QTLs were identified for the 16 agronomic traits studied. For the 13 quantitative traits, 71 QTLs of small effect were identified, and for others three qualitative characters 10 small effect QTLs were detected. The inhibitory activity of trypsin was found synthesized constitutively in leaf tissues of *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. The reference map for *C. baccatum* var. *pendulum* was constructed representing the first genetic map for the species. The mapping and transferability of microsatellite markers designed to *C. annuum* represent important information, because it introduces the species *C. baccatum* in studies of synteny with other *Capsicum* species and also with other Solanaceae members. In addition, we obtained the first QTLs for relevant agronomic traits in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, including QTLs for yield components that may be useful in future programs using marker assisted selection.

1. INTRODUÇÃO

Pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) são amplamente cultivados em todo mundo e desempenham significativo papel para a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Pimentas foram encontradas junto com outros fósseis de alimentos há cerca de 6.000 anos atrás e são consideradas o primeiro tempero que foi utilizado por humanos (Perry et al., 2007; Hill et al., 2013).

O Brasil é um centro de diversidade do gênero *Capsicum*, abrigando espécies domesticadas, semidomesticadas e silvestres (Monteiro et al., 2010; Nascimento et al., 2012). O cultivo de pimentas está difundido em todas as regiões do país, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (Costa et al., 2010).

As plantas de pimenta possuem grande diversidade no que diz respeito aos atributos morfológicos, principalmente formato do fruto, tamanho, cor, aroma, textura e pungência, resultando em múltiplos usos, como frutos frescos para consumo *in natura*, ou secos para processamentos em pós ou extratos (Albrecht et al., 2012).

O gênero *Capsicum* é composto por 35 espécies, sendo cinco domesticadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* e *C. pubescens* (Carrizo et al., 2013). Entretanto, o melhoramento de *Capsicum* tem sido desenvolvido dando-se ênfase à espécie *C. annuum*, com pouca pesquisa sendo conduzida com outras espécies, sobretudo com *C. baccatum* (Rodrigues et al., 2012). O fato de a espécie *C. baccatum* ser subutilizada em programas de

melhoramento de plantas quando comparada a outras espécies do gênero *Capsicum*, provavelmente se deve a barreiras para fertilização entre as espécies (Albrecht et al., 2012).

Entretanto, esta realidade está sendo transformada e alguns trabalhos nas áreas de recursos genéticos, pré-melhoramento e melhoramento estão sendo desenvolvidos no Brasil para a espécie *C. baccatum*, sendo esses voltados principalmente para caracterização morfoagronômica e resistência a doenças (Rêgo et al., 2009; Gonçalves et al., 2011; Rêgo et al., 2011a; Rêgo et al., 2011b; Rodrigues et al., 2012; Potnis et al., 2012; Bento et al., 2013; Gonçalves et al., 2013). Cruzamentos interespecíficos para a introgressão de um gene de resistência à mancha bacteriana em *C. annuum* a partir de *C. baccatum* já foram obtidos com sucesso por Potnis et al., (2012).

Além de informações fenotípicas, o conhecimento sobre a diversidade genética e genômica das espécies de pimenta também é importante para auxiliar o melhoramento da cultura. Vários estudos genéticos têm sido realizados para o gênero *Capsicum*, e as abordagens se baseiam, principalmente, no uso de marcadores moleculares (Wahyuni et al., 2013). O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto dessa tecnologia, nos quais é feita uma ampla cobertura e análise completa do genoma da espécie. Diversos mapas genéticos foram estabelecidos para *C. annuum* (Lefebvre et al., 1995; Lefebvre et al., 2002; Paran et al., 2004; Sugita et al., 2005; Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007; Mimura et al., 2012; Sugita et al., 2013), entretanto não há mapas genéticos descritos na literatura para *C. baccatum*.

Diversos tipos de marcadores moleculares já foram utilizados para o desenvolvimento de mapas de ligação de alta resolução para *C. annuum* como, por exemplo, SSRs (*Simple Sequence Repeats*) (Wu et al., 2009; Mimura et al., 2012; Sugita et al., 2013), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Paran et al., 2004; Barchi et al., 2007; Lee et al., 2009), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Sugita et al., 2005; Barchi et al., 2007; Lee et al., 2009), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Sugita et al., 2005; Barchi et al., 2007), e CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) (Lee et al., 2009). RFLP e RAPD são os marcadores mais comumente utilizados para a construção desses mapas (Mimura et al., 2012).

O mapeamento genético é de grande utilidade para os programas de melhoramento de plantas por possibilitar o mapeamento de locos que controlam características quantitativas (QTLs – *Quantitative Trait Loci*), proporcionam o conhecimento sobre a posição de um gene e a sua região adjacente, permite a interpretação dos mecanismos evolutivos e a predição de descendências de cruzamentos controlados, além de contribuir para estudos de sintenia ou mapeamento comparativo e clonagem de genes (Shirasawa et al., 2012). Uma das mais importantes utilidades dos mapas genéticos é, sem dúvida, o mapeamento de genes e QTL. A partir do mapeamento de QTL é possível estudar a base genética dos caracteres complexos (Paterson, 1991; Bhering et al., 2008). Diante disso, a construção de um mapa genético para a espécie *C. baccatum* e a identificação de QTLs associados a importantes características agrônômicas representam significativas contribuições para a genômica de plantas e para o melhoramento do gênero *Capsicum*.

Além do crescente interesse pela caracterização genômica da espécie, pesquisas voltadas para a obtenção de cultivares resistentes a patógenos também estão entre os principais objetivos dos programas de melhoramento. Dentre as doenças que representam um dos fatores limitantes à produção das espécies de *Capsicum*, destacam-se as viroses (Lopes & Ávila, 2003).

Para a pimenta, o *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) é considerado uma das doenças virais que causam maiores prejuízos na fase pré-colheita causando severas perdas na produção (Juhász et al., 2008). Alguns recursos genéticos resistentes ao PepYMV em *Capsicum* têm sido relatados em pimentas no Brasil (Nascimento, 2007; Gioria et al., 2009; Bento et al., 2009; Gonçalves et al., 2013). Em 2008, a UENF iniciou um programa de melhoramento de *C. baccatum* visando desenvolver genótipos que, entre outros atributos, fossem resistentes ao PepYMV (Gonçalves, 2010; Bento, 2012). Para melhor entendimento sobre a interação *C. baccatum* – PepYMV, estudos de identificação de proteínas relacionadas à patogênese foram conduzidos por Gonçalves et al., (2013), que identificaram a presença e atividade de peroxidase associada com a resistência ao vírus no acesso UENF 1624.

A maioria das plantas produzem inibidores de proteases que podem estar relacionados à defesa contra insetos e organismos fitopatogênicos (vírus, bactérias e fungos). Esses inibidores podem ser encontrados constitutivamente,

ou seja, produzidos durante o desenvolvimento normal das plantas, ou ser induzidos nas plantas em resposta ao ataque de um patógeno ou outros predadores (Joshi et al., 2013).

A continuidade da investigação sobre a interação planta-vírus deve considerar a importância dos inibidores de proteases para o mecanismo de defesa das plantas, bem como a detecção e a caracterização bioquímica dessas moléculas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais:

- a) Gerar um mapa genético de referência para a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, baseado em marcadores codominantes microssatélites e em marcadores dominantes ISSR e RAPD;
- b) Investigar a presença e o papel de inibidores de protease na interação existente entre o acesso UENF 1624 e o patógeno *Pepper yellow mosaic virus*.

2.2. Objetivos Específicos:

- a) Construir um mapa de ligação de referência para a espécie *Capsicum baccatum* var. *pendulum* a partir de uma população F₂ obtida do cruzamento intraespecífico entre os acessos UENF 1616 e UENF 1732;
- b) Avaliar a transferência de marcadores microssatélites disponíveis para *Capsicum annuum* em *Capsicum baccatum* var. *pendulum*;
- c) Mapear possíveis QTLs associados a dezesseis características agronômicas de grande interesse ao melhoramento genético da espécie;
- d) Detectar a presença de inibidores de proteases na espécie *C. baccatum*, em especial inibidores de tripsina, e analisar a existência ou não de um possível envolvimento com a resistência ao *Pepper yellow mosaic virus*.

3. CAPÍTULOS

3.1. MAPEAMENTO GENÉTICO E IDENTIFICAÇÃO DE QTLs ASSOCIADOS A DIFERENTES CARACTERES AGRONÔMICOS EM *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

3.1.1. INTRODUÇÃO

Mapas de ligação representam um recurso fundamental para estudos de características genéticas complexas em espécies vegetais (Chutimanitsakun et al., 2011). A construção de um mapa genético estimula a aquisição de informações importantes para o melhoramento genético de uma espécie. Tais informações variam desde a associação de marcadores com caracteres qualitativos e localização dos mesmos nos grupos de ligação, até a identificação de regiões genômicas associadas a caracteres quantitativos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Melhoristas de plantas e geneticistas têm se beneficiado da disponibilidade de ferramentas da biologia molecular, como os marcadores moleculares, para o desenvolvimento de mapas de ligação saturados (Chutimanitsakun et al., 2011). A possibilidade de identificar, mapear e medir os efeitos dos genes controladores dos caracteres quantitativos, utilizando-se marcadores moleculares, é uma

importante contribuição para o melhoramento de plantas, especialmente para espécies pouco estudadas. Marcadores associados aos QTLs, depois de mapeados e verificado que explicam uma alta porcentagem da variação fenotípica, podem ser utilizados para seleção indireta (SAM – Seleção Assistida por Marcadores), o que torna o processo de escolha de um determinado genótipo rápido e eficiente (Moretzsohn et al., 2009).

O mapeamento genético facilita o trabalho de melhoramento, uma vez que uma ou mais marcas do genótipo podem estar associadas a um ou mais genes controladores de características qualitativas e quantitativas (QTL) (Bhering et al., 2008). O mapeamento de QTLs é uma excelente abordagem para o estudo de características mais complexas e tem como princípio básico a obtenção de dados fenotípicos numa progênie e a identificação de regiões no genoma onde o genótipo do marcador pode ser associado ao fenótipo dos indivíduos (Broman & Sen, 2009). Neste contexto, marcadores microssatélites são considerados úteis e muito confiáveis para a construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs em populações de *Capsicum* (Sugita et al., 2013).

Em *Capsicum*, alguns estudos de mapeamento já foram realizados (Lefebvre et al., 1995; Lefebvre et al., 2002; Paran et al., 2004; Sugita et al., 2005; Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007; Mimura et al., 2012; Sugita et al., 2013). Entretanto, não há mapas genéticos descritos para *C. baccatum* var. *pendulum*. De acordo com Rodrigues et al., (2012), o melhoramento de *Capsicum* tem sido desenvolvido dando-se ênfase à espécie *C. annuum*, com pouca pesquisa sendo conduzida com outras espécies, sobretudo com *C. baccatum*, apesar do seu potencial de uso não somente como fonte de resistência a doenças, mas também na obtenção de novos genótipos para uso pelos produtores. Rêgo et al., (2009) ressaltam a alta variabilidade genética da espécie, mostrada principalmente no fruto, que pode ter diferentes formas, coloração, tamanhos e níveis de pungência.

Estudos sobre a identificação de QTLs no gênero *Capsicum* também tem sido efetuados (Rao et al., 2003; Minamiyama et al., 2007; Barchi et al., 2009; Mimura et al., 2009; Lee et al., 2011; Alimi et al., 2013). Contudo, nenhum deles está relacionado a caracteres agrônômicos de *C. baccatum* var. *pendulum*, uma vez que não existem mapas descritos para a espécie. Diante disso, o presente trabalho objetivou: i) gerar um mapa genético de referência para uma população

F₂ de *C. baccatum* var. *pendulum*, baseado em marcadores moleculares do tipo microssatélite, ISSR e RAPD; ii) averiguar a transferência para *C. baccatum* de marcadores microssatélites disponíveis para *C. annuum*; e iii) mapear QTLs que controlam características de interesse agrônomo para o melhoramento genético da espécie.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Origem, dispersão, aspectos botânicos e reprodutivos de *Capsicum*

O gênero *Capsicum* é conhecido desde o início da civilização do hemisfério Norte, havendo registros de que o gênero faça parte da dieta humana desde 7500 a. C. (MacNeish, 1964, citado por Akbar et al., 2010).

Segundo Moscone et al., (2007), o gênero *Capsicum* se originou na Bolívia Sul-Central, possuindo a espécie *Capsicum chacoense* como ancestral comum, que posteriormente passou por um processo de especiação e dispersão para os Andes e terras baixas da Amazônia. No século XVI, com as navegações portuguesas e espanholas ocorreu a dispersão mundial do gênero *Capsicum*, sendo cultivado tanto em regiões tropicais quanto temperadas (McLeod et al., 1982; Hill et al., 2013).

As espécies do gênero *Capsicum* pertencem à Divisão Spermatophyta, Filo Angiospermae, Classe Dicotyledoneae, Ordem Solanales e Família Solanaceae (Andrews, 1995). São 35 espécies confirmadas e cinco em vias de classificação, sendo constituído por cinco espécies domesticadas e as demais, silvestres (Carrizo et al., 2013). A identificação de espécies de *Capsicum* é tradicionalmente baseada em características morfológicas e estudos de hibridação (Ince et al., 2010).

As espécies que compõem este gênero estão distribuídas em três complexos gênicos distintos com base na cruzabilidade. O complexo *C. annuum* reúne as espécies *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*; o complexo *C. baccatum* reúne *C. baccatum* var. *baccatum* (forma silvestre) e *C. baccatum* var.

pendulum (forma cultivada); e o complexo *C. pubescens* reúne algumas espécies silvestres e apenas uma cultivada, a *C. pubescens* (Pickersgill, 1991; Martins et al., 2010).

O Brasil é um importante centro de diversidade para o gênero *Capsicum*, por abrigar tanto espécies domesticadas como semidomesticadas e silvestres (Monteiro et al., 2010; Nascimento et al., 2012), e devido ao longo histórico de cultivo e à grande quantidade de espécies nativas, o Brasil é um dos países que tem a maior variabilidade para as espécies do gênero (Reifschneider, 2000). Novas espécies de *Capsicum* estão sendo descritas no Brasil. Barbosa et al., (2011) descreveram duas espécies, *C. caatingae* e *C. longidentatum*, e Barbosa (2011) descreveu uma nova espécie denominada *C. eshbaughii*.

Acessos de *Capsicum* são usualmente caracterizados com base nas características anatômicas de folha, flor e fruto (Dias et al., 2013). O fruto, por exemplo, possui grande variação quanto à pungência, cor, sabor, tamanho e uso. Essa grande diversidade existente tem fomentado os programas de melhoramento genético (Monteiro et al., 2010).

A planta possui caule semilenhoso e é arbustiva, podendo ultrapassar um metro de altura. Seus frutos são geralmente bagas ocas, pendentes, de formatos e tamanhos variados, cores com diferentes gradações, passando por verde, vermelho, amarelo, creme e roxo, quando maduros (Reifschneider, 2000; Lim, 2013).

Uma característica notável do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de capsaicinoides. Tais alcaloides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho et al., 2003). Além da placenta, estas substâncias estão presentes em menores quantidades nas sementes e no pericarpo. Os capsaicinoides constituem um grupo de 12 ou mais alcaloides relacionados, responsáveis pela sensação pungente em frutos do gênero *Capsicum* (Ayuso et al., 2008).

Capsicum possui espécies com 24 e 26 cromossomos. Em termos mais específicos, *C. baccatum*, objeto de estudo deste trabalho, é diploide, possuindo 24 cromossomos ($2n=2x=24$) (Moscone et al., 2007; Martins et al., 2010).

A espécie *C. baccatum* tem seu centro de diversidade na Bolívia, sugerindo-se que possivelmente a espécie tenha seu centro de origem na mesma região, há cerca de 4500 atrás (Moscone et al., 2007). É uma das pimentas mais

difundidas em todo o mundo e mais comumente cultivada no Brasil (Lannes et al., 2007; Rêgo et al., 2009). Apesar de sua grande variabilidade genética, praticamente todos os estudos têm sido voltados para *C. annuum* (Souza & Maluf, 2003; Rodrigues et al., 2012).

Dentre as duas variedades botânicas (var.) da espécie *C. baccatum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, encontra-se difundida principalmente na região que abrange da costa do Peru ao Brasil (Eshbaugh, 1970; Albrecht et al., 2012), e é caracterizada por possuir flores de corola branca com manchas amareladas e uma única flor por nó (Lim, 2013). A outra variedade, *C. baccatum* var. *baccatum*, possui distribuição semelhante a *C. baccatum* var. *pendulum*, contudo diferencia-se da primeira por possuir manchas esverdeadas nas corolas e duas a três flores por nó, sendo essas as únicas diferenças entre essas variedades (Viñals et al., 1996).

A planta de *C. baccatum* var. *pendulum* possui porte médio a pequeno, hábito ereto, suas flores são isoladas, pequenas e hermafroditas. Os cálices dos frutos maduros são evidentemente dentados e não possuem constrição anelar na junção do pedicelo. Os frutos são de várias cores e formas, pendentes, com polpa firme e as sementes são de cor creme (Carvalho & Bianchetti, 2004). Na verdade, o nome “*pendulum*” faz menção ao caráter pendente dos frutos. O tamanho do fruto aumentou como resultado da pressão de seleção humana, tendo a seleção indireta para os maiores frutos favorecido o aumento do seu peso. (Albrecht et al., 2012).

3.1.2.2. Importância econômica e nutricional

Pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas no mundo, sendo utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Büttow et al., 2010) e são consideradas uma das principais culturas em países de clima tropical (Than et al., 2008). No Brasil, as pimentas possuem relevante importância econômica e cultural, o que se caracteriza pelos múltiplos usos do fruto na culinária das diversas regiões brasileiras (Sudré et al., 2010). Entretanto, apesar dessa significância, o gênero é bem menos estudado em

comparação com outras plantas cultivadas da família Solanaceae, tais como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Albrecht et al., 2012).

Segundo Cruz & Banci (2008), as pimenteiras do gênero *Capsicum* possuem um cultivo relativamente fácil, quando comparadas a outras solanáceas, como a batata, tomate e mesmo o pimentão. Segundo dados da FAO (2011) pimentas do gênero *Capsicum* ocupam uma área de mais de 1,8 milhões de hectares em todo mundo, e uma produção estimada em mais de 28 milhões de toneladas em 2006, mas esses dados não separam as pimentas dos pimentões. Os maiores produtores de pimenta são China, Índia, México, Indonésia, Coréia, Nigéria, Gana e Turquia (Akbar et al., 2010).

As culturas de pimenta e pimentão são importantes para o agronegócio brasileiro, ocupando cerca de 12.000 ha, e com produção de mais de 348.000 toneladas de frutos por ano (Ribeiro et al., 2008). A crescente demanda interna, cerca de R\$ 80 milhões por ano, tem impulsionado o aumento de área cultivada e o estabelecimento de agroindústrias, o que torna o agronegócio de *Capsicum* um dos mais importantes do Brasil (Panorama Rural, 2006; Rêgo et al., 2011b).

O cultivo de pimenta ocorre praticamente em todas as regiões brasileiras e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração pequeno agricultor-agroindústria. Os principais Estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul (Rufino e Penteado, 2006). Cultivar pimentas contribui para o aumento da renda nas pequenas propriedades e para a fixação de trabalhadores na área rural, já que demandam muita mão de obra para a colheita (Sudré et al., 2010). Nascimento et al., (2012) relatam que o agronegócio de pimenta e pimentão tem uma grande importância na agricultura familiar, devido à grande demanda de mão de obra, chegando a contribuir com 60,8% do custo de produção.

A produção de pimenta para uso como condimento de diversos produtos alimentícios industrializados cresceu significativamente nos últimos anos. Existe intenso comércio internacional de pimenta-vermelha, seca em pó, com ou sem sementes e com diversos níveis de pungência. 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 geléias, molhos e

blends (vidros com misturas de frutos usados como peças para decoração de casas) (Nascimento et al., 2012).

No Brasil, a área cultivada para processamento industrial na forma de pó (páprica) ainda é muito pequena, compreendendo menos de 1.200 ha, sendo boa parte desta produção exportada. Grande parte da população brasileira desconhece a existência e a composição da páprica, assim como sua utilidade na culinária, porém há um forte potencial para sua popularização (Ribeiro & Cruz, 2003). Os carotenóides, pigmentos comuns no gênero *Capsicum*, são responsáveis pela sua coloração e pelo corante vermelho da páprica (Reifschneider, 2000).

A espécie *C. baccatum* foi tradicionalmente cultivada durante centenas de anos na região dos Andes, e compreendem a maioria das pimentas consumidas *in natura* ou na forma de páprica nos países andinos. Há também uma crescente demanda do produto por parte de países europeus (Rodriguez-Burruezo et al., 2009). Frequentemente são também utilizadas como plantas ornamentais. Entretanto, a diversidade genética e o potencial econômico da planta têm sido pouco explorados pelo melhoramento de plantas (Rêgo et al., 2011a).

No Brasil, *C. baccatum* var. *pendulum* é cultivada principalmente nas regiões sul e sudeste. Dependendo das características dos frutos, pode ser chamada de pimenta ‘dedo-de-moça’ ou pimenta ‘cambuci’ (chapéu-de-bispo). Neste grupo de pimentas, a pungência dos frutos é menos intensa, há inclusive cultivares de pimenta que são doces (Carvalho & Bianchetti, 2004).

Quanto à importância nutricional, os frutos de *Capsicum* são fonte importante de três antioxidantes naturais: a vitamina C, os carotenóides (geralmente presentes em altas concentrações, sendo importantes para o valor nutricional e coloração do fruto) e a vitamina E. Também estão presentes em seus frutos as vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, B-6 e ácido fólico) e vitamina A, em menores proporções, além de tocoferóis, flavonóides e capsaicinóides (Wahyuni et al., 2013). As pimentas possuem maiores valores de vitaminas B₁ e B₂, além da capsaicina (Viñals, 1996). Os frutos do gênero possuem também proteínas, glicídios, lipídeos, minerais, água e pequena taxa de matéria seca, cerca de 20 a 24%. Os frutos são, ainda, fontes importantes de fibras, elementos essenciais no processo de digestão e que previnem problemas intestinais e alguns tipos de cânceres (Reifschneider, 2000).

No gênero, podem existir frutos pungentes ou não-pungentes. A pungência da pimenta deve-se à presença de capsaicina. A aplicação farmacêutica da capsaicina é atribuída as suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, antiartrites e analgésicas (Akbar et al., 2010; Ashrafi et al., 2012).

O gênero *Capsicum* pode estar associado à medicina tradicional humana, tendo efeito inclusive sobre a bactéria causadora da cárie, *Streptococcus mutans* (Santos et al., 2011). Também se encontram relatos de seu uso no combate a enfermidades em criações domésticas. Entretanto, o uso das plantas de *Capsicum* é mais fortemente relacionado a produtos condimentares, devido aos alcaloides (capsaicinoides) contidos em seus frutos (Ayuso et al., 2008). Em alguns casos, 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; Silva, 2013; Hill et al., 2013).

A extração de oleoresina dos frutos pode ter uso potencial na fabricação de cremes analgésicos para aliviar dores musculares e distúrbios articulares. Foi verificado também que o uso regular de pimenta influencia a liberação de endorfinas, mediadores químicos responsáveis pelo bem estar e pela variação do bom humor, além de reduzir o apetite e a ingestão de calorias (Adams, 2007). Recentemente, estudos mostraram que pré-tratamentos com suco de *C. baccatum* inibem significativamente a atividade dos leucócitos, tendo ação antiinflamatória no organismo (Lim, 2013).

3.1.2.4. Mapeamento Genético

3.1.2.4.1. Construção de mapas genéticos

O mapa de ligação de uma espécie pode ser definido como um arranjo linear de um grupo de genes ou marcadores adjacentes. Um mapa genético constitui-se no ordenamento e no estabelecimento da distância entre marcadores genéticos. Dois locos marcadores são considerados ligados sempre que possuam menos de 50% de recombinação entre os marcadores consecutivos (Schuster &

Cruz, 2004). O primeiro mapa genético foi desenvolvido por Sturtevant (1913), que determinou a posição e a ordem de seis genes em *Drosophila melanogaster*.

Os primeiros mapas genéticos foram fundamentados em marcadores morfológicos e citológicos, sendo concentrados nas culturas de tomate, batata, milho e ervilha. No início da década de 1960, as isoenzimas foram descobertas e passaram a ser usadas como marcadores bioquímicos, permitindo a construção de mapas genéticos em diversas espécies de planta (Carneiro & Vieira, 2002). Entretanto, esses marcadores estão disponíveis em número limitado, sendo muito difícil obter uma ampla cobertura do genoma (Caixeta et al., 2006).

Na década de 1980, com o advento dos marcadores de DNA, mapas genéticos foram amplamente saturados para as mais diferentes culturas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Mapas genéticos que levaram décadas para serem desenvolvidos em virtude da restrita disponibilidade de marcadores morfológicos e isoenzimáticos foram amplamente saturados com o uso de marcadores moleculares.

A construção de mapas genéticos detalhados com alto nível de cobertura do genoma possuem inúmeras finalidades ao melhoramento de plantas (Tanksley, 1993), como por exemplo: i) cobertura e análise do genoma; ii) permitir o mapeamento comparativo entre as diferentes espécies, a fim de avaliar a semelhança entre os genes, ordens e função na expressão de um fenótipo; iii) predição de descendências de cruzamentos controlados; iv) decomposição de caracteres complexos em seus componentes mendelianos e v) identificação de marcas relacionadas com regiões-chave do genoma para a expressão de características quantitativas (QTL) (Semagn et al., 2006).

Um mapa de ligação deve seguir critérios técnicos e metodológicos tais como simplicidade, robustez, transferência, e relação custo-eficácia (Lorieux et al., 2000). De acordo com o proposto por Liu (1998), Carneiro & Vieira (2002), Wu et al., (2007) e Toledo et al., (2008), a metodologia de construção de um mapa genético integra uma série de procedimentos que incluem:

- 1) Escolha de genitores contrastantes;
- 2) Desenvolvimento de uma população segregante apropriada ao mapeamento;
- 3) Escolha do tipo de marcador para genotipar a população;
- 4) Verificação do padrão mendeliano de segregação de cada loco marcador;

- 5) Análise da ligação entre todos os pares de marcadores para a formação dos grupos de ligação e
- 6) Estimação da ordem e distância dos locos marcadores adjacentes ou marcadores flanqueadores dentro dos grupos de ligação.

Para construção de um mapa genético uma premissa básica é a seleção de genitores contrastantes (tanto para expressão genotípica quanto fenotípica para caracteres de interesse agrônomico), já que o número de marcas no mapa representa o número de caracteres contrastantes nos genitores (Carneiro & Vieira, 2002).

Podem ser utilizados diferentes tipos de populações para a construção de mapas de ligação, tais como as obtidas por retrocruzamentos, populações F_2 , linhagens puras recombinantes, linhagens de duplo-haplóides e, no caso de espécies com fecundação cruzada, cruzamentos entre indivíduos heterozigotos (Collard et al., 2005). A escolha do tipo de população mais apropriada ao mapeamento está relacionada com o tipo de marcador, a finalidade do mapa a ser construído e as características da espécie, como tipo de reprodução e duração do ciclo de vida (Tanksley, 1993).

Populações F_2 são desenvolvidas por autofecundação do híbrido F_1 , derivado do cruzamento dos dois pais, enquanto em retrocruzamentos a população é produzida através do cruzamento de F_1 com um dos pais. As populações F_2 e aquelas oriundas de retrocruzamentos são as mais fáceis e rápidas de serem obtidas, sendo que o máximo de informação genética é alcançado quando se usa uma população F_2 e marcadores codominantes (Staub et al., 1996). Entretanto, possuem a desvantagem de os indivíduos serem únicos, dificultando a avaliação de uma determinada característica em ambientes diferentes (Coelho & Silva, 2002).

O tamanho da população de mapeamento também é um fator crítico para a construção do mapa de ligação, não havendo um padrão estabelecido em relação ao número de indivíduos (Bhering et al., 2008; Yarnes et al., 2013). Na prática, são utilizadas populações com tamanho variando de 50 a 250 indivíduos. Mapas desenvolvidos com um pequeno número de indivíduos fornecem grupos de ligação fragmentados e imprecisos (Ferreira et al., 2006). De acordo com Semagn et al., (2006), mapas acurados são obtidos para todos os tipos de população utilizados quando o quantitativo é igual ou maior que 200 indivíduos, entretanto

poucos estudos tem sido feito com esse quantitativo. Para Rocha et al., (2003), um bom mapa pode ser construído a partir de uma população composta de pouco mais do que uma centena de indivíduos.

Geralmente, um elevado número de marcadores moleculares é usado na construção dos mapas de ligação. Os marcadores são agrupados dentro de um “grupo de ligação”, que, do ponto de vista biológico, são grupos de genes (marcadores) cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo (Collard et al., 2005).

A escolha do tipo de marcador a ser utilizado leva em consideração as vantagens e desvantagens do marcador, disponibilidade dos iniciadores, infraestrutura laboratorial, tempo necessário para a realização das avaliações e treinamento do pessoal envolvido. É importante também considerar o padrão de segregação dos marcadores, se codominante, segrega na proporção 1:2:1, se dominante, na proporção 3:1 (Liu, 1998).

Para verificar o padrão Mendeliano de segregação de cada loco marcador é geralmente utilizado teste de qui-quadrado (χ^2). A ligação entre o par de marcadores é analisada por comparações entre as frequências alélicas observadas e as frequências esperadas. Contudo, pode ocorrer distorção da segregação mendeliana, sendo causada, por exemplo, pelo efeito de amostragem, rearranjos cromossômicos ou viabilidade diferencial de gametas (Priyamedha et al., 2012). Essa distorção da segregação é um fenômeno comum nas análises genômicas, podendo aumentar o poder estatístico dos mapeamentos de QTLs com efeitos aditivos e diminuir o poder em mapeamento de QTLs com efeitos dominantes (Xu et al., 2008).

Bhering et al., (2008), ressaltam que na construção de um mapa genético, um importante passo é a análise de ligação entre pares de locos, para se verificar a existência de ligação entre eles. O teste apropriado para essa situação é o do qui-quadrado (χ^2). Entretanto, tal teste é apenas qualitativo e, quando se detecta evidência de ligação, não é possível obter-se a porcentagem de recombinação entre os pares de marcadores. O método mais utilizado para a estimação da porcentagem de recombinação é o método da máxima verossimilhança.

O método mais importante e comum de mapeamento utiliza a frequência de recombinação para determinar a distância relativa entre dois marcadores ligados. Existem funções de mapeamento que estabelecem a relação entre

distância de mapa e frequência de recombinação entre os pares de marcas (Bhering et al., 2009). Elas convertem as frações de recombinação em unidades de mapa denominado centimorgans (cM). Por definição, uma unidade de mapa é igual a 1% de recombinação ou 1 cM. Diferentes funções de mapeamento são disponibilizadas, e as mais utilizadas são aquelas propostas por Haldane (1919) e Kosambi (1944). A função de Kosambi é considerada mais completa, pois leva em consideração o fenômeno da interferência entre os eventos de permuta diferentes (Schuster & Cruz, 2004).

A significância de ligação é definida pelo valor do LOD Score da estimativa da fração de recombinação entre os dois marcadores. A estatística consiste em utilizar a razão de verossimilhança convertida para o logaritmo na base 10. Em geral, ligações de locos possuem maior credibilidade quando os valores de LOD Score são iguais ou maiores que 3.

Para análise da ligação e ordenamento das marcas nos grupos de ligação são requeridos pacotes computacionais otimizados. Para Wu et al., (2007), os principais programas utilizados para elaboração de mapas de genéticos são: Mapmaker/EXP (Lander et al., 1987), Gmendel (Liu & Knapp, 1992), Map Manager QTX (Manly et al., 2001) e JoinMap (Van Ooijen & Voorrips, 2001). Os princípios básicos para construção do mapa são basicamente os mesmos para os diferentes programas estatísticos.

Mapas genéticos são construídos utilizando-se diferentes tipos e tamanhos de populações de mapeamento, sistemas de marcadores, procedimentos estatísticos e programas de computador (Ferreira et al., 2006). Cada fator pode afetar a eficiência do processo de mapeamento por causa das diferenças nas distâncias genéticas entre marcadores que podem ocorrer por variações no grau de recombinação observada em diferentes cruzamentos (Liu, 1998). Podem ser obtidos diferentes mapas gerados para populações diferentes da mesma espécie (Paterson et al., 2000).

A elaboração de um bom mapa genético depende da qualidade dos dados do pesquisador. O pesquisador deve detectar se há erros presentes nos dados, tais como erro de digitação, falta de dados, erro de codificação do genótipo, ordem de genótipos ao longo de todos os loci, entre outros.

3.1.2.4.2. Mapas genéticos em *Capsicum*

A pimenta cultivada é uma espécie diploide, com $2n=2x=24$. Seus cromossomos são grandes quando comparados aos de outras espécies vegetais, com um tamanho de genoma haplóide estimado entre 3,3 a 3,6 Gb (Moscone et al., 2003; Hill et al., 2013).

Mapas genéticos de *Capsicum* foram construídos utilizando populações obtidas por cruzamentos intra e interespecíficos. O primeiro mapa de ligação de *Capsicum* foi construído baseado em poucos marcadores, usando uma população interespecífica de *C. annuum* cv. NuMex RNaky e *C. chinense* PI 159234 (Tanksley, 1984) para mapear genes que codificam enzimas. Entretanto, o primeiro mapa genético com maior cobertura do genoma, contendo 85 marcas RAPD, foi desenvolvido por Tanksley et al., (1988) utilizando *C. annuum* cv. Doux des Landes cruzada com a mesma cultivar de *C. chinense*. Esta população foi mapeada com marcadores derivados de estudos de mapa em tomate, havendo alta conservação do repertório de genes, mas a ordem dos genes foi grandemente modificada. Mais tarde, um estudo posterior usando o mesmo cruzamento possibilitou a confecção de um mapa mais elaborado, contendo 192 marcadores (Prince et al., 1993).

Em seguida, diversos mapas derivados do cruzamento de populações intraespecíficas de *C. annuum* foram disponibilizados (Lefebvre et al., 1995; Lefebvre et al., 2002; Paran et al., 2004; Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007; Sugita et al., 2007; Mimura et al., 2012). Lefebvre et al., (1995) desenvolveram o primeiro mapa integrado para *C. annuum* a partir de marcadores RAPD e RFLP, obtendo um total de 85 marcas, cobrindo cerca de 820 cM, e dispostos em 14 grupos de ligação.

Um mapa saturado para *C. annuum* foi construído por Lefebvre et al., (2002), no qual três mapas individuais foram integrados possibilitando a formação de doze grupos de ligação, correspondendo ao número básico de cromossomos de pimenta. Este primeiro mapa consenso funcional contém 100 marcadores de genes de função conhecida, tendo sido mapeados cinco loci de interesse agrônomico (loci de resistência a nematóides *Me3* e de resistência à *Xanthomonas Bs3*, de determinação do conteúdo de capsaicina, controle do hábito ereto dos frutos e da cor do fruto amarelo).

Paran et al., (2004) também construíram um mapa bastante saturado para *C. annuum*, produto de seis mapas integrados, consistindo de 2262 marcadores (1528 AFLP, 440 RFLP, 288 RAPD e 6 TAGs). Ao final, os marcadores foram ordenados em 13 grupos de ligação, com um comprimento total de 1832 cM. Sugita et al., (2005) propuseram um mapa de ligação para pimentão doce (*C. annuum*), no qual foram mapeadas 464 marcas moleculares (328 AFLP, 122 RAPD, 3 RFLP, 7 SCAR e 4 CAPS) em 11 grupos de ligação grandes e cinco menores, cobrindo 1043 cM.

Outro mapa foi elaborado por Minamiyama et al., (2006) utilizando 106 marcadores SSR para mapear uma progênie composta por 117 indivíduos F₂. O mapa gerado foi constituído por treze grupos de ligação com 1042 cM. Mimura et al., (2012) também desenvolveram um mapa de ligação para a espécie *C. annuum* baseado em 253 marcadores (151 SSRs, 90 AFLPs, 10 CAPSs e 2 TAGs) que possibilitaram a cobertura de 1336 cM do genoma. Este foi o primeiro mapa baseado em marcadores SSR que consistiu em 12 grupos de ligação. Recentemente, Sugita et al., (2013) desenvolveram o mapa com maior cobertura do genoma de *C. annuum*, baseado em 265 marcadores SSR, que foram distribuídos em doze grupos de ligação, cobrindo uma distância genética total de 2028 cM.

Poucos trabalhos de mapeamento foram realizados com as demais espécies cultivadas do gênero *Capsicum*, sendo resultantes de cruzamentos interespecíficos dentro do Complexo *C. annuum*, de acordo com a compatibilidade e fertilidade da progênie híbrida. Mapas de ligação interespecíficos, provenientes dos cruzamentos *C. annuum* x *C. frutescens* (Rao et al., 2003; Wu et al., 2009), e *C. annuum* x *C. chinense* (Tanksley et al., 1988; Prince et al., 1993; Kang et al., 2001; Lee et al., 2009; Lee et al., 2011), têm sido construídos.

Rao et al., (2003) utilizaram uma população derivada do cruzamento de *C. frutescens* BG2816 com *C. annuum* cv. Maor para estudar os caracteres relacionados à produção. O mapeamento foi baseado em 248 plantas provenientes de cruzamento interespecífico, 92 marcas RFLP foram distribuídas pelo genoma, sendo mapeados 58 QTLs associados a dez características relacionadas à produção. Wu et al., (2009) utilizando uma população F₂ resultante do cruzamento entre *C. frutescens* e *C. annuum* mapearam 299 marcadores

ortólogos entre pimenta e tomate, sendo este o primeiro mapa oriundo de população gerada pelo cruzamento interespecífico em que o número de grupos de ligação foi correspondente ao número de cromossomos.

Kang et al., (2001) obtiveram um mapa de ligação a partir de uma população F_2 constituída por 107 plantas, derivada do cruzamento entre *C. chinense* Habanero e *C. annuum* TF68. O mapa resultante consistiu de 11 grupos de ligação, cobrindo 1320 cM. Lee et al., (2009) construíram um mapa integrado a partir do mesmo cruzamento, no qual 805 marcadores foram dispostos em 1858 cM. O mesmo grupo de pesquisa, trabalhando com a progênie resultante desse cruzamento interespecífico, detectou um QTL responsável por explicar 27% da característica comprimento do fruto (Lee et al., 2011). Para as espécies *C. baccatum* e *C. pubescens*, ainda não existem mapas genéticos publicados.

3.1.2.4.3. Marcadores Moleculares

- Microssatélites

Os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple sequence repeats*) foram desenvolvidos por Hamada et al., (1982). Entretanto, o termo microssatélites foi cunhado pela primeira vez por Litt & Luty (1989), sendo posteriormente também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats* – Jacob et al., 1991) ou STR (*Short Tandem Repeats* - Edwards et al.,1991).

Locos microssatélites são sequências constituídas de um a seis nucleotídeos, que podem estar repetidas em *tandem*, diferindo quanto à composição dos nucleotídeos. Em geral, as sequências repetidas de di-nucleotídeo, tri-nucleotídeo, tetra-nucleotídeos estão mais amplamente distribuídas no genoma de plantas. O número dessas repetições nos indivíduos é variável e são responsáveis pelo polimorfismo gerado. Enquanto o número de repetições é variável, as sequências que flanqueiam o microssatélite são conservadas, sendo utilizadas para o ancoramento dos iniciadores e a amplificação do loco (Jiang, 2013). Esses marcadores têm sido utilizados nos mais diversos campos do estudo genético de espécies cultivadas e silvestres, bem como na identificação de origem parental, atribuição de linhagens, construção de mapas genéticos, avaliação do germoplasma de populações melhoradas e na estimativa de similaridade ou diversidade genética (Lacape et

al., 2007). São também considerados os marcadores mais difundidos para mapeamento de QTLs nas espécies animais e vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores microssatélites possuem inúmeras vantagens: herança codominante, são multialélicos, ocorrem abundantemente nos genomas, são altamente reprodutíveis e informativos, além de terem locos que são frequentemente conservados entre espécies relacionadas, facilitando o mapeamento comparativo (Simko, 2009). O mapeamento comparativo revela um elevado grau de colinearidade entre espécies intimamente relacionadas, permitindo a troca de marcadores entre elas (Zhu et al., 2012).

A grande limitação do uso de marcadores SSR em larga escala é a obtenção de iniciadores que serão usados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar alelos em cada loco. Trata-se de uma técnica de elevado custo e intensiva em mão de obra, considerando todas as etapas do seu desenvolvimento (Buso et al., 2000). Convencionalmente, o desenvolvimento de marcadores de SSR exige a seleção das bibliotecas genômicas e uma varredura destas para seleção de sequências repetitivas (Portis et al., 2007). Além disso, microssatélites estão disponíveis apenas para algumas culturas economicamente importantes por causa do alto custo e intensidade de trabalho para seu desenvolvimento (Kuleung et al., 2003).

A identificação e o desenvolvimento de marcadores microssatélites têm permitido aumentar significativamente a densidade dos mapas de ligação obtidos com outros marcadores, além de possibilitar estudos de filogenia e evolução de diferentes espécies. Segundo Novelli et al., (2000), os marcadores microssatélites podem funcionar como âncoras entre os mapas dos genitores, permitindo a construção de mapas consenso ou o mapeamento comparativo, além de possibilitarem maior robustez entre os mapas que compartilham estes marcadores nas mesmas posições.

Um bom número de marcadores microssatélites está disponível para *C. annuum*. Segundo Sugita et al., (2013), esse tipo de marcador é considerado útil e muito confiável para a construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs em populações de *Capsicum*. Os primeiros marcadores microssatélites para a espécie foram publicados por Huang et al., (2001). Nesse trabalho foram desenhados 58 pares de iniciadores a partir de uma biblioteca genômica

enriquecida com dez diferentes tipos de repetições, sendo que desses apenas cinco foram considerados polimórficos. Posteriormente, Lee et al., (2004) desenvolveram 40 pares de iniciadores microssatélites confiáveis a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para as repetições GT, GA, TTG e ATT.

O número de marcadores disponível para *C. annuum* aumentou consideravelmente com a publicação de Minamiyama et al., (2006). Os marcadores foram desenvolvidos a partir de bibliotecas genômicas enriquecidas para as repetições GA, GT, AAG, e AAT. De um total de 626 pares de iniciadores desenhados, 153 mostraram-se polimórficos, e os 106 que seguiram a segregação mendeliana foram utilizados para construção de um mapa de ligação para *C. annuum*.

Recentemente, Sugita et al., (2013) desenvolveram 265 pares de iniciadores SSR que foram utilizados para a construção de um elaborado mapa genético. Com isso, aproximadamente 500 marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para *C. annuum*, com base em bibliotecas genômicas de DNA. O gênero *Capsicum* possui um genoma de tamanho grande e uma base genética estreita. Portanto, mais marcadores SSR devem ser desenvolvidos para a construção de mapas genéticos de alta densidade em pimenta (Kong et al., 2012).

Esses marcadores são caracterizados por possuir uma alta taxa de transferência entre espécies aparentadas e até mesmo entre gêneros da mesma família (Gutierrez et al., 2005). Entretanto, para algumas espécies a taxa de polimorfismo gerada por marcadores microssatélites é muito baixa, havendo necessidade de efetuar cruzamentos interespecíficos, possibilitando maior sucesso na transferibilidade dos iniciadores. Não existem marcadores microssatélites descritos para a espécie *C. baccatum*, por isso, neste trabalho foi verificada a taxa de transferência desses marcadores já disponíveis para *C. annuum* para construção do mapa de ligação integrado para *C. baccatum*.

- ISSR

A técnica ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*) é caracterizada por iniciadores de 16-25 pb, que amplificam entre as sequências de microssatélites de diferentes tamanhos. Esta técnica foi relatada pela primeira vez por Zietkiewicz et al., (1994) e idealizada com base em iniciadores de microssatélites (Kumar et al., 2009). Ela pode revelar polimorfismos resultantes da variação de microssatélites

individuais cuja presença ou ausência difere entre genomas (loci dominantes) e resultantes da variação nas regiões entre microssatélites conservados (loci codominantes).

O ISSR possibilita a determinação da diversidade inter e intraespecífica, análises da identidade genética de uma espécie, confecção de mapas genéticos, estudos filogenéticos, além de caracterização e avaliação do germoplasma (Zietkiewicz et al., 1994; Lijun et al., 2012).

Nesta técnica, vários locos são gerados simultaneamente, detectando-se presença ou ausência de fragmentos de tamanho particular, o que possibilita o alto polimorfismo gerado. Este método possui alta reprodutibilidade, grande flexibilidade, não requer informações da sequência para a construção do iniciador, usa pequenas quantidades de DNA, e resulta em alto nível de polimorfismo (Kumar et al., 2001). Como limitação, sua segregação consiste em uma herança mendeliana dominante, podendo ocorrer problemas de reprodutibilidade (Kumar et al., 2009).

Para o gênero *Capsicum* não existem relatos sobre mapas genéticos baseados em marcadores ISSR. Os estudos com esse tipo de marcador se concentram em análises de diversidade para o gênero (Patel et al., 2011; Lijun et al., 2012; Ahmed, 2013; Dias et al., 2013). Ahmed (2013) descreve que, além de marcadores serem amplamente utilizados para caracterização e discriminação dos acessos, eles atuam como excelentes ferramentas para o mapeamento genético. Segundo Patel et al., (2011) esses marcadores possuem grande potencial para o mapeamento genético e localização de genes, a exemplo de outras espécies que tiveram seus mapas genéticos baseados em marcadores ISSR (Chen et al., 2011; Gupta et al., 2012; Priyamedha et al., 2012).

- RAPD

Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) foram desenvolvidos por Williams et al., (1990). São marcadores baseados em PCR que promovem a amplificação de segmentos arbitrários de DNA ao longo do genoma, a partir de iniciadores curtos (10 pb) e únicos (Jiang, 2013).

Marcadores RAPD têm sido largamente utilizados para análise da variabilidade e genotipagem, entretanto sua reprodutibilidade é baixa. A técnica também tem sido utilizada para outras finalidades, que vão desde estudos em

nível de indivíduo (por exemplo, identidade genética) para estudos envolvendo espécies estreitamente relacionadas, até estudos em populações de mapeamento de genes para auxiliar na saturação de regiões não cobertas por outros marcadores (Kumar et al., 2009). A técnica RAPD é mais eficiente nos estudos de divergência genética em que os indivíduos analisados são geneticamente próximos, ou seja, pertencem a uma mesma espécie (Collard & Mackill, 2008).

Como vantagens da técnica RAPD, destacam-se: a simplicidade, pois é fácil de ser executada; a rapidez na obtenção de dados; o custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares; e a aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo. Além disso, não requer o desenvolvimento prévio de bibliotecas de sondas específicas para o organismo de interesse, sendo exigida uma quantidade mínima de DNA na análise genômica de um indivíduo, possibilitando resultados de grande validade prática (Caixeta et al., 2006).

A principal desvantagem dos marcadores RAPD é sua herança dominante, ou seja, não se pode determinar se uma banda de um gel de RAPD é produto da amplificação de um ou dois fragmentos de DNA e, assim, indivíduos homocigotos dominantes não podem ser diferenciados dos heterocigotos (Williams et al., 1990). Além disso, esses marcadores têm baixa reprodutibilidade dos resultados em laboratório, sendo considerados, sob ponto de vista genético, menos eficientes que as técnicas de RFLP e SSR (Alzate-Marin et al., 2005).

A técnica de RAPD permite analisar um maior número de locos por ensaio e não necessita de trabalho prévio de seleção, o que possibilita um significativo avanço na rapidez de construção de mapas genéticos, tendo os marcadores RAPD sido amplamente usados para esse fim. Esses marcadores estão descritos na literatura para mapeamento da espécie *C. annuum* (Ben Chaim et al., 2001; Sugita et al., 2005; Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007).

3.1.2.5. Mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*)

O desenvolvimento de mapas genéticos é de grande utilidade no auxílio a programas de melhoramento de plantas, possibilitando o mapeamento de locos que controlam características quantitativas, poligênicas ou de herança complexa,

denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (Tanksley, 1993). Uma das principais aplicações dos mapas de ligação para o melhoramento de diversas culturas vegetais tem sido o mapeamento de QTLs em cruzamentos intraespecíficos (Chutimanitsakun et al., 2011). QTLs são regiões do genoma responsáveis pela variação de um caráter quantitativo, e seu estudo permite a identificação e o mapeamento de características agrônômicas de maior interesse dos melhoristas (Toledo et al., 2008).

O mapeamento de QTLs pode levar a um melhor entendimento da interação entre genótipo e fenótipo. Segundo Bernardo (2008), o mapeamento de QTLs tem como objetivo aumentar o conhecimento da herança genética dos caracteres e identificar marcadores moleculares que podem ser utilizados na seleção assistida para características fenotípicas relevantes, tais como produção e resistência a doenças.

A técnica possibilita estimar a posição e o número de locos que controlam a característica quantitativa, assim como o modo de ação gênica (aditividade, dominância e epistasia), a decomposição da interação genótipos por ambientes ao nível de cada QTL, além de permitir estudos de sintenia ou mapeamento comparativo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). QTLs não levam necessariamente a identificação de um gene específico, podendo corresponder à identificação de regiões que possuem até dezenas de genes. Uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores é a identificação da posição dos QTLs e do tamanho do seu efeito (Broman & Sen, 2009).

Para o mapeamento, são necessárias informações tais como: caráter quantitativo de interesse, dados de marcadores moleculares os quais são associados aos QTLs e uma metodologia adequada para associá-los (Toledo et al., 2008). Diversas metodologias foram propostas para a identificação de QTLs a partir do final da década de 1980. Dentre estas, destacam-se o mapeamento por marca simples, mapeamento por intervalo e mapeamento por intervalo composto. O mapeamento por marca simples é baseado na comparação entre as médias das classes genotípicas dos marcadores, feitas por regressão linear, teste t, análise de variância e razão de verossimilhança. No mapeamento por intervalo, a associação entre o marcador e QTL pode ser estimada pelo método da máxima verossimilhança, que é fundamentado nas frequências conjuntas de um par de marcas adjacentes e um QTL pontual. O mapeamento por intervalo composto

emprega a combinação de mapeamento de intervalo simples e a regressão linear múltipla (Schuster & Cruz, 2004).

Para que seja estimada a magnitude dos efeitos dos QTLs, os mapas genéticos devem ter uma boa saturação. Segundo Wu et al., (2007), quanto maior a distância entre dois marcadores, menor a precisão da estimativa de um QTL entre esses marcadores. Além disso, três fatores devem ser considerados na associação coerente dos marcadores moleculares aos QTLs: i) repetibilidade da informação da ligação entre os marcadores e respectivos QTLs em diferentes populações; ii) interação QTLs x ambiente e; iii) seleção simultânea para vários caracteres (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em pimenta, alguns estudos têm sido relatados envolvendo parâmetros genéticos de uma série de características e o mapeamento de seus respectivos QTLs (Alimi et al., 2013). A maior parte dos estudos de QTLs em pimenta tem como foco características comerciais, como características do fruto e da produção (Rao et al., 2003; Wang et al., 2004; Zygier et al., 2005; Lee et al., 2008; Barchi et al., 2009; Lee et al., 2011; Alimi et al., 2013), além de trabalhos voltados para identificação de QTLs associados à resistência a doenças (Lefebvre et al., 2003; Thabuis et al., 2003; Voorrips et al., 2010; Sugita et al., 2006; Minamiyama et al., 2007; Mimura et al., 2009; Kim et al., 2011). Um número limitado de pesquisas envolve a identificação de QTLs associados à parte vegetativa (folhas, entrenós do caule e pecíolos) (Barchi et al., 2009; Mimura et al., 2010).

Lee et al., (2011) localizaram um QTL relacionado ao comprimento do fruto de pimenta, sendo alocado no grupo de ligação 3, tendo explicado 27% da variação fenotípica do caráter. Lu et al., (2012) identificaram 23 QTLs de efeito maior associadas a 12 características morfológicas, para tanto foi utilizado um mapa denso constituído por 458 marcadores moleculares, sendo esse mapa de ligação resultante da integração de vários mapas publicados em outros trabalhos.

Alimi et al., (2013) avaliaram 16 características fisiológicas na espécie *C. annuum* em quatro ambientes e identificaram 24 QTLs. O número médio de QTLs por característica foi dois, variando entre zero e seis. O total explicado da variância fenotípica das características variou entre 9 e 61%. No mapa de alta densidade construído por Yarnes et al., (2013) foram estimados 96 QTLs para 38 caracteres agronômicos, incluindo 12 QTLs associados com os níveis de capsaicinoides na população de *Capsicum* em estudo.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. População de Mapeamento

A partir do cruzamento UENF 1616 (P_1) x UENF 1732 (P_2), foram avaliadas as gerações P_1 (genitor feminino), P_2 (genitor masculino), F_1 (primeira geração híbrida) e F_2 (primeira geração de autofecundação do F_1) (Figura 1) (Bento, 2012). Foi utilizada uma população de mapeamento constituída por 203 indivíduos F_2 .

Os acessos UENF 1616 (P_1) e UENF 1732 (P_2) são provenientes do município de Campos dos Goytacazes. O primeiro é suscetível ao PepYMV, e possui frutos pungentes de cor alaranjada no estágio intermediário e de cor vermelha quando maduros. O genitor UENF 1732 é caracterizado como muito pungente, com fruto de coloração vermelha quando maduro, de aroma pouco acentuado e resistente ao PepYMV (Bento et al., 2009).

Plantas dessas gerações (P_1 ; P_2 ; F_1 e F_2) foram cultivadas por Bento (2012) (Figura 2) e amostras de folhas de todos os indivíduos foram coletadas, identificadas e armazenadas em ultrafreezer para a realização desse experimento. As amostras foram obtidas a partir de plantas cultivadas nas condições de campo, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em novembro de 2010.

Bento (2012) fez a fenotipagem desta população, sendo avaliadas 13 características quantitativas e três qualitativas. Os caracteres quantitativos foram: altura da planta (ALP); diâmetro da copa (DIC); número de dias para a floração (DFL); número de dias para a frutificação (DFR); número de frutos por planta (NFP); massa média de fruto (MMF); comprimento do fruto (CMF); diâmetro do fruto (DMF); espessura da polpa do fruto (EPF); teor de sólidos solúveis (TSS); massa seca do fruto (MSF); teor de massa seca do fruto (TMS) e número de sementes (NS). As características qualitativas avaliadas compreendem: cor do fruto no estágio imaturo (CFI); cor do fruto no estágio maduro (CFM) e forma do fruto (FFR).

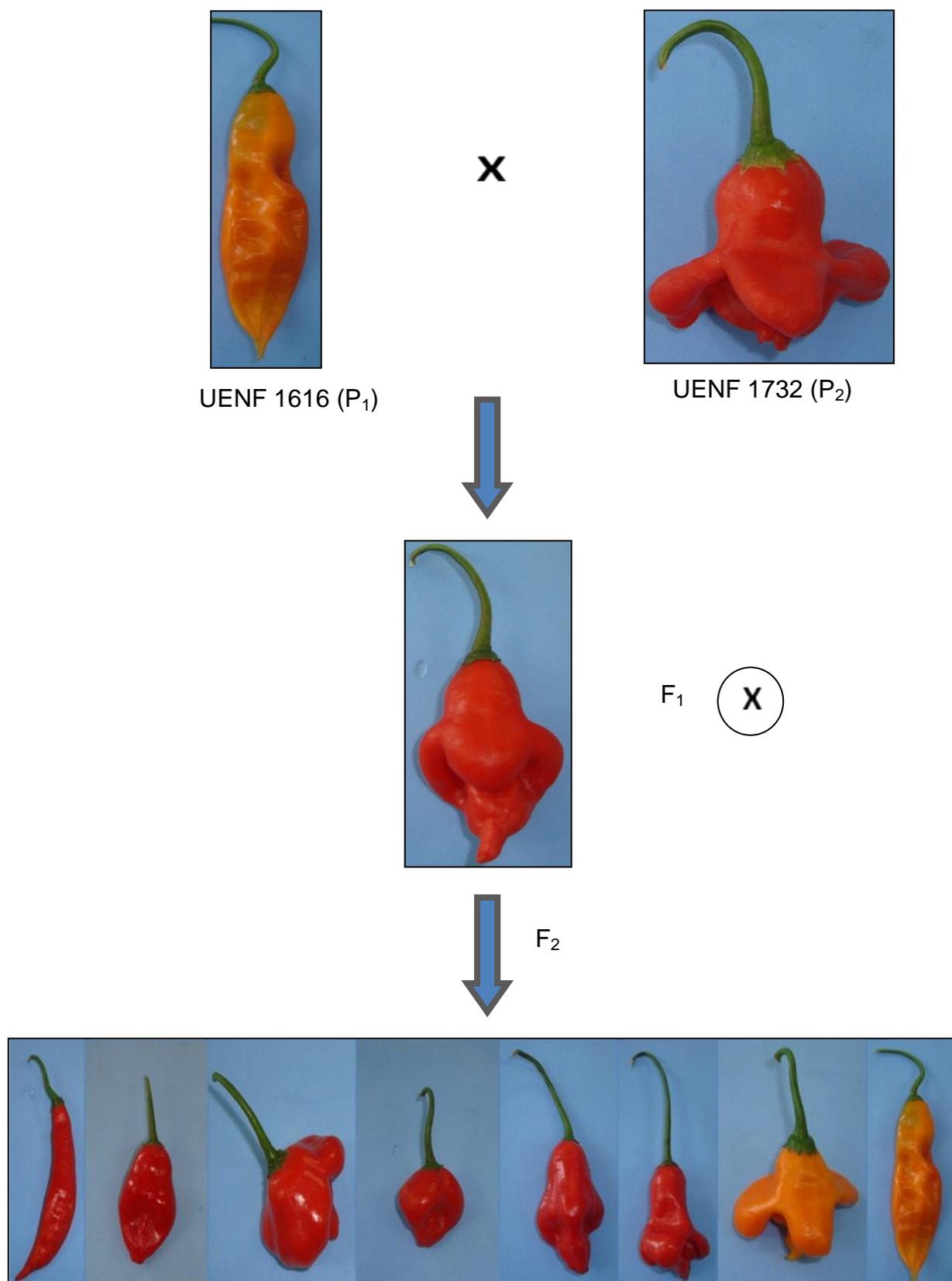


Figura 1. Frutos de genitores e progênie F₁ e amostra da variabilidade em frutos da geração F₂ do cruzamento entre UENF 1616 x UENF 1732 utilizada para constituir a população de mapeamento genético de *C. baccatum* var. *pendulum*.



Figura 2. Condução do experimento para obtenção das folhas de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* utilizadas para a construção do mapa genético, na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

As análises moleculares foram realizadas de janeiro de 2011 a julho de 2013, no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV)/ Sala 222, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da UENF, conforme as etapas descritas a seguir.

3.1.3.2. Extração e quantificação do DNA

Cerca de 300 mg de tecido foliar macerado foram transferidos para tubos de 1,5 mL e imersos em N₂ líquido para a extração de DNA de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com modificações, descritas a seguir.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras 1 mL do tampão de extração pré-aquecido contendo 2 % CTAB, 1,4 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1 % PVP e 0,2 % β- mercaptoetanol. Em seguida, foram adicionados 5 μL de protease K (10 mg mL⁻¹) em cada uma das amostras.

Este material foi incubado a 37°C por 30 minutos e agitado suavemente a cada 10 minutos, e posteriormente incubado a 65°C por mais 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 minutos. O sobrenadante (cerca de 800 µl) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e adicionado igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), para se efetuar a desproteíntização. Foram realizadas suaves inversões do material durante aproximadamente 10 minutos até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 8000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Em seguida, 200 µL de NaCl a 2,0 mol L⁻¹ contendo 4 % de PEG foram adicionados, para remoção completa de proteínas e recuperação do DNA, sendo as amostras incubadas por 15 minutos a 4°C. O material foi centrifugado a 8000 g por 10 minutos. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de dois terços (400 µl) do volume de isopropanol gelado e incubados por 20 minutos a -70 °C. O precipitado foi sedimentado por centrifugação a 8000 g por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado, e o precipitado, lavado duas vezes com 200 µl etanol a 75 % com acetato de amônio, para retirada de sal presente (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 8000 g durante 5 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais até que o etanol estivesse removido. Em seguida, o material foi ressuspendido em 100 µl de solução TE (Tris-EDTA – 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8,0) com RNase em uma concentração final de 10 µg mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Logo após, o material foi armazenado a -20 °C.

A quantificação do DNA foi determinada em espectrofotômetro. A qualidade foi avaliada pelas razões A_{260}/A_{230nm} e A_{260}/A_{280nm} e em gel de agarose 1%.

3.1.3.3. Marcadores Microssatélites

Os marcadores microssatélites foram selecionados com base em informações disponíveis na literatura para mapeamento de *C. annuum* (Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007) e em bancos de dados (<http://solgenomics.net>). Foram testados 152 pares de iniciadores microssatélites.

Além desses, 30 microssatélites desenhados para tomate (Geethanjali et al., 2010) disponíveis no laboratório foram testados para averiguar a transferência. Para detecção do polimorfismo foram escolhidos seis genótipos para o teste: P₁, P₂, F₁ e três indivíduos da F₂.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 21 µL, contendo os seguintes reagentes: 5 ng de DNA genômico, 0,75 unidade de Taq DNA polimerase, tampão 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,3 *Invitrogen*), MgCl₂ 2,4 mM, dNTP (0,1 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos) e 0,5 µM de cada iniciador. Foram aplicadas 2 µL de DNA, e posteriormente, adicionados 11 µL do mix descrito anteriormente. Para coloração, foram adicionados 8 µL da mistura *gel red* e *blue juice* na concentração 1:1.

As reações de amplificação (termociclador modelo *Veriti* da *Applied Biosystems*) foram conduzidas da seguinte forma: 1 min a 94°C para desnaturação inicial, seguindo-se os 35 ciclos, cada um consistiu de 94°C por 1 min, 55-63°C por 1 min (dependendo do iniciador utilizado), 72°C por 3 min e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram então separados em gel de agarose de alta resolução Metaphor 4% e submetidos à luz ultravioleta para visualização (Fotodocumentador *Minibis Pro – Bio-imaging System*). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Os marcadores microssatélites considerados polimórficos entre os genitores de *C. baccatum* e que obedeceram à segregação esperada para uma população F₂ foram selecionados. Os dados de segregação foram anotados em uma planilha e usados na construção dos mapas genéticos. Os códigos utilizados para a construção do arquivo mapa com marcadores de herança codominante estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1. Códigos utilizados para mapear uma população F_2^* , com uso de marcadores codominantes.

Código	Descrição
a	homozigoto para o primeiro parental
b	homozigoto para o segundo parental
h	heterozigoto (igual ao F_1)
.	genótipo desconhecido

* códigos do programa JoinMap v 4.0 (Van Ooijen, 2006), para uma população caracterizada como F_2 , proveniente da autofecundação de F_1 , obtido pelo cruzamento entre dois genitores diploides e homozigotos.

3.1.3.4. Marcadores ISSR e RAPD

Os iniciadores ISSR utilizados neste trabalho foram propostos para pimenta por Kumar et al., (2001), Refaat et al., (2007) e Yao et al., (2008). Os iniciadores RAPD avaliados foram dos respectivos *kits* OPAA, OPAB, OPAC, OPB, OPE, OPF, OPK, OPN e OPW, da *Operon Technologies* (Alameda, CA, USA). Quanto ao número de nucleotídeos, os iniciadores ISSR usados foram constituídos por 11 a 20, e os iniciadores RAPD, por dez nucleotídeos.

Para a detecção do polimorfismo entre os parentais, foram testados 61 iniciadores ISSR e 24 RAPD. Para tanto, previamente foram escolhidos seis genótipos para teste, a saber: P_1 , P_2 , F_1 e três indivíduos da F_2 .

As reações de amplificação foram conduzidas da mesma forma para os marcadores ISSR e RAPD. O volume final foi de 21 μ L, contendo os seguintes reagentes: 5 ng de DNA genômico, 0,75 unidade de Taq DNA polimerase, tampão 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8,3 *Invitrogen*), $MgCl_2$ 2,4 mM, dNTP (0,1 mM de cada um dos desoxiribonucleotídeos) e 1,0 μ M de cada iniciador. Foram aplicados 2 μ L de DNA, e, posteriormente, adicionados 11 μ L do mix descrito anteriormente.

As reações de PCR (termociclador modelo *Veriti* da *Applied Biosystems*) foram conduzidas da seguinte forma: 1 min a 94°C para desnaturação inicial, seguindo-se os 40 ciclos, cada um consistiu de 94°C por 1 min, temperatura de anelamento do iniciador por 1 min (40 a 55°C para iniciadores do tipo ISSR e

37°C para iniciadores do tipo RAPD), 72°C por 3 min e uma extensão final a 72°C por 7 min. As condições de amplificação foram otimizadas para cada iniciador ISSR, detectando-se a temperatura mais adequada para amplificação.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corados com *gel red/blue juice* (1:1) e fotografados sob luz ultravioleta. (Fotodocumentador *Minibis Pro – Bio-imaging System*). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Marcadores ISSR e RAPD considerados polimórficos entre os genitores e a população de *C.baccatum* foram selecionados e utilizados na população para obtenção dos dados. Para genotipagem da população, apenas géis com nítidos perfis de bandas foram considerados. Marcas de difícil interpretação foram tomadas como dados perdidos para evitar erros de genotipagem.

Inicialmente a análise genética foi baseada na contagem da presença (1) ou ausência (0) do alelo (banda) por loco nos dois genitores, híbrido e nos 203 indivíduos constituintes da população filial. Quando houve falha do genótipo ou não foi possível detectar se a banda estava presente ou não, foi computado como número 2. Em seguida, foram convertidos para códigos utilizados pelo programa JoinMap. Os códigos para a construção do arquivo mapa com marcadores de herança dominante estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Códigos utilizados para mapear uma população F_2^* , com uso de marcadores dominantes.

Código	Descrição
a	homozigoto para o primeiro parental
b	homozigoto para o segundo parental
c	genótipo diferente do primeiro parental (o alelo <i>b</i> é dominante)
d	genótipo diferente do segundo parental (o alelo <i>a</i> é dominante)
.	genótipo desconhecido

* códigos do programa JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2006), para uma população caracterizada como F_2 , proveniente da autofecundação de F_1 , obtido pelo cruzamento entre dois genitores diploides e homozigotos.

3.1.3.5. Mapeamento Genético

Para a construção do mapa de ligação integrado, foi utilizado o programa JoinMap, versão 4.0 (Van Ooijen, 2006). Este programa permite análise conjunta de marcadores segregando nas proporções 1:1, 3:1, 1:2:1 e 1:1:1:1 e possibilita construir mapas integrados. Para a análise, foram excluídos os parentais e F₁. Os grupos de ligação foram formados e ordenados utilizando um LOD Score mínimo de 3,0 e máximo de 40% de recombinação.

As frequências de recombinação foram convertidas em distância genética (centiMorgans) através da função de Kosambi (1944). O teste qui-quadrado [χ^2 ($p < 0,05$, GL=1)] foi utilizado para testar as hipóteses de segregação mendeliana 1:2:1 para marcadores SSR e 3:1 para marcadores ISSR e RAPD. Os marcadores que não tiveram distorções da proporção esperada foram utilizados inicialmente para construção do mapa. Após análise dos marcadores, foram adicionadas marcas ISSR e RAPD que não seguiram a segregação mendeliana.

Para facilitar a apresentação dos dados, principalmente nos gráficos e tabelas, os marcadores foram numerados de 1 a 374 e referidos apenas pelo número. Os marcadores RAPD foram numerados de 2 a 67, marcadores ISSR de 70 a 226, e marcadores microssatélites, de 228 a 374 (nomenclatura CAMS utilizada por Minamyama et al., 2006).

3.1.3.6. Mapeamento de QTLs

O conjunto de dados morfoagronômicos para 13 caracteres quantitativos e três qualitativos obtidos no trabalho de Bento (2012) foi utilizado para identificar regiões com possíveis QTLs.

Para a análise dos QTLs foram utilizados os modelos descritos por Broman & Sen (2009), em que cada genótipo dos locos macadores é ajustado como efeitos de covariáveis frente às variáveis fenotípicas mensuradas. Os métodos de mapeamentos por intervalo padrão permitiram verificar a posição de possíveis QTLs ao longo do mapa de ligação estimado pela seguinte premissa:

$$P_{ij} = \Pr(g_i = j / M_i)$$

Em que: P_{ij} = Probabilidade de existência de QTL; g_i = genótipo possível do QTL; j = variável fenotípica mensurada; e M_i = genótipo do loco marcador.

Para as variáveis quantitativas utilizou-se os modelos de mapeamento por intervalo padrão estimados via algoritmos de máxima probabilidade (EM) de existência dos QTLs por processos iterativos, usando-se o seguinte estimador:

$$L(\mu\sigma) = \prod_i \sum_j P_{ij} \Phi(y_i; \mu_j, \sigma^2)$$

Em que: Y_i é o valor fenotípico; $\hat{\mu}_j^0$, a média inicial das variáveis fenotípicas; e $\sigma^{2(0)}$, a variância inicial das variáveis.

Os LOD Score foram obtidos pelo estimador:

$$LOD = \log_{10} \left(\frac{\prod_i \sum_j P_{ij} \Phi(y_i; \hat{\mu}_i, \hat{\sigma}^2)}{\prod_i \Phi(y_i; \hat{\mu}_0, \hat{\sigma}_0^2)} \right)$$

Para as variáveis multicategóricas utilizaram-se métodos de análise de QTL baseados em modelos não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para verificar as possíveis posições dos QTLs.

As probabilidades dos genótipos dos QTLs foram verificadas com base em dados disponíveis dos genótipos de marcadores. Na estatística de teste de Kruskal-Wallis, considera-se a soma das classes dentro de cada grupo de marcadores, e neste aspecto são calculadas as probabilidades de genótipos de QTLs pertencerem a classes de genótipos de marcadores (conforme descrito anteriormente). Após essa etapa, promove-se o ranqueamento destes grupos com suas respectivas somas de rank, em que posteriormente calcula-se a estatística H, pelo estimador:

$$H = \sum_i \left(\frac{n - \sum_j P_{ij}}{n} \right) \left[\frac{(S_j - \mu_{oj})^2}{V_{oj}} \right]$$

Onde: Onde: μ_{oj} e a média e V_{oj} é a variância de S_j em condições de hipótese de nulidade para a presença do QTL ligado ao loco marcador.

Com a estatística H obtém-se após as estimativas de Lod Score a presença dos QTL's, sendo esta uma estatística não paramétrica, que segue aproximadamente a distribuição de X^2 , que pode ser convertida para a estatística $LOD = H/(2\ln 10)$

Adotou-se como critério de evidência de possível QTLs picos de LOD Score com valores superiores a 1,5. Em seguida, foi estimada a porcentagem da variância explicada pelos QTL por meio da função "makeqtl" do pacote R-QTL.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Mapa genético para população F_2 de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

O mapa de ligação foi constituído por 183 marcadores, sendo 42 (22,95%) microssatélites, 85 (46,45%) ISSR e 56 (30,60%) RAPD. O mapa gerado neste trabalho possui 12 grupos de ligação maiores (321,8–110,3 cM) e quatro menores (80,8–54,2 cM) (Figura 3), e os grupos de ligação tinham de 5 a 23 marcadores, com média de 159,2 cM em um mapa com cobertura total de 2547,5 cM (Tabela 3).

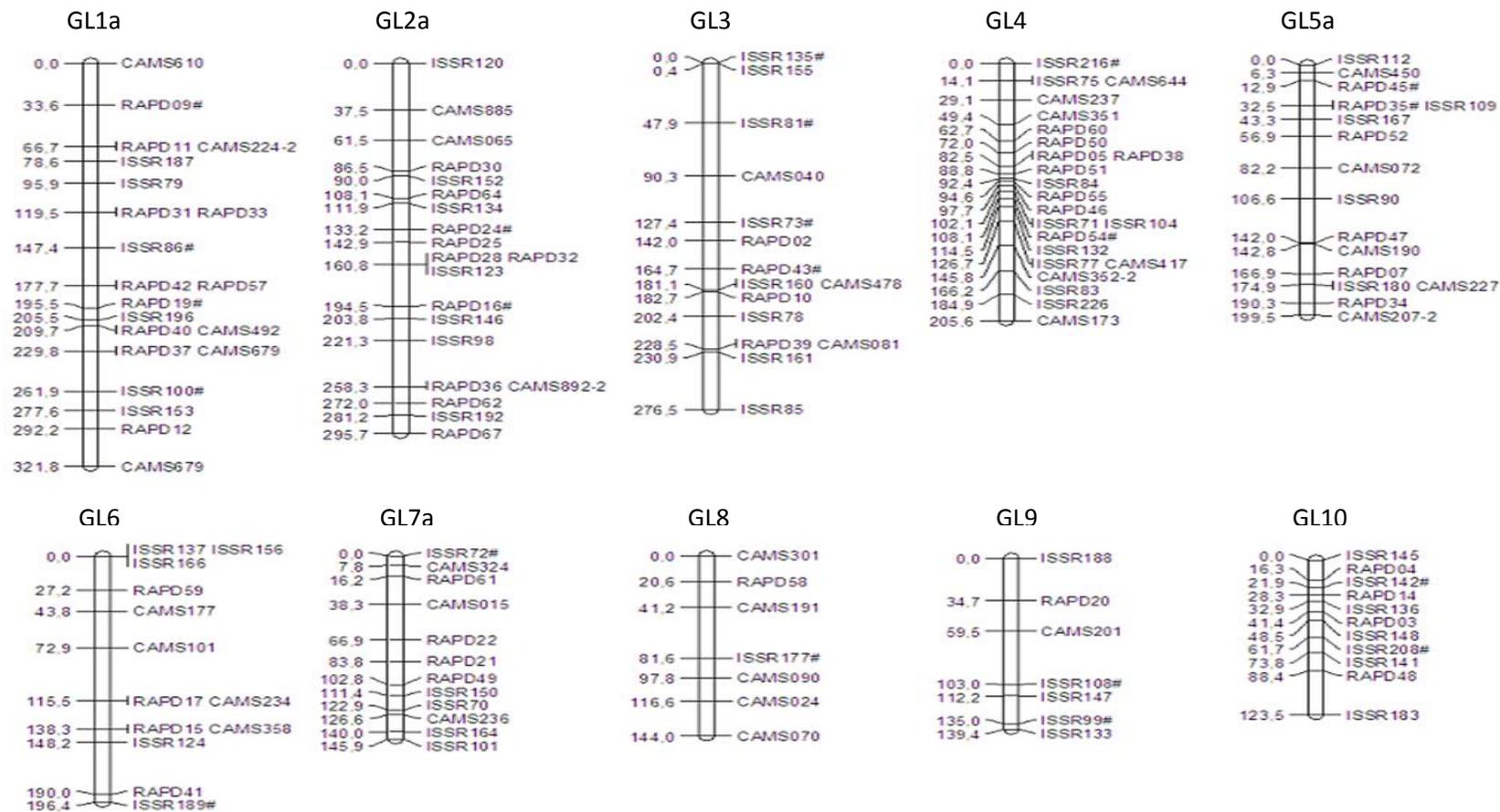


Figura 3. Mapa de ligação de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* construído com LOD Score de 3,0, com auxílio do programa JoinMap versão 4.0 (Van Ooijen, 2006), baseado em 183 marcadores (42 SSR, 85 ISSR e 56 RAPD) distribuídos em 12 grupos de ligação maiores e quatro menores resultantes da subdivisão. Os marcadores são indicados ao lado direito de cada grupo e a distância genética em cM ao lado esquerdo. Marcadores que mostraram distorção de segregação mendeliana são indicados com # ($P < 0,05$).

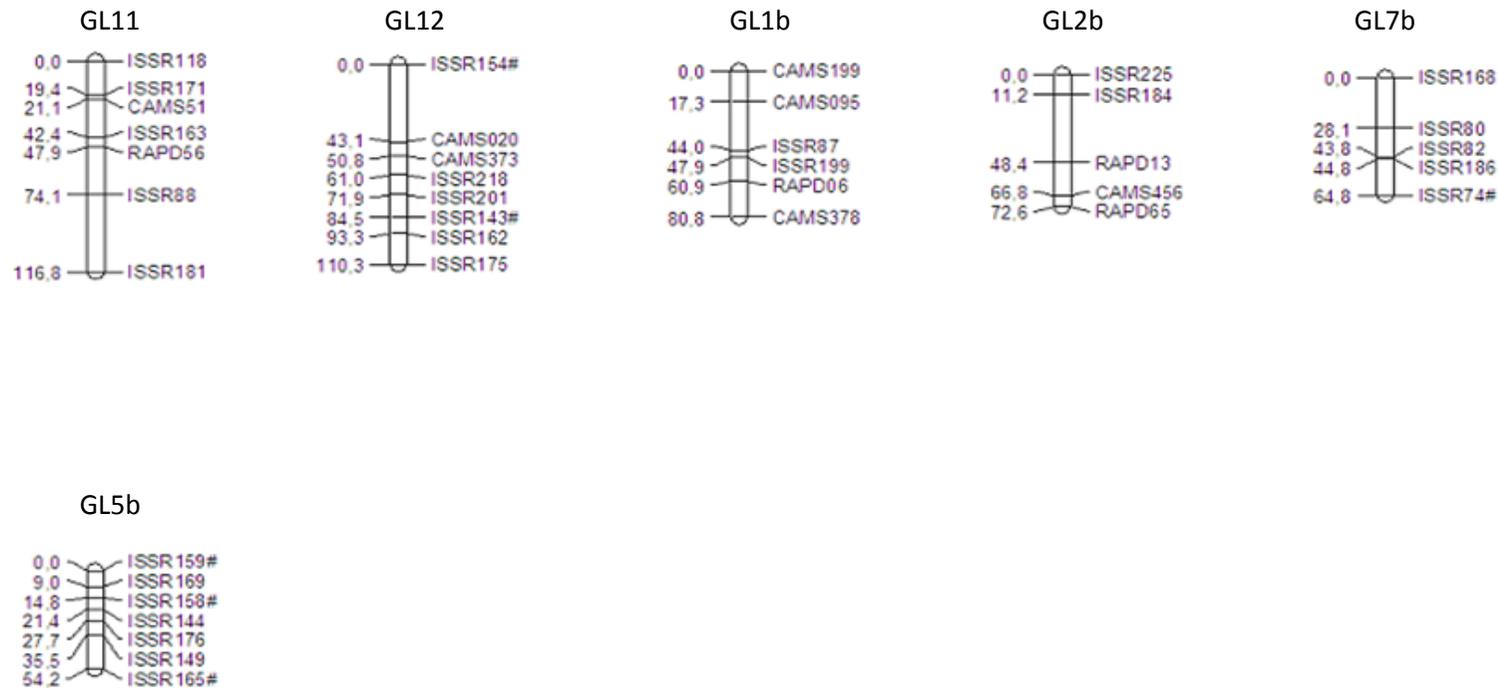


Figura 3. Mapa de ligação de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* construído com LOD Score de 3,0, com auxílio do programa JoinMap versão 4.0 (Van Ooijen, 2006), baseado em 183 marcadores (42 SSR, 85 ISSR e 56 RAPD) distribuídos em 12 grupos de ligação maiores e quatro menores resultantes da subdivisão. Os marcadores são indicados ao lado direito de cada grupo e a distância genética em cM ao lado esquerdo. Marcadores que mostraram distorção de segregação mendeliana são indicados com # ($P < 0,05$).

Tabela 3. Número, tipo de marcadores, comprimento de cada grupo de ligação (cM) e distância média entre marcas (cM) do mapa de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Grupo de ligação*	Número e tipo de marcas	Comprimento (cM)	Distância média entre marcas (cM)
GL1a	21 (10 RAPD; 6 ISSR; 5 SSR)	321,8	15,32
GL1b	6 (1 RAPD; 2 ISSR; 3 SSR)	80,8	13,47
GL2a	20 (10 RAPD; 7 ISSR; 3 SSR)	295,7	14,78
GL2b	5 (2 RAPD; 2 ISSR; 1 SSR)	72,6	14,52
GL3	15 (4 RAPD; 8 ISSR; 3 SSR)	276,5	18,43
GL4	23 (8 RAPD; 9 ISSR; 6 SSR)	205,6	8,94
GL5a	16 (6 RAPD; 5 ISSR; 5 SSR)	199,5	12,47
GL5b	7 (ISSR)	54,2	7,74
GL6	13 (4 RAPD; 5 ISSR; 4 SSR)	196,4	15,11
GL7a	12 (4 RAPD; 5 ISSR; 3 SSR)	145,9	12,16
GL7b	5 (ISSR)	64,8	12,96
GL8	7 (1 RAPD; 1 ISSR; 5 SSR)	144,0	20,57
GL9	7 (1 RAPD; 5 ISSR; 1 SSR)	139,4	19,91
GL10	11 (4 RAPD; 7 ISSR)	123,5	11,23
GL11	7 (1 RAPD; 5 ISSR; 1 SSR)	116,8	16,68
GL12	8 (6 ISSR; 2 SSR)	110,3	13,79
Marcadores mapeados	183	2547,5	14,25
Marcadores não mapeados	191		
Total	374		

* Os grupos de ligação foram numerados sequencialmente do maior para o menor.

Tanksley et al., (1988) desenvolveram um mapa genético de referência para *C. annuum* que continha cerca de 85 marcas RAPD, obtido a partir de uma população constituída por 61 indivíduos. Uma comparação do presente mapa genético para *C. baccatum* com outros mapas genéticos de referência está disponível na Tabela 4.

Quanto a outras espécies da família Solanaceae, o primeiro mapa genético descrito para tomate foi obtido por Bernatzky & Tanksley (1986), tendo sido mapeados 112 marcadores do tipo isoenzimas de uma população de mapeamento constituída por 46 indivíduos, cobrindo uma extensão de 760 cM do genoma. Gebhardt et al., (1989) construíram um mapa de referência para *Solanum tuberosum*, constituído por 141 marcadores do tipo RFLP, que cobriram uma região de 690 cM do genoma, tendo utilizado uma população formada por apenas 38 indivíduos. Para *Solanum melongena*, foi desenvolvido um mapa de referência proveniente de uma população de 168 indivíduos, tendo sido mapeados 181 marcadores do tipo RAPD e AFLP e coberta uma região de 779,2 cM do genoma (Nunone et al., 2001).

Pesquisa semelhante a esta foi realizada por Priyamedha et al., (2012), que construíram o primeiro mapa genético para a espécie *Brassica carinata*. Para o mapeamento foi utilizada uma população F_2 composta por 150 indivíduos, sendo mapeados 69 marcadores (23 RAPD, 29 ISSR e 17 SSR) utilizando valor de LOD Score 3,0 e obtendo-se uma cobertura de 2166 cM do genoma. Os tipos de marcadores utilizados por esses autores e no presente trabalho foram os mesmos, entretanto o número de marcadores mapeados para a espécie *C. baccatum* foi bastante superior, o que revela uma maior saturação para o mapa construído. Além disso, foi utilizada uma população de maior tamanho (203 indivíduos), o que confere maior confiabilidade aos dados.

Kole et al., (2012) construíram o primeiro mapa genético para melão amargo (*Momordica charantia*) a partir de uma população F_2 de mapeamento formada por 146 indivíduos, baseado exclusivamente em 108 marcadores AFLP, cobrindo uma distância de 3060,7 cM do genoma. Lanteri et al., (2006) desenvolveram o primeiro mapa genético para alcachofra (*Cynara cardunculus*), no qual foi utilizada uma população formada por 94 indivíduos da F_1 , baseada em 59 iniciadores de diferentes tipos (SSR, AFLP e SSAP) e coberta uma extensão de 2569,9 cM do genoma.

Tabela 4. Comparação de mapas genéticos de referência obtidos em diferentes estudos com o mapa para *C. baccatum* obtido no presente trabalho.

Espécie	Autoria Mapa	Tamanho da população	Número de marcadores	Cobertura do genoma (cM)	Tipo de Marcador
<i>Solanum lycopersicum</i> X <i>S. pennellii</i>	Bernatzky & Tanksley (1986)	46	112	760	Isoenzimas
<i>Capsicum annuum</i> X <i>C. chinense</i>	Tanksley et al., (1988)	46	85	-	RAPD
<i>Solanum tuberosum</i>	Gebhardt et al., (1989)	38	141	690	RFLP
<i>Capsicum annuum</i>	Lefebvre et al., (1995)	61	85	820	RAPD e RFLP
<i>Solanum melongena</i>	Nunone et al., (2001)	168	181	779,2	RAPD e AFLP
<i>Cynara cardunculus</i>	Lanteri et al., (2006)	94	59	2569,9	SSR, AFLP e SSAP
<i>Brassica carinata</i>	Priyamedha et al., (2012)	150	69	2166	RAPD, ISSR e SSR
<i>Momordica charantia</i>	Kole et al., (2012)	146	108	3060,7	AFLP
<i>Capsicum baccatum</i>	Moulin (2013) – este trabalho	203	183	2547,5	RAPD, ISSR e SSR

A distância entre os marcadores nos grupos de ligação variou de 0 (isto é, dois marcadores que co-segregam completamente ligados) a 43,5 cM, com uma distância média de 14,25 cM entre marcas. Distâncias menores indicam que o mapa tem maior nível de saturação e possibilitam uma melhor detecção de QTLs. Resultados inferiores foram obtidos por Priyamedha et al., (2012), que obtiveram uma distância média de 31,39 cM entre as marcas para o mapa genético construído para a espécie *Brassica carinata*

Foram obtidas uma média de 2,61 marcas úteis para o mapeamento por iniciador dominante (ISSR+RAPD), e uma marca útil por iniciador microssatélite, já que estes possibilitam o mapeamento de apenas um loco para população F₂ de espécie diploide.

O tamanho do genoma de *Capsicum* é estimado entre 3,300 cM e 3,600 cM (Moscone et al., 2003; Hill et al., 2013). O mapa de ligação construído neste trabalho com o auxílio do programa JoinMap cobriu de 77,2% a 70,76% do mapa de *C. baccatum* var. *pendulum*.

Como não existem relatos de mapas genéticos para *C. baccatum*, foram utilizados, na maioria das vezes, como fonte de comparação para os dados mostrados abaixo mapas publicados para a espécie correlacionada *C. annuum*.

A cobertura total do genoma obtido para *C. baccatum* var. *pendulum* mostrou ser maior que as coberturas já disponibilizados para *C. annuum*. Lefebvre et al. (1995) desenvolveram o primeiro mapa integrado para *C. annuum* baseado em 85 marcadores RAPD dispostos em 14 grupos de ligação, cobrindo cerca de 820 cM do genoma, perfazendo uma porcentagem de 24,85% a 22,78% de cobertura. Posteriormente, outros trabalhos de mapeamento da espécie *C. annuum* foram desenvolvidos com a finalidade de saturar o mapa (Lefebvre et al., 2002; Paran et al., 2004; Sugita et al., 2005; Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007; Mimura et al., 2012).

Kang et al., (2001) publicaram um mapa genético resultante de uma população obtida por cruzamento interespecífico (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) com cobertura de 1320 cM do genoma, contribuindo com uma taxa de 40% a 36,7% de cobertura. Barchi et al., (2007) obtiveram um mapa para *C. annuum* com um comprimento total de 1857 cM, representando de 56,27% a 51,58% da extensão coberta do genoma. No último mapa de ligação publicado para a espécie (Sugita et al., 2013), que se baseou em 265 marcadores SSR

distribuídos em doze grupos de ligação, foi coberta a maior distância genética total, correspondendo a 2028 cM, ou seja, 61,45% a 56,33% do comprimento do genoma.

Na construção do mapa obtido no presente estudo, primeiramente foram mapeados os marcadores que seguiram a proporção de segregação de 1:2:1 para os marcadores microssatélites e 3:1 para os marcadores ISSR e RAPD. Desvios da segregação esperada podem ser atribuídos a uma série de fatores, tais como rearranjos estruturais dos cromossomos, alelos recessivos deletérios, seleção gamética, seleção pré ou pós-zigótica de combinações alélicas, entre outros (Priyamedha et al., 2012). Considerando os marcadores ISSR mapeados, 22,35% se mostraram distorcidos ($p > 0,05$), enquanto 14,28% dos marcadores RAPD mapeados foram distorcidos. Considerando o mapa total, 27 marcadores (14,75%) mostraram-se distorcidos (Tabela 5).

Como observado neste estudo, mapas desenvolvidos para *C. annuum* também possuem marcadores com distorções de segregação. Lee et al., (2011) constataram uma distorção média de 36,5% da segregação mendeliana para os marcadores testados. Minamiyama et al., (2006) observaram que 14,28% dos marcadores mapeados tinham distorção da segregação. Porcentagem semelhante foi encontrado por Barchi et al., (2007) que ao desenvolverem um mapa integrado, constataram que 14,00% dos marcadores não obedeceram a segregação.

Tabela 5. Características dos marcadores moleculares selecionados no presente trabalho para integrar o mapa de ligação de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Marcador	Número total de iniciadores avaliados	Número de iniciadores polimórficos	Número total de marcas	Número total de marcas mapeadas	Número total de marcas não mapeadas	Número de marcadores com distorção mendeliana	Número de marcas por iniciador
SSR	152	62	62	42	20	-	1
ISSR	61	35	201	85	116	19	2,43
RAPD	24	19	111	56	55	8	2,95
Total	237	116	374	183	191	27	

Altos níveis de desvios de segregação foram encontrados por Livingstone et al., (1999), no qual um quantitativo de 337 (50,7%) marcadores não seguiram a proporção esperada. Foram também detectadas distorção da segregação nos mapas construídos por Lefebvre et al., (2002) e Sugita et al., (2005) em proporções menores, de 7% e 10%, respectivamente.

No mapa desenvolvido, 191 locos não foram mapeados, o que indica que mais da metade (51,07%) dos marcadores não foram ligados. Esses marcadores não alocados evidenciam que o nível de saturação do mapa obtido necessita ser aumentado. Ao mesmo tempo, os marcadores disponíveis e não ligados facilitam a saturação do mapa com a adição de novas marcas obtidas em outros estudos.

Segundo Carlier (2006) à medida que aumenta a cobertura de um mapa genético, o número de grupos de ligação aproxima-se do número haplóide de cromossomos da espécie e o número de marcadores não ligados aproxima-se de zero.

Resultados semelhantes foram obtidos por Barchi et al., (2007), nos quais cerca de 50% dos marcadores foram considerados não ligados pelo teste ao nível de 1% efetuado no programa Mapmaker. Estudos desenvolvidos por Lee et al., (2011) obtiveram resultados superiores aos obtidos neste trabalho, apenas 31,5% dos marcadores não foram mapeados. Contudo, esses autores trabalharam com um cruzamento interespecífico (*Capsicum annum X C. chinense*), o que amplia o polimorfismo gerado, bem como o número de grupos de ligação, possibilitando a alocação da maioria dos marcadores.

Neste estudo, alguns marcadores foram removidos dos grupos de ligação que foram alocados inicialmente, devido aos baixos valores de LOD Score e altas estimativas de fração de recombinação, resultando em melhores ordenações das marcas remanescentes. Esse procedimento é comum para otimização das marcas obtidas. A remoção ocorreu nos grupos de ligação 1, 2, 4 e 7. Foram removidas duas marcas nos grupos 1 e 4, e apenas uma marca nos grupos 2 e 7, possibilitando reduzir o tamanho em cM do grupo de ligação e gaps que eventualmente ocorreram. Portanto, como resultado da análise seis marcas foram removidas.

Foram realizadas subdivisão dos grupos de ligação 1, 2, 5 e 7, por conterem *gaps*, estabelecidos por marcadores que foram mapeados, mas estavam a mais de 50 cM. Para tanto, foi adicionada uma letra ao número do

grupo original. Os grupos 1b, 2b, 5b e 7b foram resultantes dessa subdivisão, permitindo que 6, 5, 7 e 5 marcas, respectivamente, pudessem ser mantidas nos grupos de ligação. A subdivisão indica que as marcas estão dentro de um mesmo grupo, porém, até o presente momento, ainda não há marcas suficientes para agrupá-los. De acordo com Garcia et al., (2006), a existência de *gaps* em grupos de ligação é esperada para espécies de genoma maiores, mesmo que essas já tenham um bom número de mapas desenvolvidos.

Neste contexto, em mapas construídos para *Capsicum* com diferentes tipos de marcadores e com diferentes tipos de populações de mapeamento, são bastante comuns a existência de *gaps*, devido ao tamanho do genoma. Kang et al., (2001) construíram um mapa genético com 11 grupos de ligação maiores (206–60,3 cM) e cinco menores (32,6–10,3 cM). Resultados similares foram obtidos por Sugita et al., (2005), cujo mapa genético elaborado também foi constituído de 11 grupos de ligação maiores (118,5–56,7 cM) e cinco menores (33,1–1,8 cM). Segundo Paran et al., (2004) pode ser obtido um número de grupos de ligação diferente do número haplóide da espécie indicando que uma maior saturação é necessária para obter uma cobertura completa do genoma de pimenta. Entretanto, devem ser mantidos todos os marcadores encontrados com distância menor que 50 cM, por serem são fundamentais para maior saturação do mapa com introdução de novas marcas.

Ainda quanto ao número de grupos de ligação, mapas genéticos desenvolvidos por Mimura et al., (2012) e por Sugita et al., (2013) revelaram 12 grupos, descrevendo perfeitamente o número haplóide da espécie *C. annuum*, enquanto Alimi et al., (2013) construíram um mapa para a mesma espécie com 17 grupos de ligação.

Constatou-se maior concentração de alguns tipos de marcadores em determinados grupos de ligação. A aglomeração de marcadores em áreas específicas do genoma é um fenômeno comum no desenvolvimento de mapas genéticos e já foi descrita anteriormente em várias espécies e para diferentes tipos de marcadores (Qi et al., 2004). Para explicar essa concentração foram apontados fatores biológicos como a baixa taxa de recombinação nas regiões dos centrômeros e nos telômeros, a distribuição descontínua dos níveis de polimorfismo e a variação do número de cópias de determinadas sequências ao longo do genoma (Tanksley et al., 1992; Miklas et al., 2001; Qi et al., 2004).

A partir do mapa de referência construído para *C. baccatum* var. *pendulum*, pode ser efetuada a inclusão de novos marcadores, possibilitando a maior e melhor cobertura do genoma e também melhor definição dos grupos de ligação. O mapa construído possibilita a inclusão da espécie *C. baccatum* em estudos de mapeamento comparativo, bem como pode ser utilizado como ponto de partida para a seleção de características de interesse ao melhoramento de plantas. Uma discussão mais detalhada a respeito de cada tipo de marcador utilizado no mapeamento está a seguir.

3.1.4.2. Marcadores ISSR e RAPD

Por intermédio da técnica ISSR (Figura 4) dos 61 iniciadores testados, 26 não detectaram polimorfismo na progênie e 35 demonstraram polimorfismo nítido na população em estudo. Foi obtido um total de 85 marcas e o número médio de marcadores mapeados por iniciador foi de 2,43. Dentre os 35 iniciadores que foram utilizados, houve amplificação de um total de 201 locos, dos quais foram mapeados 85. Uma descrição mais detalhada dos marcadores ISSR, incluindo numeração no mapa de ligação, sequência dos marcadores utilizados temperatura de anelamento otimizada, número de locos amplificados, número de locos polimórficos e grupo de ligação está disponível na Tabela 6.

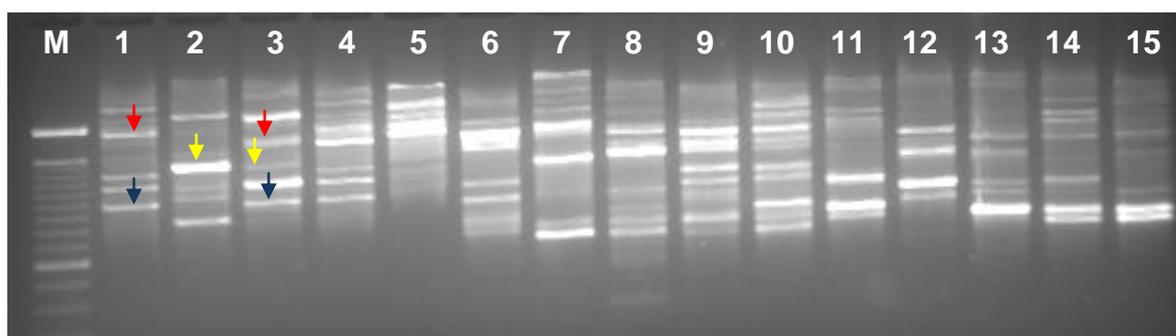


Figura 4- Gel agarose 2%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando marcador ISSR de sequência $(CT)_8GC$. (1) P₁, (2) P₂, (3) F₁, e (4-15) F₂. M= marcador de peso molecular. As setas indicam o polimorfismo entre os genitores e o F₁.

Tabela 6. Numeração no mapa de ligação, sequência dos marcadores ISSR utilizados, temperatura de anelamento otimizada, número de locos amplificados, número de locos polimórficos e grupo de ligação. Os marcadores que mostraram distorção de segregação mendeliana são indicados com # ($P < 0,05$).

Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	Nº de locos amplificados	Nº de locos polimórficos	Grupo de Ligação
70; 71	(CT) ₈ TG	40°C	8	7	7; 4
72 [#] ; 73 [#] ; 74 [#]	(CT) ₈ AC	40°C	7	5	7; 3; 7
75; 77	(CT) ₈ GC	40°C	7	4	4; 4
78; 79	(CA) ₆ AC	40°C	6	5	3; 1
80; 81 [#] ; 82	(CA) ₆ AG	40°C	7	6	7; 3; 7
83; 84; 85	(CAC) ₃ GC	40°C	9	7	4; 4; 3
86 [#] ; 87	(GAG) ₃ GC	40°C	7	6	1; 1
88; 90	(AC) ₈ C	50°C	8	5	11; 5
98; 99 [#] ; 100 [#]	(CT) ₈ RA	50°C	9	7	2; 9; 1
101; 104	(CT) ₈ RG	50°C	6	5	7; 4
108 [#] ; 109; 112	(CA) ₈ RG	52°C	7	7	9; 5; 5

Cont. Tabela 6

Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	Nº de locos amplificados	Nº de locos polimórficos	Grupo de Ligação
118; 120	(GA) ₇ C	50°C	5	4	11; 2
123; 124	(GA) ₈ YC	52°C	9	6	2; 6
132; 133	(GA) ₈ T	50°C	8	5	4; 9
134; 135 [#] ; 136	(GC) ₆ CC	50°C	7	6	2; 3; 10
137	(CAG) ₄ TA	50°C	4	3	6
141; 142 [#]	(AG) ₈ T	52°C	8	7	10; 10
143 [#] ; 144; 145	(TG) ₈ A	52°C	6	4	12; 5; 10
146; 147; 148	(AAT) ₄ CT	52°C	9	7	2; 9; 10
149; 150	(AC) ₈ YA	47°C	8	6	5; 7
152; 153	(GT) ₈ YG	47°C	7	5	2; 1
154 [#]	(CAA) ₅ GAC	47°C	3	1	12
155; 156	(AG) ₈ CG	47°C	4	3	3; 6

Cont. Tabela 6

Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	N° de locos amplificados	N° de locos polimórficos	Grupo de Ligação
158 [#] ; 159 [#] ; 160	(AG) ₈ TG	47°C	8	6	5; 5; 3
161; 162	(CCA) ₅	47°C	7	5	3; 12
163; 164	(GCC) ₅	47°C	6	4	11; 7
165 [#] ; 166	(GA) ₇ RC	49,5°C	8	6	5; 6
167; 168	(AG) ₇ C	49,5°C	7	5	5; 7
169; 171	(GTG) ₄ RC	49,5°C	7	4	5; 11
175; 176; 177 [#]	(GT) ₇ YG	49,5°C	6	3	12; 5; 8
180; 181	(GAA) ₆ AA	49,5°C	8	4	5; 11
186; 187; 188	(AC) ₈ T	49,5°C	6	5	7; 1; 9
189 [#]	(ATG) ₆	49,5°C	4	2	6
192	(AC) ₈ YG	40°C	2	1	2
196; 199	(GGGTG) ₃	50°C	5	4	1; 1
201	(GA) ₈ T	50°C	4	2	12

Cont. Tabela 6

Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento	N° de locos amplificados	N° de locos polimórficos	Grupo de Ligação
208 [#]	(CAC) ₃ GC	45°C	5	2	10
216 [#] ; 218	(AG) ₈ YT	42°C	6	5	4; 12
225; 226	(AC) ₈ CG	55°C	7	3	2; 4

Para o método RAPD (Figura 5) foram testados 24 iniciadores, sendo que destes cinco não detectaram polimorfismo e 19 foram selecionados pelo polimorfismo. Foi gerado um total de 56 marcas e o número médio de marcadores mapeados foi de 2,95. Para os 19 iniciadores RAPD foi produzido um total de 111 locos, dos quais 56 foram polimórficos entre os genitores e mapeados. Uma descrição mais detalhada dos marcadores RAPD, incluindo numeração no mapa de ligação, sequência dos marcadores utilizados, número de locos amplificados, número de locos polimórficos e grupo de ligação está disponível na Tabela 7.

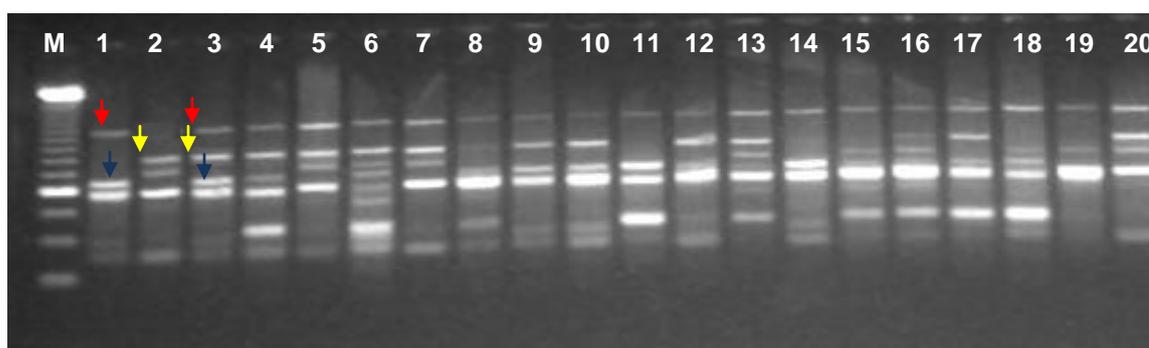


Figura 5- Gel agarose 2%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando marcador RAPD OPAC 20. (1) P₁, (2) P₂, (3) F₁, e (4-20) F₂. M= marcador de peso molecular. As setas indicam o polimorfismo entre os genitores e o F₁.

Tanto para marcadores ISSR quanto para RAPD foram obtidos um número elevado de locos, entretanto para o mapeamento foram utilizados apenas locos polimórficos entre os genitores e o F₁, sendo assim, locos que não obedeciam a essa condição e de caráter monomórfico foram descartados.

Dentre os mapas genéticos para *Capsicum* baseados em marcadores RAPD destaca-se o de Minamiyama et al., (2006), no qual foi construído um mapa para *C. annuum* formado por 13 grupos de ligação contendo 60 marcas RAPD além de outros marcadores. Ben Chaim et al., (2001) mapearam apenas cinco marcas RAPD, sendo o mapa constituído basicamente por marcadores AFLP e RFLP.

Tabela 7. Numeração no mapa de ligação, sequência dos marcadores RAPD utilizados, número de locos amplificados, número de locos polimórficos e grupo de ligação. Os marcadores que mostraram distorção de segregação mendeliana são indicados com # ($P < 0,05$).

Iniciador	Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	Nº de locos amplificados	Nº de locos polimórficos	Grupo de Ligação
OPAA 04	2; 3; 4	AGGACTGCTC	8	5	3; 10; 10
OPAA 11	5; 6; 7	ACCCGACCTG	7	5	4; 1; 5
OPAA 16	9 [#] ; 10	GGAACCCACA	5	2	1; 3
OPAA 18	11; 12; 13	TGGTCCAGCC	8	4	1; 1; 2
OPAB 05	14; 15	CCCGAAGCGA	7	4	10; 6
OPAB 09	16 [#] ; 17; 19 [#]	GGGCGACTAC	9	5	2; 6; 1
OPAB 14	20; 21	AAGTGCGACC	8	6	9; 7
OPAC 07	22	GTGGCCGATG	5	4	7
OPAC 10	24 [#] ; 25; 28	AGCAGCGAGG	8	7	2; 2; 2
OPAC 17	30; 31; 32	CCTGGAGCTT	7	5	2; 1; 2

Cont. Tabela 7

Iniciador	Numeração no mapa de ligação	Sequência (5'-3')	N° de locos amplificados	N° de locos polimórficos	Grupo de Ligação
OPAC 20	33; 34; 35 [#] ; 36	ACGGAAGTGG	11	9	1; 5; 5; 2
OPB 17	37; 38; 39	AGGGAACGAG	9	8	1; 4; 3
OPE 06	40; 41; 42	AAGACCCCTC	9	7	1; 6; 1
OPE 07	43 [#] ; 45 [#] ; 46; 47	AGATGCAGCC	10	9	3; 5; 4; 5
OPF 1	48; 49; 50	ACGGATCCTG	9	5	10; 7; 4
OPK 16	51; 52; 54 [#]	GAGCGTCGAA	11	9	4; 5; 4
OPN 06	55; 56; 57; 58	GAGACGCACA	11	10	4; 11; 1; 8
OPN 08	59; 60; 61	ACCTCAGCTC	8	4	6; 4; 7
OPW 06	62; 64; 65; 67	AGGCCCGATG	9	8	2; 2; 2; 2

Marcadores RAPD foram mapeados em praticamente todos os grupos de ligação do mapa para *C. baccatum*, exceto o grupo 12. As marcas ISSR foram distribuídas em todos os grupos de ligação, entretanto, de forma desigual. Foi possível observar uma concentração de marcadores de um mesmo tipo em regiões limitadas do mapa de ligação, como por exemplo, o acúmulo de marcas ISSR nos grupos 5 e 7. Em outros trabalhos desenvolvidos com *Capsicum* também foram observados acúmulo de um mesmo tipo de marcadores em uma determinada região (Livingstone et al., 1999; Kang et al., 2001; Sugita et al., 2005). De acordo com Sugita et al., (2005) essa concentração de marcadores é considerada comum no genoma de *Capsicum* e de outras solanáceas.

Marcadores ISSR e RAPD, apesar de dominantes, revelaram uma boa quantidade de locos polimórficos que puderam ser mapeados e possibilitaram a construção dos grupos de ligação. Se somados, o percentual de marcas geradas pelos marcadores ISSR e RAPD foi de 77,05%, taxa essa bem superior ao do marcador microsatélite, que foi de 22,95%. Isso ressalta a importância dos marcadores dominantes para a construção do mapa, especialmente para espécies que ainda não possuem mapas descritos. Além disso, possibilitaram a alocação dos marcadores microsatélites ao longo dos grupos de ligação.

3.1.4.3. Polimorfismo e transferibilidade de marcadores microsatélites

Em relação aos marcadores microsatélites (Figura 6), do total de 152 marcadores microsatélites disponíveis para *C. annuum*, e testados em *C. baccatum* var. *pendulum*, 62 foram transferidos com sucesso e considerados polimórficos, sendo que 42 foram mapeados, resultando em um percentual de 40,8% de marcadores microsatélites transferidos. Não pôde ser afirmada uma boa transferibilidade de alguns iniciadores microsatélites, pois não houve uma leitura clara dos géis. Em outros casos, foi possível observar que houve amplificação e, portanto transferência do iniciador, mas não foi detectado polimorfismo. Apesar de parte dos iniciadores microsatélites não terem sido transferidos (59,2%), fica evidente que as regiões que flanqueiam os microsatélites são conservadas entre espécies. Além disso, o presente estudo é

pioneiro para validação desses marcadores na espécie *C. baccatum*, o que possibilita estudos de sintenia dentro do gênero *Capsicum*.

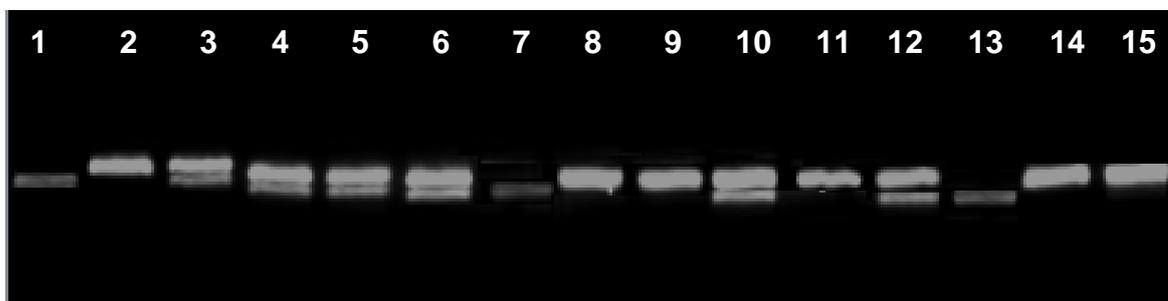


Figura 6- Gel agarose 'Metaphor' 4%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando o microssatélite CAMS-263. (1) P₁, (2) P₂, (3) F₁, e (4-15) F₂.

Observou-se uma boa correspondência entre a alocação dos marcadores microssatélites nos grupos de ligação de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* obtidos neste trabalho e os do grupo de ligação de *C. annuum* obtidos por Minamiyama et al., (2006). Uma porcentagem de 66,67% dos marcadores microssatélites mapeados neste estudo foram comuns aos grupos de ligação construídos por Minamiyama et al., (2006). Essa elevada similaridade é de grande relevância para estudos de sintenia e mapeamento comparativo com outras espécies de *Capsicum*.

A caracterização dos marcadores microssatélites utilizados neste estudo, incluindo tipo de repetição, sequência do par de iniciadores, temperatura de anelamento otimizada, grupo de ligação obtido, e tamanho do produto esperado (pb), bem como uma comparação com o mapa de ligação para *C. annuum* construído por Minamiyama et al., (2006) está disponível na Tabela 8.

Tabela 8. Marcadores microssatélites utilizados, tipo de repetição, sequência do par de iniciador, temperatura de anelamento otimizada, grupo de ligação obtido neste trabalho, grupo de ligação obtido por Minamiyama et al., (2006) e tamanho do produto esperado (pb).

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5'-3')	“Reverse” (5'-3')	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
228	CAMS-351	(tg) ₃ ...(ag) ₂₆	cgcatgaagcaaatgtacca	acctgcagttgtgttgga	55°C	4	4	206
229	CAMS-352-2	(ag) ₈ ...(ag) ₃	gctccttatgtggaggagga	cacctctgactttggctga	55°C	4	4	240
237	CAMS-163	(at) ₇ (gt) ₁₄	tccatatagcccgtgtgtga	gcgtgggaataacaatgct aga	62°C	4	5	250
239	CAMS-173	(cata) ₇ ...(ac) ₄	caaccgccagtagacaggtt	gtgcgtgtgcgtgtgtgat	55°C	4	4	169
263	CAMS-190	(ta) ₈ (tg) ₁₁ ...(ata) ₃	tttctgcagtggtaccaatattca	cccatgggtcctacctcag	62°C	5	5	212
264	CAMS-191	(ac) ₁₀ a(ta) ₄	cccgaatccaagtcattgag	taaaccggttcccttcct	62°C	5	3	224

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
272	CAMS-070	(gt) ₃ ...(tct) ₃ (ac) ₁₆ .(ac) ₃	ccctgaactgtcctccaaa	gggtatgggggttaggtgtg	55°C	6	6	248
277	CAMS-024	(tg) ₁₄ tt(tg) ₃	tgttgaggcttgggaaaaac	caagataatgggtagaaag gcaac	60°C	8	8	219
278	CAMS-090	(ca) ₃ a(ac) ₁ 5	tcgctcaaagcacatcaaag	cttgattgttcttccactgctg	62°C	8	8	243
279	CAMS-040	(ta) ₄ tg(ta) ₄ . (tg) ₁₀	tatagcctgtgggtgccttc	tgggggtgaacaatagcatgt		3	3	248
280	CAMS-142	(ta) ₃ ...(ac) ₇ (ac) ₁₂ (ta) ₈	gagcgcttaagtggcatagg	ctacaacgccccaaaaca at	55°C	1	7	241
281	CAMS-177	(ta) ₄ tg(ta) ₄ (tg) ₁₁	attctctaccctgcctgtg	ctcaggagatgtcccacgat	55°C	6	2	229
282	CAMS-378	(tc) ₆ ...(tc) ₄(ct) ₃	gaaatcgacgcgttctagc	tgtggggagagagaggaa ga	55°C	1	1	168

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
285	CAMS-227	(tgg) ₃ ...(tg) ₈	ttgtccttaattcacctttga	gcatcaaaataaggataaa gttatgg	60°C	5	5	296
286	CAMS-207-2	(ac) ₄ at(ac) ₈ (at) ₃	ctcacgagccactgaacac	gccttgttcctatcccaac	55°C	5	5	243
287	CAMS-199	(ta) ₃ (tg) ₉ ...(ta) ₃	ccctacctcggcatgtgata	tgcatgcatgggatataa	62°C	1	5	188
290	CAMS-373	(ag) ₈	ggtgatggtccatgtcaa	cctcctaccctatccccaag	55°C	12	12	230
293	CAMS-450	(tct) ₃ ...(tct) ₄ a(tct)	ccttctctttgccaccttc	tagcagcagctgatggaga a	58°C	5	5	220
297	CAMS-324	(tc) ₄ ...(tc) ₉ ...(tc) ₃	aactgatccaacggctgag	tcgaaggagagaaacggtt g	58°C	7	7	172
299	CAMS-478	(ag) ₁₂	gagtgccatgctgattaagga	cacgactgtcttgctgaac	55°C	3	3	248

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
301	CAMS-679	(tat) ₁₆	ttgcatgtttaccattcc	atgtgaaacacataggtag cactga	55°C	1	1	200
304	CAMS-456	(tc) ₁₀	atggagctggggctaaaaat	gctcagcaaattgaggaga ag	55°C	2	1	153
306	CAMS-301	(tg) ₆ tt(ag) ₁ 2	ctgtccatgcttgatgct	tgatttgcctcgttgag	55°C	8	8	180
308	CAMS-610	(taa) ₅ ...(ta a) ₁₁	ttggacatgacaattctgc	aaacgtacattaggtagatc cggt	55°C	1	1	207
309	CAMS-885	(gaa) ₂₈	aacgaaaaacaaaccaat ca	ttgaaattgctgaaactctga a	60°C	2	2	248
310	CAMS-492	(tc) ₆ ...(ac) ₄ (tc) ₄	gttcaaacacttcccctca	tgtcatcgttggtcgttacc	55°C	1	12	250
311	CAMS-679	(tat) ₁₆	ttgcatgtttaccattcc	atgtgaaacacataggtag cactga	63°C	1	1	200

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5'-3')	“Reverse” (5'-3')	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
316	CAMS-020	(tg) ₉ ...(tg) ₇	cagcagtaacagaggcagg tc	cacaagtgagttattcatat cacca	55°C	12	5	171
318	CAMS-644	(tg) ₃ ...(ag) ₂ 6	cgcatgaagcaaatgtacca	acctgcagttgtgttgga	55°C	4	4	206
323	CAMS-234	(ta) ₅ (tg) ₆ cg (tg) ₇	tatagcccatgggtgccttt	aaaaccaatattaacat atgcaa	55°C	6	6	157
324	CAMS-015	(ac) ₇ at(ac) 8a(ta) ₇	tcatgttgattatgctttgtca	ccatgtattgtatgatacctg agaaa	55°C	7	2	112
326	CAMS-101	(tg) ₄ ta(tg) ₁ 0	tcagcaattaacatgccaaa a	tggattgggagaagatcga c	55°C	6	6	217
329	CAMS-051	(gt) ₃ a(ta) ₄ (t g) ₁₁	accagttcccttcttgggt	gaaggttagcggaatgaa cg	58°C	11	5	151
331	CAMS-081	(ta) ₇ (tg) ₁₂	gttgggggagagttgggtat	tgggggtgaacactagcatgt	55°C	3	7	238

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
340	CAMS-065	(ac) ₁₂	ccagtctcatccagcagaca	catatgctgctcctgcattc	55°C	2	2	213
342	CAMS-072	(ac) ₁₃	cccgcgaaatcaaggtaat	aaagctattgctactgggttc g	55°C	5	5	153
346	CAMS-417	(tc) ₆ ta(tc) ₃	cccaaagacgatttgctga	attgcctgtgagtgaacaa	62°C	4	10	240
359	CAMS-892-2	(tct) ₁₂	cgtcgattgaccattgagtg	Tccttctaggaggcatgtttt	62°C	2	2	184
361	CAMS-358	(tg) ₇	gacccttctccccttttctt	cacatggacggatcctttt	55°C	6	6	218
365	CAMS-236	(ac) _{14a} (ta) ₁₀	ttgtagttgctgaccatttga	atgaatccagggtccaca a	55°C	2	7	191
366	CAMS-224-2	(ta) ₅ (tg) ₁₂	tctctgctccaaaatgggtga	gtgcgaaccctttgaaat	55°C	1	1	201

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
371	CAMS-095	(ca) ₃ ..(ca) ₉ . (ac) 5at(ac) ₉ (at)) ₆ g(ta) ₃	cgctagcatgacactcaagg	aaacggcaaggctacaca tc	60°C	5	1	228
374	CAMS-201	(ta) ₇ (tg) ₁₅ ta (tg) ₄ ...(ta) ₃	ggttattggtttggttcatttt	ttggactaaatggtgatacg agaaa	55°C	9	9	201
NM*	CAMS-063-2	(tc) ₆ ...(ac) 4...(tc)	ccactctccaaaagcaaac c	tgtttgccactgtatgtgtct g	55°C	-	2	213 199
NM	CAMS-075	(tg) ₁₀	actaattacacattctgcattttc tc	aggctcgagtaccacgaa ga	55°C	-	5	190
NM	CAMS-089	(tc) ₁₉	aacagcgctgatcctttacc	caacatcacagtggcaga aga	55°C	-	11	221
NM	CAMS-117	(tg) ₂₁ (ta) ₃	ttgtggaggaaacaagcaaa	cctcagcccaggagacat aa	55°C	-	11	223

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5’-3’)	“Reverse” (5’-3’)	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
NM	CAMS-122	(ta) ₃ t(ac) ₈ .. . (ac) ₃	catccacgtgcatagtcagg	ttctaagtgtgaaattatgg gattt	60°C	-	5	178
NM	CAMS-153	(ta) ₇ (tg) ₁₄ cg (tg) ₆	tgcaaaatataaatcccaa ga	aagtcagcaaacacatctg aaa	62°C	-	6	243
NM	CAMS-162	(ta) ₇ (tg) ₇ ta(tg) ₆	ggaccgtcaggagggtaca	gccatcattcaaaaccgaa t	55°C	-	1	210
NM	CAMS-194	(ta) ₇ ..(tg) ₁₁ aa(tg) ₃	tcatggaaaattaacaacgc ata	gggggttgagaagaag tt	55°C	-	1	245
NM	CAMS-237	(ta) ₆ (tg) ₁₃	ccttccttgaaattgatattta c	tcccctatcactcacatctgc	60°C	-	2	221
NM	CAMS-330	(ct) ₃ ...(tc) ₁₂	ggctaccgcctctgactta	ttcgtatctggggtgcaaa	55°C	-	4	208
NM	CAMS-336	(tc) ₁₆	ggtggaaactgcttgaga	cccagaacctccacctac t	55°C	-	3	157
NM	CAMS-361	(ga) ₇	ttggtgtggttaggggagag	ggcgttcaactgtgaaat	55°C	-	4	207

Cont. Tabela 8

Numeração para QTLs	Numeração no mapa de ligação	Repetição	“Forward” (5'-3')	“Reverse” (5'-3')	Temperatura de anelamento	Grupo de ligação	Grupo de ligação (Minamiyama et al., 2006)	Tamanho do produto esperado (pb)
NM	CAMS-454	(ct) ₃ ...(tc) ₄ c(ct)	gagcctctaatagtatctgaaa aca	aattttggtgaatcgcacct	55°C	-	9	243
NM	CAMS-494	(ag) ₇ ...(ag) ₃	ggtaggtgaggaccacag a	aactataccccgctgctct	55°C	-	4	247
NM	CAMS-647	(tat) ₆ tg(tta) ₃ ...(tat) ₂₁	cggattcgggtgagtcgata	gtgctttggttcggtctttc	55°C	-	3	221
NM	CAMS-684	(tat) ₄ (taa) ₇ ...(taa) ₁₀	cagggtgagccaaaccata g	tcaagactactaggtcgtgg aatg	55°C	-	6	232
NM	CAMS-806	(aga) ₁₉	tgtcacaagtgcaaggtagg ag	ccccaaaaatttccctcat	55°C	-	10	227
NM	CAMS-826	(gaa) ₆ ga(ga)	cttgatctcaagaaccagcta caa	tgtacattgaagacacgga agaa	55°C	-	8	244
NM	CAMS-864	(aga) ₃₂	ctgttggaagaaggagac a	gcttcttttcaacctctct	55°C	-	7	222
NM	CAMS-891	(gaa) ₈	ctccgagaaggatgtcagga	actgagcgactgatgcctct	55°C	-	6	204

*NM – Marcadores não mapeados, mas que foram transferidos com sucesso para *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, sendo detectado polimorfismo entre os genitores e a progênie.

Em concordância com os dados obtidos, Zhu et al., (2012) realizaram um estudo para averiguar a transferibilidade de 35 iniciadores microssatélites disponíveis para solanáceas como batata, tomate e berinjela em *Solanum elaeagnifolium*, espécie que também não possui iniciadores microssatélites disponíveis até o momento. Dentre esses, 13 (37,14%) pares de iniciadores foram polimórficos em *S. elaeagnifolium*.

Os resultados obtidos na presente pesquisa são mais favoráveis do que aqueles obtidos no estudo desenvolvido por Priyamedha et al., (2012), que testou a transferibilidade de 359 iniciadores microssatélites desenhados para *Brassica rapa*, *B. oleracea*, *B. nigra* e *B. napus* para construção do primeiro mapa genético da espécie *Brassica carinata*. Apenas 15 iniciadores microssatélites foram transferidos com sucesso, ou seja, a taxa de transferência foi de 4,1%, cerca de dez vezes menor que a taxa de transferência obtida nessa pesquisa. Baixa taxa de transferência também foi observada por Kuleung et al., (2004) ao estudarem a transferibilidade de iniciadores microssatélites sintetizados para trigo em centeio e vice-versa, constatando uma transferibilidade de trigo para centeio de 17%, enquanto 25% dos marcadores desenhados para centeio foram polimórficos em trigo. Varshney et al., (2005) testaram a transferibilidade de 185 marcadores microssatélites de cevada em arroz e obtiveram resultados semelhantes ao desta pesquisa, detectaram que 78 foram transferidos com sucesso, possibilitando detectar polimorfismo na cultura. A descrição dos diferentes trabalhos com as porcentagens dos marcadores microssatélites transferidos, bem como a do presente estudo encontra-se na Tabela 9.

Marcadores do tipo microssatélite foram mapeados em praticamente todos os grupos de ligação, exceto no grupo 10. Mimura et al., (2012) construíram um mapa genético integrado por 253 marcadores (151 SSRs, 90 AFLPs, 10 CAPSs e 2 TAGs), no qual foram mapeadas marcas microssatélites em todos os grupos de ligação. Barchi et al., (2007) desenvolveram um mapa para *C. annuum* no qual foram integradas 40 marcas microssatélites concentradas em poucos grupos de ligação, demonstrando que esses marcadores não foram bem distribuídos pelo genoma.

Tabela 9. Comparação dos percentuais de marcadores microssatélites transferidos para algumas espécies com a taxa obtida no presente trabalho para *C. baccatum*.

Espécie	SSR Espécie	Transferência (%)	Autoria Mapa
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Secale cereale</i>	25	Kuleung et al., (2004)
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Oryza rufipogon</i> , <i>O. sativa</i>	42,1	Varshney et al., (2005)
<i>Brassica carinata</i>	<i>B. rapa</i> , <i>B. oleracea</i> , <i>B. nigra</i> e <i>B. napus</i>	4,1	Priyamedha et al., (2012)
<i>Solanum elaeagnifolium</i>	<i>S. lycopersicum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S. melongena</i>	37,14	Zhu et al., (2012)
<i>Capsicum baccatum</i>	<i>C. annuum</i>	40,8	Moulin (2013) – este trabalho

Foi possível observar neste estudo que a distribuição dos marcadores não foi uniforme nos grupos de ligação, entretanto estavam presentes em praticamente todos os grupos de ligação. O maior número de marcadores microssatélites foram mapeados no grupo de ligação 4, correspondendo a seis marcas, sendo quatro destas mapeadas no mesmo grupo de ligação do trabalho de Minamiyama et al., (2006).

Para as espécies que não possuem mapas de ligação descritos é comum que seja utilizado mais de um tipo de marcador. Outros marcadores são também importantes para agregar marcas microssatélites ao mapa, especialmente quando não existem marcadores desse tipo desenhados para a espécie estudada. Para *C. annuum* que possui mapas de alta densidade já descritos é possível construir mapas que sejam saturados apenas com microssatélites (Mimura et al., 2012; Sugita et al., 2013). Em geral, a obtenção de mapas genéticos para espécies menos pesquisadas é dificultada pela disponibilidade e transferibilidade dos marcadores moleculares, especialmente microssatélites.

Foram testados cerca de 30 microssatélites desenhados para tomate (Geethanjali et al., 2010), entretanto não foram viáveis para genotipagem da

população de *C. baccatum*. Para a maioria não houve amplificação, e dentre os pares de iniciadores microssatélites que demonstraram alguma amplificação, nenhum forneceu boa nitidez dos locos nos géis e nem mesmo revelou polimorfismo entre os genitores, obtendo-se padrões monomórficos entre os genitores e a progênie.

Como não se tem informações a respeito da transferibilidade e uso dos microssatélites para a espécie *C. baccatum*, a construção de mapas de ligação incorporando esses marcadores de natureza codominante representam uma valiosa estratégia para estudos genômicos na espécie.

A identificação de marcadores microssatélites polimórficos representa um grande avanço para a implementação de seleção assistida por marcadores nos programas de melhoramento de *C. baccatum*, e possibilita também que a cultura se beneficie dos avanços em genética e genômica de outras espécies mais estudadas, como *C. annuum*. Em um próximo trabalho podem ser incluídos mais marcadores microssatélites para maior saturação do mapa e realizados estudos mais aprofundados de sintenia com outras espécies do gênero *Capsicum* e da família Solanaceae.

3.1.4.4. Mapeamento de QTLs

O mapeamento por intervalo padrão permitiu a identificação de QTLs associadas às 13 características agronômicas quantitativas e às três características qualitativas avaliadas.

3.1.4.4.1. Mapeamento de QTLs para características quantitativas

Para os caracteres quantitativos o número de QTLs obtidos variou entre 3 e 11 e a taxa da variação fenotípica explicada variou de 0,76% a 3,45%. O número médio de QTLs para as características avaliadas foi de 5,46. Os grupos de ligação, marcadores e a porcentagem de variação fenotípica explicada por cada marcador, dentre outras características estão disponíveis na Tabela 10.

Tabela 10. Caracterização dos QTLs detectados para cada um dos descritores quantitativos avaliados em uma população F₂ de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Característica	Grupo de Ligação ^c	Marcador	Posição (cM)	LOD score	LOD ^b threshold	% de variação
Altura da planta (ALP ^a)	5a	7	166,9	2,03	4,29	1,34
	8	264	41,2	1,98	4,29	1,10
	9	374	59,5	2,06	4,29	2,06
	10	141	73,8	2,36	4,29	1,45
	1b	371	17,3	1,89	4,29	1,45
	5b	159	0,0	1,96	4,29	2,12
Total						9,52
Diâmetro da copa (DIC ^a)	1b	371	17,3	1,75	3,25	1,25
	5b	159	0,0	1,69	3,25	1,36
	5b	169	9,0	1,95	3,86	0,98
	5b	158	14,8	1,25	3,68	0,87
	5b	144	21,4	1,36	3,35	0,96
	5b	176	27,7	1,56	3,35	0,94
	5b	149	35,5	1,63	3,35	1,56
	5b	165	54,2	1,87	2,89	1,32
Total						9,24
Nº de dias para floração (DFL ^a)	11	118	0,0	1,98	4,15	1,65
	5b	159	0,0	1,65	4,15	1,35
	5b	165	54,2	1,55	4,15	2,01
Total						5,01
Nº de dias para frutificação (DFR ^a)	11	118	0,0	1,69	4,25	2,35
	5b	159	0,0	1,96	4,82	3,45
	5b	165	54,2	1,85	4,82	0,98
Total						6,78
Nº de frutos por planta (NFP ^a)	7a	365	126,6	1,96	4,12	2,34
	9	374	59,5	1,96	4,12	1,56
	1b	282	80,2	1,96	3,36	0,98
	2a	152	90,0	1,36	3,36	1,25
	5b	159	0,0	2,15	3,56	1,36
	5b	169	9,0	2,15	3,56	1,53

Cont, Tabela 10

Característica	Grupo de Ligação^c	Marcador	Posição (cM)	LOD score	LOD^b threshold	% de variação
	5b	158	14,8	2,15	3,56	1,65
	5b	144	21,4	2,15	3,56	1,56
	5b	176	27,7	2,15	3,65	1,69
	5b	149	35,5	2,15	3,12	1,23
	5b	165	54,2	1,98	3,56	0,98
Total						16,13
Massa média do fruto (MMF^a)	2a	359	258,3	1,69	4,08	1,45
	3a	299	181,1	1,56	3,65	2,36
	12	316	43,1	1,48	3,65	0,96
	5b	159	0,0	1,96	3,65	1,56
	5b	158	14,8	1,63	3,65	1,69
	5b	144	21,4	1,54	3,65	1,56
	5b	176	27,7	1,96	3,65	1,56
	5b	149	35,5	1,96	3,65	1,65
	5b	165	54,2	1,96	3,65	1,65
Total						14,44
Comprimento do fruto (CMF^a)	11	118	0,0	1,96	4,08	1,98
	5b	159	0,0	2,13	4,08	1,76
	5b	165	54,2	2,01	4,08	1,98
Total						5,72
Diâmetro do fruto (DMF^a)	11	118	0,0	2,01	3,79	1,76
	5b	169	9,0	2,01	3,79	1,09
	5b	149	35,5	2,01	3,79	1,87
Total						4,72
Espessura da polpa do fruto (EPF^a)	7a	324	38,3	2,14	3,95	1,09
	5b	159	0,0	2,14	3,95	1,13
	5b	165	54,2	2,14	3,95	1,09
Total						3,31
Teor de sólidos solúveis (TSS^a)	5a	342	82,2	1,98	4,95	2,13
	5b	159	0,0	1,98	2,78	1,96
	5b	169	9,0	1,98	2,78	0,98
	5b	158	14,8	1,96	2,78	0,76
	5b	144	21,4	1,96	2,78	0,76
	5b	176	27,7	1,96	2,78	1,02

Cont, Tabela 10

Característica	Grupo de Ligação ^c	Marcador	Posição (cM)	LOD score	LOD ^b threshold	% de variação
	5b	149	35,5	2,01	3,95	2,16
	5b	165	54,2	2,01	3,62	2,34
Total						12,08
Massa seca do fruto (MSF ^a)	11	118	0,0	1,98	3,23	1,98
	1b	371	17,3	1,98	3,62	2,09
	5b	159	0,0	1,98	3,62	2,15
	5b	165	54,2	1,98	4,62	3,34
Total						9,56
Teor de massa seca do fruto (TMS ^a)	10	141	73,8	2,12	3,59	2,56
	11	118	0,0	2,12	3,59	2,34
	1b	287	0,0	2,87	3,59	2,65
	5b	169	9,0	2,69	3,59	2,09
	5b	149	35,5	2,62	3,59	2,43
Total						12,07
Nº de sementes (NS ^a)	11	118	0,0	1,98	3,65	0,96
	5b	169	9,0	2,36	3,65	0,99
	5b	158	14,8	2,36	3,65	1,36
	5b	144	21,4	2,36	3,65	1,56
	5b	176	27,7	2,36	3,65	2,03
Total						6,90

^aMétodo de análise por intervalo padrão para dados paramétricos. ^bDeterminado por teste de permutação a 5% de probabilidade.

Considerando as 13 características avaliadas, 71 QTLs de pequeno efeito foram detectados em nove grupos de ligação. Apenas nos grupos 3, 4 e 6 não foram detectados QTLs. Alguns locos marcadores estão presentes no controle de mais de uma característica, em especial os marcadores do grupo de ligação 5b. Segundo Schuster & Cruz (2004) o conhecimento do número e dos efeitos dos QTLs pode propiciar aos melhoristas conhecimento do controle genético destas características e permitir a elaboração de estratégias de seleção mais eficientes.

Alimi et al., (2013) utilizando 149 linhas recombinantes melhoradas de *C. annuum*, detectaram 24 QTLs variando de menor a maior efeito para 16 caracteres agrônômicos avaliados. Yarnes et al., (2013) desenvolveram um mapa genético para pimenta, a partir do cruzamento de *C. frutescens* e *C. annuum* e

identificaram 96 QTLs associados a 38 características agronômicas avaliadas.

Os valores da estatística LOD Score para a maior parte dos QTLs, obtidos pelo uso do Programa R/'Pacote QTL', são valores críticos, o que pode ser justificado pela herdabilidade da maioria das características agronômicas estudadas, que variou de moderado a baixo. Para Martinez et al., (1999) os fatores mais importantes que influenciam o poder e os parâmetros do QTL são a herdabilidade e a variância genética da característica.

Os QTLs identificados propiciaram uma baixa explicação das características fenotípicas avaliadas, mas representam importantes estimativas de localização de QTLs responsáveis por determinadas características para a espécie *C. baccatum*. QTLs com menores efeitos são localizados com menor precisão. De acordo com Asins et al., (2004), muitos QTLs são de pequeno efeito, sendo responsáveis por menos de 10% da variação fenotípica e muitos deste tipo já foram detectados em trabalhos cuja herança das características em estudo era poligênica ou quantitativa.

Possivelmente uma maior saturação do mapa de ligação irá possibilitar que os QTLs obtidos neste trabalho tenham sua magnitude aumentada e realocação no mapa de ligação para explicação de um determinado caráter ou ainda, à medida que mais QTLs forem identificados, índices de eficiência maiores poderão viabilizar a seleção assistida por marcadores.

Para o caráter altura (ALP) das plantas seis marcadores foram identificados. Esses marcadores encontram-se localizados em cinco grupos de ligação, sendo um no grupo 1b, dois no grupo 5 (um no 5a e um no 5b), um no grupo 8, um no grupo 9 e um no grupo 10. Uma das marcas foi RAPD (7), duas ISSR (141 e 159), e três microssatélites (264, 371 e 374). A taxa de variação fenotípica explicada variou de 1,10 a 2,12, totalizando 9,52%. Ben Chaim et al., (2001) obtiveram resultados divergentes ao deste trabalho, os autores identificaram oito QTLs baseado em um mapa construído a partir de 180 famílias em F_3 de *C. annuum*. Os QTLs foram detectados nos grupos 2, 3, 4, 6 e 8, apenas o grupo 8 é comum ao deste trabalho, o que pode entre outros motivos, estar relacionado ao complexo gênico das espécies *C. baccatum* e *C. annuum*, que são diferentes.

Com relação à característica diâmetro da copa (DIC) foram detectados oito marcadores. Esses foram localizados em dois grupos de ligação, sendo um no

grupo 1b e sete no grupo 5b. O marcador mapeado no grupo 1b e identificado como QTL é um microssatélite, enquanto os demais marcadores associados com o diâmetro da copa são todos ISSR mapeados no grupo 5b (144, 149, 158, 159, 165, 169 e 176). E a variação explicada por esses marcadores variaram de 0,87 a 1,56, totalizando 9,24%.

Para o número de dias para floração (DFL) e número de dias para frutificação (DFR) foram estimados os mesmos três marcadores, sendo um no grupo 11, e dois no grupo 5b. Os marcadores associados a essas características são do tipo ISSR. A porcentagem de variação fenotípica explicada variou de 1,35 a 2,01 para número de dias para floração e de 0,98 a 3,45 para número de dias para frutificação, totalizando 5,01% e 6,78% respectivamente. Como são características correlacionadas, era previsível que pelo menos uma parte dos marcadores fosse comum. Yarnes et al., (2013) identificaram QTLs em grupos de ligação diferentes dos obtidos neste trabalho, para número de dias para floração o QTL associado foi observado no grupo 6 e para número de dias para frutificação o QTL foi detectado no grupo 8. Entretanto, nesse trabalho os autores utilizaram uma população de mapeamento oriunda de cruzamento interespecífico entre *C. frutescens* e *C. annuum*.

Para o caráter número de frutos por planta (NFP) foi identificado o maior número de marcadores, correspondendo a um total de 11 marcadores. Esses marcadores encontram-se localizados em cinco grupos de ligação, sendo um no grupo 1b (282), um no grupo 2a (152), sete no grupo 5b (144, 149, 158, 159, 165, 169 e 176), um no grupo 7a (365) e um no grupo 9 (374). Para essa característica, três marcas associadas foram de microssatélites (282, 365 e 374) e oito de ISSR (144, 149, 152, 158, 159, 165, 169 e 176). A taxa de variação fenotípica explicada variou de 0,98 a 2,34, totalizando 16,13%. Alimi et al., (2013) também detectaram marcadores nos grupos 1 e 2 associados ao número de frutos por planta em *C. annuum*. Trabalhos desenvolvidos por Rao et al., (2003) com *C. annuum* identificaram nos grupos de ligação 2, 3 e 11 os possíveis QTLs responsáveis pela característica. Barchi et al., (2009) realizaram a caracterização fenotípica para esse caráter, mas não identificaram QTLs relacionados ao caráter.

Com relação à massa média de frutos (MMF) foram discriminados nove marcadores, sendo localizados em quatro grupos de ligação distintos, um no

grupo 2a (359), um no grupo 3a (299), um no grupo 12 (316) e seis no grupo 5b (144, 149, 158, 159, 165 e 176). Três marcadores mapeados e associados ao MMF são microssatélites (299, 316 e 359) e os demais são ISSR. A variação explicada ficou entre 0,96 a 2,36, correspondendo a um total de 14,44% da variação fenotípica. Lu et al., (2012) ao desenvolverem um mapa denso para uma população de *C. annuum* detectaram três QTLs relacionados à MMF nos grupos 3 e 4, e esses explicaram 30,14% da variação fenotípica. Barchi et al., (2009) mapearam QTLs associados ao MMF nos grupos de ligação 3, 4, 11 e 12, enquanto Rao et al., (2003) identificaram QTLs nos grupos 1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, o que indica que possivelmente esse caráter é controlado por QTLs localizados em alguns grupos de ligação.

Para o comprimento (CMF) e diâmetro (DMF) dos frutos foram identificados três marcadores para cada caráter. Para o comprimento do fruto foi identificado um marcador no grupo 11 (118) e dois no grupo 5b (159 e 165). Para o diâmetro do fruto foi identificado o mesmo marcador no grupo 11, e dois no grupo 5b (149 e 169). Todos os marcadores associados foram do tipo ISSR. O percentual de variação explicado foi de 1,76 a 1,98 para o comprimento do fruto, e de 1,09 a 1,87 para diâmetro do fruto, totalizando 5,72% e 4,72% respectivamente. Em consonância com o obtido neste trabalho, Yarnes et al., (2013) detectaram dois QTLs associados ao DF de pimenta e um QTL associado ao CF, todos no grupo de ligação 11. Em estudos desenvolvidos por Lu et al., (2012) foram identificados três QTLs na mesma posição para comprimento e diâmetro dos frutos nos grupos de ligação 4, 5 e 10, sendo que para CMF o grupo de marcadores explicou 10,98%, enquanto para DMF foi explicado 21,44% da variação fenotípica. Ainda em relação ao CF, Lee et al., (2011) obtiveram resultados similares ao dessa pesquisa, e observaram QTLs nos grupos 5 e 11. Dados contrastantes foram obtidos por Borovsky et al., (2011) para CFM, que identificaram um QTL de grande efeito no grupo de ligação 10.

Considerando-se a característica espessura da polpa (EPF), foram identificadas três marcas, duas de ISSR no grupo 5b (159 e 165) e uma de microssatélite no grupo 7a (324). A variação explicada foi de 1,09 a 1,13, totalizando 3,31%.

Para o caráter teor de sólidos solúveis (TSS) foram obtidos oito marcadores, todos localizados no grupo de ligação 5, um no grupo 5a (342) e sete

no grupo 5b (144, 149, 158, 159, 165, 169 e 176). Uma das marcas associadas ao caráter TSS foi de microssatélite (342) enquanto as demais foram de marcadores ISSR. A porcentagem de variação fenotípica explicada variou de 0,76 a 2,34, totalizando 12,08%. Ben Chaim et al., (2001) ao estudar o mesmo caráter em *C. annuum* detectaram QTLs nos grupos 3, 6 e 12. Entretanto, os autores utilizaram para construção do mapa marcadores AFLP e RFLP, distintos aos utilizados neste trabalho.

Para a característica massa seca do fruto (MSF) foram identificados quatro marcadores, em três diferentes grupos de ligação, sendo um marcador microssatélite no grupo 1b (371), dois do tipo ISSR no grupo 5b (159 e 165) e um do tipo ISSR no grupo 11 (118). A taxa da variação explicada ficou entre 1,98 a 3,34, totalizando 9,56. Para esse caráter estudado foram obtidos os melhores valores de explicação do fenótipo por marcador.

Já para o caráter teor de massa seca do fruto (TMS) foram identificados cinco marcadores em quatro grupos de ligação. Um marcador microssatélite (287) foi localizado no grupo 1b, dois marcadores ISSR no grupo 5b (149 e 169), um marcador ISSR no grupo 10 (141) e um marcador ISSR no grupo 11 (118). A variação explicada foi de 2,09 a 2,65, contribuindo com um total de 12,07% para explicação do TMS.

Com relação ao número de sementes (NS) foram observados cinco marcadores distribuídos em dois grupos de ligação, um marcador no grupo de ligação 11 (118) e quatro marcadores no grupo de ligação 5b (144, 158, 169 e 176). Todas as marcas são do tipo ISSR. A taxa de variação fenotípica explicada variou de 0,96 a 2,03, totalizando 6,90%.

Para muitos dos caracteres avaliados neste trabalho não há informações na literatura quanto à identificação dos QTLs associados, nem mesmo para *C. annuum*, que é a espécie mais estudada. Neste contexto, para características como diâmetro da copa, espessura da polpa, massa seca e teor de massa seca do fruto, e número de sementes não foram encontrados trabalhos publicados para que pudesse ser efetuada comparação com os dados obtidos neste trabalho. Para características envolvendo identificação de QTLs associados aos frutos e produtividade foi possível realizar comparações com outros trabalhos, mas estes são ainda em número muito limitado.

Em *C. baccatum* foi possível detectar um grande número de QTLs identificados no grupo de ligação 5b. Todos os QTLs identificados nesse grupo tiveram uma distância máxima de 20 cM para o marcador seguinte. A melhor saturação desse grupo pode estar relacionada aos marcadores estarem associados ao controle dos diversos caracteres estudados. Esse dado indica que esse grupo está potencialmente envolvido na explicação da variação fenotípica para diversos caracteres quantitativos em *C. baccatum*, bem como os QTLs posicionados nesse grupo mostram-se promissores para um maior conhecimento das características em análise.

Neste estudo foi realizada uma dissecação genética a respeito da localização de QTLs e sua importância para cada um dos treze caracteres agrônômicos quantitativos em *C. baccatum*. Portanto, esses QTLs de pequena magnitude são úteis em um programa de seleção assistida, uma vez que podem ser utilizados como ponto de referência na espécie para detecção de QTLs de maior efeito.

3.1.4.4.2. Mapeamento de QTLs para características qualitativas

Para os caracteres qualitativos o número de QTLs obtidos variou entre três e quatro e a taxa da variação fenotípica explicada variou de 1,56% a 2,45%. O número médio de QTLs para as características avaliadas foi 3,33. Os grupos de ligação, marcadores e a porcentagem de variação fenotípica explicada por cada marcador, dentre outras características estão disponíveis na Tabela 11.

Para as três características qualitativas foram obtidos dez QTLs, detectados em três grupos de ligação, concentrando-se nos grupos 4 e 9, que estão relacionados às características avaliadas. QTLs responsáveis por controlar essas características já foram identificados em estudos com a espécie *C. annuum* (Ben Chaim et al., 2001; Ben Chaim et al., 2003; Zygier et al., 2005).

Considerando o caráter cor do fruto no estágio imaturo (CFI) foram identificados três marcadores associados ao fenótipo, sendo uma marca microssatélite (346) no grupo de ligação 4 e dois marcadores do tipo ISSR (147; 188) no grupo 9. A porcentagem de variação fenotípica explicada variou de 1,56 a 2,36, totalizando 6,26%.

Para a característica cor do fruto no estágio maduro (CFM) foram detectados quatro marcadores relacionados, sendo um no grupo 4, dois no grupo 9 e um no grupo 12. Apenas o marcador de número 290 (grupo 12) diverge daqueles que foram identificados para CFI, sendo esse do tipo microsatélite. A taxa de variação fenotípica explicada variou de 2,03 a 2,36, totalizando 8,55%.

Tabela 11. Caracterização dos QTLs detectados para cada um dos descritores qualitativos avaliados em uma população F_2 de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*.

Característica	Grupo de Ligação	Marcador	Posição (cM)	LOD score	LOD ^b threshold	% de variação
Cor do fruto imaturo (CFI ^a)	4	346	126,7	2,03	4,29	2,34
	9	188	0,0	2,56	4,25	2,36
	9	147	112,2	1,98	3,96	1,56
Total						6,26
Cor do fruto maduro (CFM ^a)	4	346	126,7	2,36	4,25	2,03
	9	188	0,0	2,56	4,36	2,36
	9	147	112,2	2,96	4,66	2,13
	12	290	50,8	2,86	4,25	2,03
Total						8,55
Forma do fruto (FFR ^a)	4	346	126,7	2,78	4,15	2,01
	9	188	0,0	2,50	4,01	1,98
	9	147	112,2	2,89	4,26	2,45
Total						6,44

^aMétodo de análise por intervalo padrão para dados não paramétricos.

^bDeterminado por teste de permutação a 5% de probabilidade.

Entre um dos poucos relatos sobre QTLs controlando a cor do fruto imaturo e maduro em pimenta está o trabalho de Ben Chaim et al., (2001), no qual é descrito que a intensidade da cor dos frutos de *C. annuum* é possivelmente controlada por QTLs identificados nos grupos de ligação 3, 4, 8 e 10.

A respeito de outras solanáceas, como o tomate, é descrito que para o

fenótipo da cor do fruto há um grande número de trabalhos com detecção de QTLs no grupo de ligação 4 (Okmen et al., 2011).

Com relação à forma do fruto (FFR), foram detectados os mesmos marcadores que para a característica CFI. A variação fenotípica ficou entre 1,98 e 2,45, totalizando 6,44%. Em concordância com esse trabalho, Alimi et al., (2013) e Lee et al., (2011) relatam que QTLs que controlam a forma do fruto são geralmente identificados no cromossomo 4, além dessa característica também estar relacionada ao grupo de ligação 2. Em estudos realizados por Zygier et al., (2005) com *C. annuum* foi detectado um único QTL no grupo de ligação 4 responsável por explicar 16,5% da variação fenotípica para o caráter.

3.1.5. CONCLUSÕES

Foi construído o primeiro mapa de ligação para *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, baseado em 183 marcadores (42 SSR, 85 ISSR e 56 RAPD). O grau de cobertura e de densidade em marcadores deste mapa permite que ele seja considerado o mapa genético de referência desta espécie, constituindo o ponto de partida para a inclusão de novos marcadores e saturação do mapa.

Marcadores ISSR e RAPD foram de grande relevância para o desenvolvimento do mapa de ligação de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, visto que, além de integrar o maior número de marcas no mapa, possibilitaram a alocação de marcadores microssatélites.

Foram identificados 62 marcadores microssatélites polimórficos para *C. baccatum*, dos quais 42 foram mapeados. O mapeamento de marcadores microssatélites representa uma informação valiosa, por evidenciar a transferibilidade de marcadores desenhados para *C. annuum* e identificar uma similaridade genotípica com a espécie em estudo. Além disso, o presente trabalho possibilita a inclusão da espécie *C. baccatum* em estudos de sintenia com outras espécies do gênero *Capsicum* e da família Solanaceae.

No presente trabalho foram mapeados os primeiros QTLs para características agrônômicas de relevante interesse ao melhoramento de *C.*

baccatum var. *pendulum*, incluindo QTLs para componentes de produtividade, podendo ser utilizados como referência para outros trabalhos de mapeamento e identificação de QTLs. Adicionalmente, é necessário um maior acúmulo de dados de QTLs no gênero *Capsicum*, pois permitirá realizar uma análise comparativa e caracterização genética da diversidade morfológica presente no gênero.

3.2. DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM FOLHAS DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum* RESISTENTES AO *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)

3.2.1. INTRODUÇÃO

Todos os organismos vivos desenvolvem diferentes mecanismos constitutivos e induzidos para se protegerem de patógenos. Inúmeros compostos que conferem resistência a vírus, bactérias patogênicas e fungos foram identificados em plantas, entre os quais, podem ser citados peptídeos e proteínas com atividade antimicrobiana (Benko-Iseppon et al., 2010). Entre as proteínas mais conhecidas envolvidas em defesa de plantas podemos citar os inibidores de proteases, lectinas, proteínas relacionadas à patogênese, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e proteínas de inativação de ribossomas (Macedo et al., 2004; Jamal et al., 2012).

A maioria das plantas produz inibidores de proteases como uma defesa contra organismos fitopatogênicos e insetos. Os inibidores foram descritos pela primeira vez por Fermi & Pernossi (1894), no século XIX. São mais estudados em famílias de plantas como Solanaceae, Fabaceae e Poaceae, sendo detectados em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (Macedo et al., 2011).

Inibidores de proteases são pequenas moléculas que inibem a atividade de uma protease do patógeno por ligação, bloqueando seu sítio ativo, portanto, suprimindo a atividade enzimática de insetos e microrganismos fitopatogênicos.

Esses inibidores podem ser encontrados constitutivamente, ou seja, produzidos durante o desenvolvimento normal das plantas, ou serem induzidos nas plantas em resposta a um ataque de um patógeno (Joshi et al., 2013).

Dentre os vários grupos de inibidores de proteases, os inibidores de serinoproteases são os mais bem estudados e têm sido isolados em inúmeras espécies, inclusive em *Capsicum annuum* (Antcheva et al., 1996; Moura & Ryan, 2001; Tamhane et al., 2005; Tamhane et al., 2007; Tamhane et al., 2009; Mishra et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Ribeiro et al., 2013) e *Capsicum chinense* (Dias et al., 2013). Inibidores de tripsina estão incluídos na classe de inibidores de serinoproteases, e a presença de altas concentrações dessa molécula pode estar associada com a resistência de plantas a insetos, fungos, bactérias e vírus (Kim et al., 2009; Oliva et al., 2011).

O sucesso de uma estratégia que empregue proteínas de defesa no melhoramento de plantas depende da investigação acerca de sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos, da determinação da sequência parcial ou total de aminoácidos da proteína, e da purificação e caracterização da proteína de interesse (Oliveira & Macedo, 2011).

Plantas desenvolveram uma série de mecanismos de resistência para responder a doenças, inclusive a infecções virais. As diferenças entre a suscetibilidade e resistência em plantas estão associados a diferenças no tempo e magnitude da resposta induzida e também na expressão de conjuntos diferentes de genes (Yang et al., 2006).

Dentre as viroses, o mosaico amarelo causado pelo *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV, família Potyviridae, gênero *Potyvirus*) é considerado a virose mais importante para a cultura da pimenta (Moura et al., 2011; Lucinda et al., 2012). Dentre os sintomas causados pela doença destacam-se a redução do tamanho dos frutos e da planta, folhas encrespadas e desenvolvimento do mosaico com a tonalidade verde-amarelada. A doença é responsável por significativas perdas no Centro-Sul do Brasil (Zambolim et al., 2004; Bento et al., 2009).

O uso de cultivares melhoradas que reúnam resistência ao PepYMV, qualidade do fruto, e rendimento elevado é a alternativa mais eficiente para controlar o mosaico amarelo. Conseqüentemente, programas de melhoramento de *Capsicum spp.* ativos no país têm pesquisado por fontes de resistência em bancos de germoplasma (Bento et al., 2009). Alguns recursos genéticos

resistentes ao PepYMV em *Capsicum* têm sido relatados em pimentas no Brasil (Nascimento, 2007; Gioria et al., 2009; Bento et al., 2009; Gonçalves et al., 2011). Entretanto, as informações a respeito da resistência ao PepYMV em *Capsicum baccatum* ainda são escassas na literatura. Bento et al., (2013) detectaram que vários genes são responsáveis pela resistência ao PepYMV em uma população segregante oriunda do cruzamento entre acessos de *C. baccatum*, UENF 1616 x UENF 1732, caracterizando assim uma herança poligênica para esse caráter.

Dentre os poucos trabalhos relacionados aos mecanismos bioquímicos de defesa ao PepYMV em pimenta, destaca-se o de Gonçalves et al., (2013) que registraram um aumento na expressão de peroxidases de *C. baccatum* quando inoculadas com o vírus, indicando um possível envolvimento de proteínas PR-9 no mecanismo de defesa dessas plantas. Não existem relatos a respeito de inibidores de proteases associados ao PepYMV em *Capsicum baccatum*. Entretanto, alguns trabalhos de caracterização e isolamento de inibidores de tripsina em pimenta têm sido conduzidos (Ribeiro et al., 2012; Ribeiro et al., 2013; Dias et al., 2013). Estes trabalhos compreendem estudos bioquímicos em que não foi estabelecido contato prévio da planta com o patógeno.

O objetivo desse trabalho foi detectar a presença de inibidores de proteases, especificamente inibidor de tripsina, em extratos de folhas de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (acesso UENF 1624) obtidos de plantas que foram ou não inoculadas com o patógeno PepYMV.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV)

A espécie *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), pertencente ao gênero *Potyvirus* e à família Potyviridae, foi originalmente descrita na década de 1980 após caracterização de isolados que quebravam a resistência de cultivares de pimentão resistentes ao *Potato Virus Y* (PVY) (Inoue-Nagata et al., 2002). A princípio, foi denominado PVY^M (Boiteux et al., 1996), posteriormente, estudos moleculares demonstraram que se tratava de uma nova espécie do gênero

Potyvirus, sendo denominado de PepYMV (*Pepper yellow mosaic virus*) (Nascimento et al., 2007; Inoue-Nagata et al., 2008; Moura et al., 2011).

Acredita-se que os isolados de PepYMV estejam ocupando o nicho que antigamente era ocupado pelo PVY, vírus que era responsável por inúmeros prejuízos em solánaceas (Lourenção et al., 2005). Cunha et al., (2004) verificaram que não ocorre reação cruzada em testes sorológicos entre o PVY e o PepYMV, o que demonstra estarem relacionados sorologicamente.

O PepYMV é o agente causal do mosaico amarelo, que representa a principal doença viral em pimentas (Lucinda et al., 2012). Os sintomas causados na planta incluem mosaico com tonalidade verde-amarelada, deformação foliar e dos frutos, e redução do porte e produtividade (Inoue-Nagata et al., 2008). Sua incidência é mais frequente no período em que a temperatura varia entre 18 e 22°C, quando a proliferação do vetor é maior. A ocorrência de PepYMV em plantios de tomate causou perdas de até 100% nos municípios da região serrana do Espírito Santo (Venda Nova do Imigrante, Vargem Alta e Domingos Martins) (Maciel-Zambolim et al., 2004; Ávila et al., 2004). Surtos epidêmicos também foram observados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal (Dianese et al., 2008).

O vírus é caracterizado por possuir partículas filamentosas e flexuosas cujo tamanho varia de 680-900 nm de comprimento por 11-13 nm de diâmetro (Ogawa et al., 2008). O genoma é composto por uma fita simples de RNA com 9.745 nucleotídeos (Lucinda et al., 2012). O PepYMV possui uma grande habilidade em infectar a célula, e por canais intercelulares, denominados plasmodesmos, rapidamente infectam as células adjacentes e subsequentemente outras partes da planta (infecção sistêmica). Os vírus podem ainda se dispersar mais rapidamente a longa distância via floema (Lee & Lu, 2011). Todos os membros da família Potyviridae são caracterizados por formar corpos de inclusão cilíndricos e alongados de natureza cristalina no citoplasma das células das plantas infectadas (Dianese et al., 2008).

O processo de infecção se inicia com a entrada de partículas virais no citoplasma da célula vegetal, tradução das proteínas virais, replicação do seu genoma em sequências repetitivas e formação de novas partículas virais (Hull, 2009). As proteínas capsidiais são de fundamental importância para o desenvolvimento da infecção viral, pois está relacionada aos movimentos célula-célula, a longa distância e na replicação viral. A sequência de aminoácidos

presentes na região codificadora para a proteína capsidial de PepYMV foi recentemente identificada (Moura et al., 2012).

Como controle, a resistência genética é o único meio seguro de se impedir que a doença se instale na lavoura e cause prejuízos aos produtores, sendo, portanto, importante a identificação de fontes de resistência e sua transferência para tipos comerciais (Juhász et al., 2008). Para o controle de qualquer virose são recomendados uso de mudas sadias, controle do inseto vetor, e evitar o plantio próximo a lavouras velhas de pimenta e pimentão, para diminuir o risco de infecção viral (Lopes & Santos, 1994).

Fontes de resistência genética ao PepYMV no gênero *Capsicum* têm se mostrado eficientes e duradouras em condições de inoculação artificial e em nível de campo (Caranta et al., 1999; Echer & Costa, 2002; Nascimento et al., 2007). A resistência genética ao PepYMV no Brasil se baseia na utilização de híbridos de pimentão como 'Magali R', 'Rubia R' e 'Natalie' (Gioria et al., 2009). Porém, no Estado de São Paulo existe pelo menos um relato de um isolado de PepYMV capaz de causar sintomas de mosaico nos híbridos 'Magali R' e em 'Rubia R' (Gioria et al., 2009). Além disso, não existem informações sobre cultivares comerciais de pimentas resistentes ao PepYMV no Brasil.

Alguns estudos genéticos para a espécie de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* visando resistência ao PepYMV foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento de *Capsicum* da UENF. Bento et al., (2009) avaliaram 127 acessos de *Capsicum* do banco de germoplasma da UENF, quanto à resistência ao vírus. Dentre estes, foram encontrados nove acessos resistentes, dos quais dois eram de *C. baccatum* var. *pendulum*, e sete de *Capsicum chinense*. Gonçalves et al., (2011) avaliaram as características agronômicas e de resistência ao PepYMV na espécie *C. baccatum* var. *pendulum*, e identificaram as combinações UENF 1629 X UENF 1732, UENF 1616 X UENF 1732 e, UENF 1624 X UENF 1639 como promissoras para dar início a um programa de melhoramento, pois reúnem características agronômicas favoráveis e de resistência ao PepYMV. Gonçalves et al., (2013) registraram um aumento na expressão de peroxidases em plantas de *C. baccatum* var. *pendulum* inoculadas com PepYMV, o que indica um possível envolvimento de proteínas PR-9 no mecanismo de defesa dessas plantas.

3.2.2.2. Inibidores de proteases

Os inibidores de proteases vegetais são proteínas ou peptídeos, cuja massa molecular varia entre 4 e 85 kDa. São capazes de interagir específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, promovendo a inibição competitiva das mesmas (Jamal et al., 2012).

Inibidores de proteases são geralmente proteínas que estão presentes em abundância em órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas, concentrando-se principalmente em sementes e órgãos de reserva. O conteúdo desses inibidores varia de 1 a 10% do total de proteínas solúveis das plantas (Macedo et al., 2011). Os inibidores são caracterizados por serem moléculas estáveis, resistentes ao calor, variações de pH e a proteólise, presentes no meio intra e extracelular (Habib & Fazili, 2007).

De acordo com Ryan (1990) em plantas existem entre oito a dez famílias de inibidores de proteases, sendo que estas são classificadas de acordo com a massa molecular, homologia na estrutura primária e classe de enzimas que inibem. De acordo com as enzimas que inibem são denominados: inibidores de serinoproteases, de metaloproteases, de cisteinoproteases e proteases ácidas (Richardson, 1977; Macedo et al., 2007).

As famílias de inibidores de proteases encontradas em plantas são: inibidor de tripsina da soja (Kunitz), inibidor Bowman-Birk, inibidor de tripsina da cevada, inibidores I e II da batata, inibidor da abóbora, inibidor bi-funcional do milho, inibidor da carboxipeptidase A e B, inibidor de cisteína protease e inibidor aspartil protease (Norton, 1991). A maioria dos inibidores possui sua sequência completa de aminoácidos já descrita e muitos genes envolvidos na determinação de sua estrutura (Tamhane et al., 2009).

O primeiro relato de inibidor de protease detectado em plantas ocorreu em 1938, por Read e Haas, e os primeiros trabalhos estavam relacionados à nutrição animal. Proteínas utilizadas na dieta animal tinham efeitos deletérios e foram inicialmente denominadas de fatores antinutricionais. Entretanto, somente em 1976, inibidores de tripsina e quimiotripsina foram bem isolados de sementes de soja, feijão e batata, sendo observada uma pequena supressão da atividade de proteases secretadas por *Fusarium solani* (Mosolov et al., 1976).

Os inibidores são metabolicamente importantes em decorrência de algumas funções que exercem nas plantas, podendo atuar de maneira constitutiva ou induzida, no mecanismo de defesa contra o ataque de insetos, fungos, bactérias e vírus, como fonte de aminoácidos sulfurados, na regulação de proteases endógenas, e como sinais de respostas às condições ambientais estressantes de caráter biótico ou abiótico (Calderon et al., 2010; Bariani et al., 2012).

Em vegetais, inibidores de proteases atuam suprimindo a atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos. Embora o papel de inibidores de proteases nas interações planta-microrganismo ainda não seja claro, supõe-se que retardem a proteólise das paredes celulares e de proteínas de membrana, dificultando a invasão de patógenos (Mosolov & Valueva, 2006).

Dentre os diferentes tipos de inibidores, os de tripsina, que pertencem à família de inibidores de serinoproteases, concentram o maior número de pesquisas em vegetais, sendo as famílias Solanaceae, Fabaceae e Graminae as mais estudadas quanto à atividade de inibidores (Macedo et al., 2009).

Segundo Jamal et al., (2012), a classe das enzimas serinoproteases é a mais numerosa e amplamente distribuída entre os vírus, procariotos e eucariotos, sugerindo sua importância vital para todos esses organismos. Em relação aos vírus, ainda há poucas informações sobre as potencialidades dos inibidores proteolíticos. Sabe-se que possuem amplas concentrações de serinoproteases, cisteínoproteases e proteases ácidas, que estão envolvidas no processamento das proteínas constituintes da cápsula viral.

Alguns trabalhos sobre caracterização e isolamento de inibidores de proteases em *C. annuum* estão disponíveis na literatura (Antcheva et al., 1996; Moura & Ryan, 2001; Tamhane et al., 2005; Tamhane et al., 2007; Tamhane et al., 2009; Mishra et al., 2012; Ribeiro et al., 2011; Ribeiro et al., 2013). Dois inibidores de proteases foram purificados a partir de folhas de *Capsicum annuum*, CapA1 e CapA2, observando-se sua atividade *in vitro* e *in vivo* inibitória das proteases de *Helicoverpa armigera*. Os inibidores possuíam massa molecular de 12 kDa, com atividade inibitória da tripsina (68 a 91%) e quimiotripsina (39 a 85%) bovina. Estimou-se uma inibição de 60 a 80% das proteases produzidas pelo patógeno (Tamhane et al., 2005).

Em *Capsicum*, poucos estudos têm sido realizados em tecidos foliares, a maior parte é realizada em órgãos de estocagem, sobretudo em sementes. Contudo, são as folhas os órgãos mais suscetíveis ao ataque de patógenos e pragas, por ser o órgão mais exposto. Segundo Macedo et al., (2011) a maioria dos trabalhos de inibidores de serinoproteases são isolados a partir de sementes em inúmeras espécies, concentrando-se nas famílias Leguminosae, Cucurbitaceae, Solanaceae e Graminae. Chevreuil et al., (2011) ressaltam a importância de se investigar a expressão de diferentes inibidores de tripsina e quimiotripsina no tecido foliar, visando contribuir para o melhor entendimento da interação planta- patógeno.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material Vegetal

Plantas de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* do acesso UENF 1624, resistente ao *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Bento et al., 2009), foram cultivadas em câmara de crescimento, com condições de temperatura controladas em 22°C, umidade de 80% e fotoperíodo de 16 horas (Figura 1). Após o desenvolvimento de dois pares de folhas definitivas, foram transferidas 112 plântulas para potes plásticos com capacidade para 1 L, contendo uma mistura de solo e substrato (2:1). Após 45 dias de plantio procedeu-se a inoculação do PepYMV.



Figura 1. Condução do experimento para obtenção de folhas de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* (acesso UENF 1624) resistentes ao PepYMV em câmara de crescimento, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.2.3.2. Procedimento de inoculação

Como fonte de inóculo foram utilizadas plantas de *Nicotiana debneyi* infectadas com o isolado 3 de PepYMV, obtido de planta de pimentão coletada no campo do município de Igarapé, estado de Minas Gerais, e gentilmente cedido pelo Professor Murilo Zerbini da Universidade Federal de Viçosa. A inoculação foi realizada via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05M, pH 7,2, contendo sulfato de sódio a 0,01% e utilizando carborundum (600 mesh) como abrasivo (Truta et al., 2004). As plântulas foram inoculadas no estágio de três ou quatro folhas definitivas sendo inoculadas as folhas mais jovens completamente expandidas. Como controle, 14 mudas foram inoculadas apenas com a solução tampão e abrasivo.

As plântulas controle e infectadas com *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) cresceram em sete tempos diferentes: 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144h. Nestes respectivos tempos, as folhas foram coletadas. As plântulas foram pesadas, obtendo-se 10 gramas de cada um dos diferentes tempos, e em seguida submetidas à maceração usando-se graal e pistilo a -4°C com a utilização de Nitrogênio líquido (N₂). O material macerado foi utilizado para o ensaio de inibidores de protease.

3.2.3.3. Extração de proteínas e quantificação

Cerca de 1 grama de tecido fresco macerado foi transferido para tubos de 15 mL e imersos em 4 mL de tampão contendo borato de sódio 10 mM e cloreto de sódio 0,125 M, de acordo com o protocolo de Leon et al., (2002), com modificações, descritas a seguir.

Os tubos contendo as amostras em 4 mL de tampão sem adição de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) permaneceram em agitação, em temperatura de 4°C por 3 horas. O material foi centrifugado a 8000 g por 10 minutos à 4°C. O precipitado foi descartado e coletado o sobrenadante em tubos de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante polietilenoglicol 14% triturado e fosfato hidratado de potássio a 8,5% (K_2HPO_4). Após 30 minutos observou-se a separação de duas fases, sendo coletada a parte inferior, que contém as proteínas solúveis.

As determinações quantitativas de proteínas foram feitas através do método do ácido bicinconínico, descrito por Smith et al., (1985), com modificações, sendo utilizada a ovalbumina (Sigma) como proteína padrão.

3.2.3.4. Cromatografia de fase reversa em HPLC

Uma cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 equilibrada com 0,1% de TFA foi empregada sequencialmente no processo de isolamento de proteínas com baixa massa molecular. As frações das amostras de 120 horas (inoculado e não inoculado) obtidas após cromatografia em coluna C2/C18 foi solubilizada em TFA 0,1% e 200 μ L (150 μ L + 50 μ L TFA) desta mistura foram injetados na coluna. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, numa temperatura de 33°C em sistema de HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). Para a eluição das proteínas da coluna, foi feito um gradiente de ACN (0-80%). Inicialmente, nos 10 primeiros minutos, a coluna foi lavada com TFA 0,1% em água ultrapura (Solução A) e, em seguida, um gradiente foi sendo formado, pela mistura da solução A e 80% de ACN em TFA 0,1% (Solução B), por cerca de 80 min. Após este período, a coluna foi lavada com 100 % da solução B totalizando 60 min. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo as absorvâncias lidas a 220

nm. Posteriormente, foi realizada uma recromatografia das amostras coletadas a partir dos picos de 120 horas não retidos (saem antes do início do gradiente de acetonitrila) das plantas inoculadas e controle.

3.2.3.5. Ensaio de inibição de tripsina

A atividade inibitória da protease foi determinada medindo-se a atividade hidrolítica residual da tripsina através do uso do substrato BApNA (estoque 5 mM). A atividade proteolítica foi medida pelo uso de um peptídeo sintético derivado da *p*-nitroanilida em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a 37 °C por 30 minutos, num volume final de 200 mL. Foi utilizado um controle em triplicata para os diferentes tempos de inoculação, contendo apenas substrato BApNA e Tris-HCl 50 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 mL de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorvância de *p*-nitroanilida liberada a 405 nm (Adaptado de Macedo et al., 2007). Os resultados mostrados são média de três ensaios, como descrito por Macedo et al., (2007). O percentual de inibição da tripsina foi calculado a partir das leituras do controle da enzima e das amostras testadas. Os resultados foram expressos em termos de percentual de atividade inibitória.

3.2.3.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram realizadas análises de variância simples (ANOVA). Foi utilizada a média de três ensaios para os diferentes tempos estudados. Esta análise teve por objetivo verificar se houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, nas diferentes quantidades de amostra (extratos de *C. bacatum*) utilizadas. Em seguida, as médias foram comparadas pelo Teste t a 1% de probabilidade.

3.2.3.7. Eletroforese em gel de tricina

A eletroforese em gel de Tricina-PAGE foi feita segundo método de Schaggner e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mn. Uma fração de 17 µl de cada uma das amostras

contendo quantidades conhecidas de proteínas foram adicionadas a um volume de 5,5 μl de água, 1,25 μl β -mercaptoetanol 5%, e 6,25 μl de tampão de amostra (glicerol 10%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidas por cinco minutos, centrifugadas por igual período e posteriormente aplicadas no gel.

Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de solução estoque de acrilamida 30%, mantida em refrigeração em geladeira (10°C) em frasco âmbar. O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8, e o gel de separação 15%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, sendo acrescentados a ambos SDS 10%. A polimerização foi conseguida pela adição de TEMED (tetrametiletilenodiamino) e APS 10% (persulfato de amônio). Os géis foram submetidos a uma corrente de 25 V *overnight*. Como padrão de bandas foram utilizados marcadores de baixo peso molecular.

Os tampões de corrida utilizados foram o catodo (Tris 0,5 M; Tricina 0,3 M e SDS 5 %) e o anodo (Tris 5 M), pH 8,9. Após a corrida, os géis foram retirados das placas, e revelados por prata segundo a técnica descrita por Morrissey (1998), com modificações, descritas a seguir.

3.2.3.8- Revelação do gel com nitrato de prata

O gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e submetido aos seguintes procedimentos: incubado por 40 minutos em uma solução contendo 4 mL de ácido acético 10%, 16 mL de etanol absoluto e 20 mL de água ultrapura, e então lavado em água ultrapura por 5 minutos. Logo após, foi incubado em uma segunda solução (8mL de glutaraldeído 25% e 32 mL de água ultrapura) por 20 minutos, e lavado novamente em água ultrapura por duas vezes de 10 minutos cada. No passo seguinte, o gel foi colocado em uma solução contendo 24 mL de etanol absoluto e 96 mL de água ultrapura por 20 minutos. Posteriormente incubado em uma mistura (20 mL de etanol absoluto, 1mL de nitrato de prata, 1 mL de hidróxido de amônio, 5 mL de hidróxido de sódio, e 73 mL de água ultrapura) por 20 minutos. A seguir, o gel foi colocado em uma solução reveladora até a obtenção da coloração desejada (visualização das bandas), e esta foi constituída por 20 mL de etanol absoluto, 100 μl de formaldeído, 25 μl de ácido acético 2,3 M e 80 mL de água ultrapura. Para fixação o gel foi imerso durante 10

minutos em uma solução formada por 5 mL de ácido acético 10%, 0,5 mL de glicerol e 44,5 mL de água ultrapura.

3.2.3.9. Análise da sequência de aminoácidos

As proteínas foram separadas por uma cromatografia de coluna de fase reversa em coluna C2/C18. As amostras obtidas foram armazenadas a -4°C, as amostras aplicadas em gel e as bandas de interesse submetidas à análise de sequência dos aminoácidos. Para determinação da sequência N-terminal das respectivas bandas foi utilizado um sequenciador de proteína modelo Shimadzu PSQ-23A (*Shimadzu, Kyoto, Japan*).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de atividade enzimática residual de tripsina demonstrou que os extratos foliares de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* coletados em diferentes tempos possuem inibidores de serinoproteases. Houve inibição da atividade da tripsina tanto para amostras que foram inoculadas com o PepYMV, quanto para aquelas que não foram inoculadas (Figura 2), o que sugere que a resistência ao patógeno seja constitutiva. Segundo Prasad et al., (2010), inibidores de proteases são geralmente sintetizados de forma constitutiva durante o desenvolvimento normal das plantas ou podem ainda, ser expressos em resposta ao ataque de patógenos.

Hartl et al., (2010) ao examinarem o perfil de inibidores de proteases de *Solanum nigrum*, planta de potencial fitoterápico pertencente à família Solanaceae, detectaram presença de altos níveis constitutivos de inibidores de tripsina, tanto para as plantas expostas ao *Spodoptera exigua* quanto para aquelas que não tiveram contato com o mesmo. Foi constatado que os inibidores intrínsecos à planta possivelmente afetam o crescimento larval da praga, representando um possível mecanismo natural de defesa da planta contra insetos herbívoros.

Kim et al., (2005) observaram ação antifúngica e antibacteriana em um inibidor de tripsina isolado de *Solanum tuberosum*. Elevadas concentrações do inibidor foram detectadas naturalmente nos tubérculos de batata, ou seja, mesmo quando não estavam expostas ao patógeno. Resultados divergentes foram obtidos por Bar-Ziv et al., (2012) que constataram indução da síntese de inibidores de protease em tomate como mecanismo de defesa contra inúmeros patógenos, incluindo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que é considerada a doença viral mais destrutiva para a cultura. Quando não havia exposição ao patógeno o quantitativo de inibidor detectado era mínimo.

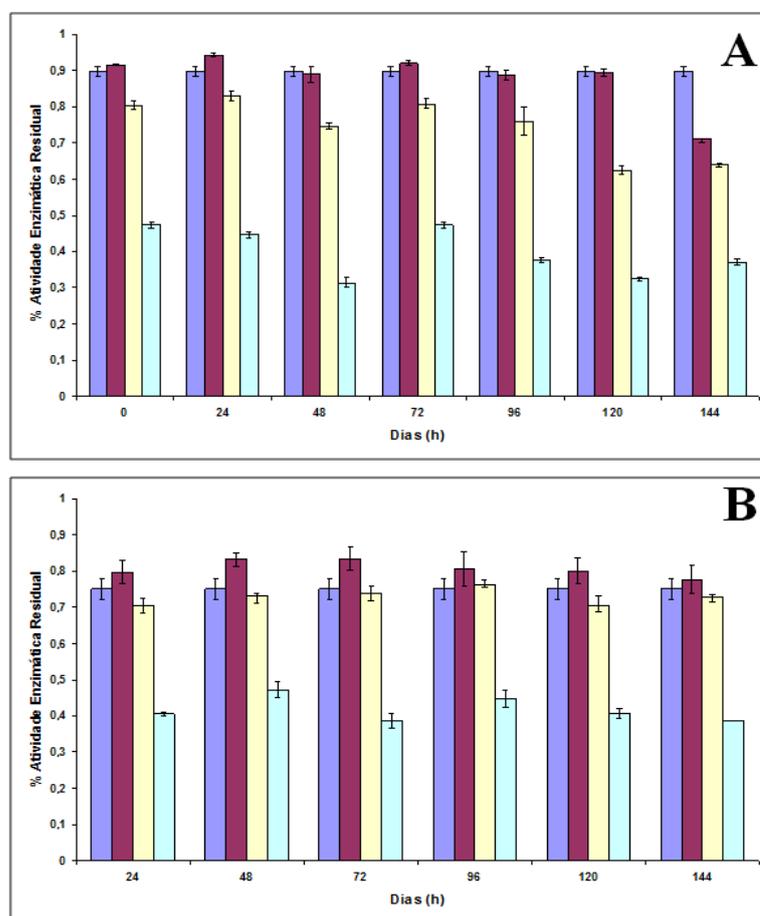


Figura 2. Atividade enzimática residual de tripsina dos extratos obtidos das plantas de *C. baccatum* var. *pendulum* cultivadas em câmara de crescimento. Concentrações crescentes dos extratos foram adicionadas a uma concentração fixa da tripsina (10 mg). A atividade enzimática residual foi determinada na presença do substrato BApNA (5 mM). Cada ponto representa a média de três ensaios independentes. (A) Folhas não inoculadas com o vírus. (B) Folhas inoculadas com o vírus. (■) Tripsina; (■) 1 µL extrato; (■) 5 µL extrato e (■) 25 µL extrato.

Com relação às concentrações dos extratos foliares utilizados nos ensaios de atividade enzimática residual de tripsina (1 μ L, 5 μ L, 25 μ L), foi observado que a atividade inibitória sobre a tripsina foi maior quanto maior o quantitativo de extrato utilizado. Nas análises realizadas por Bariani et al., (2012) verificou-se que a atividade inibitória da tripsina não foi alterada significativamente entre as diferentes concentrações (1, 9 e 12 μ g) de extratos foliares de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* utilizadas.

Em *Capsicum*, poucos estudos para inibidores de proteases têm sido feitos em tecidos foliares, tendo a maior parte sido feita em órgãos de estocagem, sobretudo em sementes. Contudo, as folhas são os órgãos mais suscetíveis ao ataque de patógenos e pragas, por serem mais expostas. Segundo Macedo et al., (2011) a maioria dos trabalhos de inibidores de serinoproteases são isolados a partir de sementes em inúmeras espécies, concentrando-se nas famílias Leguminosae, Cucurbitaceae, Solanaceae e Graminae. Chevreuil et al., (2011) ressalta a importância de se investigar a expressão de diferentes inibidores de tripsina e quimiotripsina no tecido foliar, visando contribuir para o melhor entendimento da interação planta- patógeno.

Os extratos proteicos de folha de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* inoculados e não inoculados com PepYMV dos diferentes tempos de coleta da câmara de crescimento foram aplicados em gel de Tricina-SDS-Page e foi obtido o mesmo padrão eletroforético para as plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 3), o que corrobora com o resultado obtido nos ensaios de atividade enzimática residual de tripsina, indicando uma resistência constitutiva. Dessa forma, a análise do gel SDS-PAGE revelou perfis proteicos similares para as plântulas inoculadas com PepYMV e controle nos diferentes tempos de estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Gonçalves et al., (2013) que ao avaliarem o perfil de géis SDS-PAGE para quitinases e proteínas transportadoras de lipídeos (LTP) em plântulas de *C. baccatum* inoculadas com PepYMV e não inoculadas obtiveram perfis proteicos similares para os diferentes tempos de inoculação.

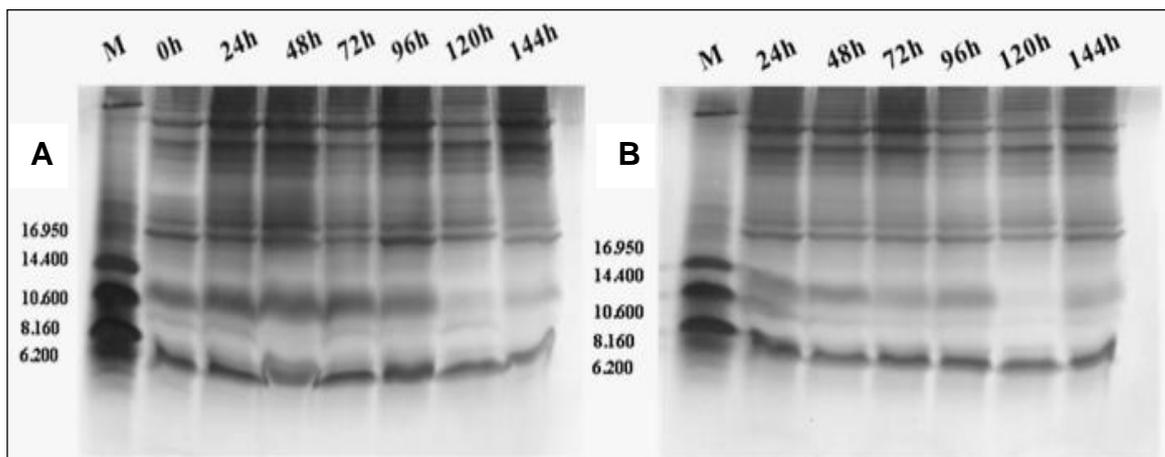


Figura 3. Eletroforese em Gel de Tricina-SDS-PAGE dos diferentes tempos de coleta dos extratos de folha de *C. bacatum* var. *pendulum*. (A) Folhas não inoculadas com o vírus (PepYMV). (B) Folhas inoculadas com o vírus (PepYMV). (M) Marcador de baixo peso.

O teste t aplicado (Figura 4) demonstra que nas condições de câmara de crescimento inicialmente no tempo de 0 horas a inibição da atividade da tripsina estava equiparada, no tempo de 24 horas os extratos das plantas inoculadas tiveram uma redução na taxa de inibição da tripsina quando comparado as plantas controle no mesmo tempo. De forma geral, nos tempos seguintes a taxa de inibição da atividade enzimática ficaram próximas ou se igualaram entre as plantas inoculadas e controle, modificando-se no tempo de 144 horas no caso A (1 μ L do extrato), e no tempo de 120 horas nos casos B e C (5 μ L e 25 μ L de extrato, respectivamente). Nestes últimos tempos a atividade da enzima foi mais inibida nos extratos de plantas inoculadas, sugerindo um envolvimento dos inibidores de tripsina em resposta ao PepYMV. Essa resposta é coerente com o esperado da interação planta-patógeno, uma vez que a planta requer um determinado tempo para mediar a resposta de defesa bioquímica.

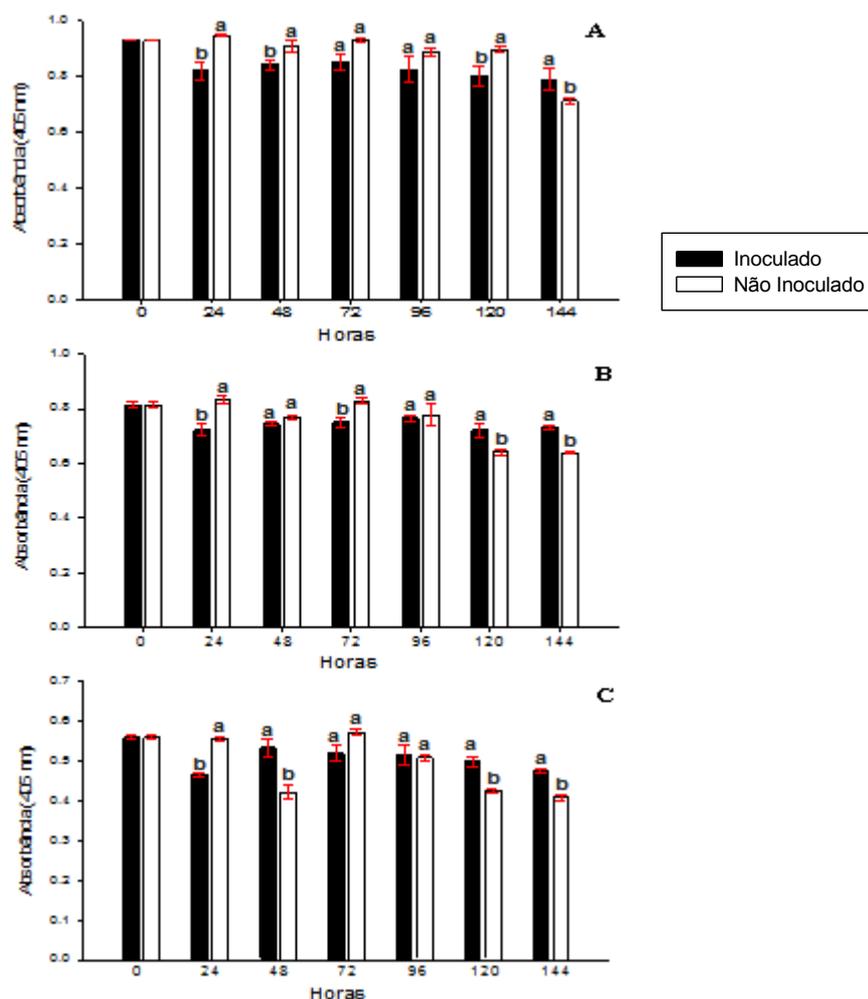


Figura 4. Teste t aplicado ao nível de 1% para avaliar a inibição da atividade enzimática de acordo com as diferentes concentrações de extratos foliares utilizadas (1, 5 e 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$). (A) Tripsina + 1 μL amostra; (B) Tripsina + 5 μL amostra; e (C) Tripsina + 25 μL amostra. Controle (Absorbância: $0,9143 \pm 0,0586$). As barras representam os desvios padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t a 1%.

Como a alteração da inibição enzimática mais evidente foi verificada nos dois últimos tempos de cultivo, foram selecionados extratos proteicos de *C. baccatum* var. *pendulum* do tempo de 120 horas inoculado e não inoculado com PepYMV, para serem submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 (Figura 5), resultando em um pico (Cb-R2) para o extrato não inoculado com PepYMV e em dois picos (Cb-R2' e Cb-R3') para o extrato inoculado com vírus. Nos dois cromatogramas, foi observado um pico não retido com alta absorbância em 220 nm (Cb-R1 e Cb-R1') que sai antes do início do gradiente de acetonitrila. Este pico normalmente retém os pigmentos vegetais.

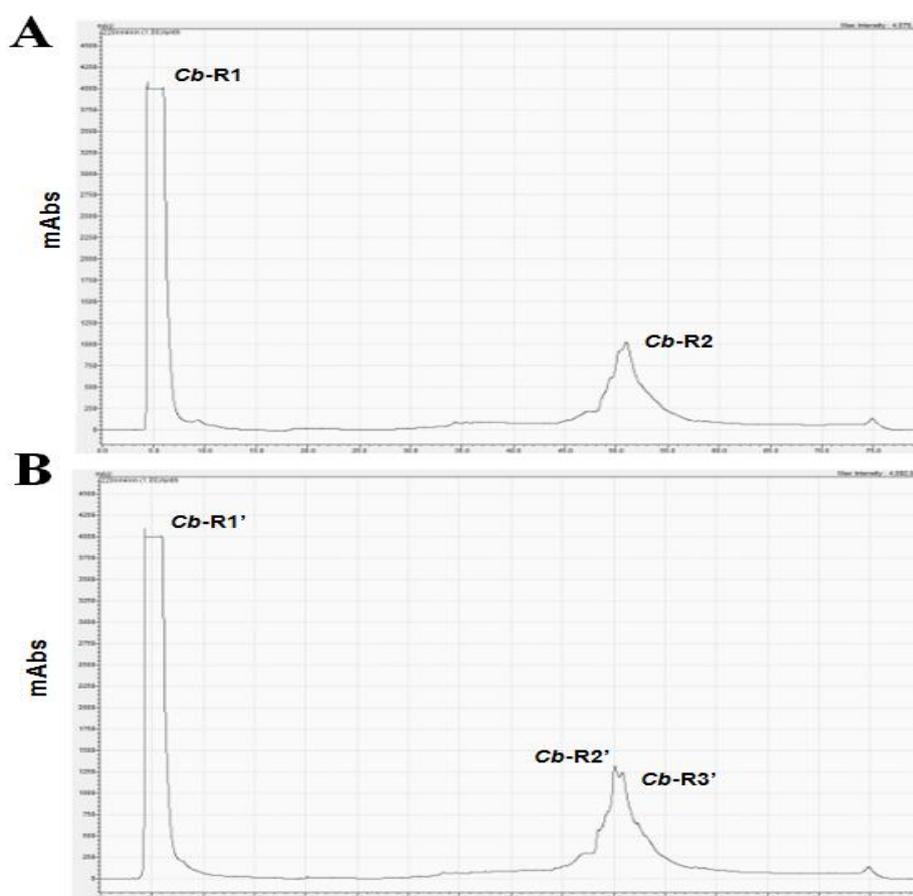


Figura 5. Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 do extrato total obtido após extração de folhas coletadas com 120 horas de crescimento. (A) Extrato total não inoculado com o vírus (PepYMV). (B) Extrato total inoculado com o vírus.

A partir dos picos Cb-R2, Cb-R2' e Cb-R3' obtidos dos extratos das folhas coletadas no tempo de 120 horas foi feito um gel de tricina SDS-PAGE (Figura 6), no qual foi observado um perfil proteico em que as proteínas presentes em Cb-R2 correspondiam aquelas observadas para a soma das proteínas obtidas para Cb-R2' e Cb-R3', o que possibilitou concluir que o inibidor de tripsina não estava nessas frações. Bariani et al., (2012) ao investigar a presença de inibidores de tripsina em extratos proteicos de *C. ferrea* e *S. polyphylla*, também obtiveram três picos distintos (PI, PII e PIII) em uma cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100, resultando em frações com baixa atividade inibitória sobre a tripsina.

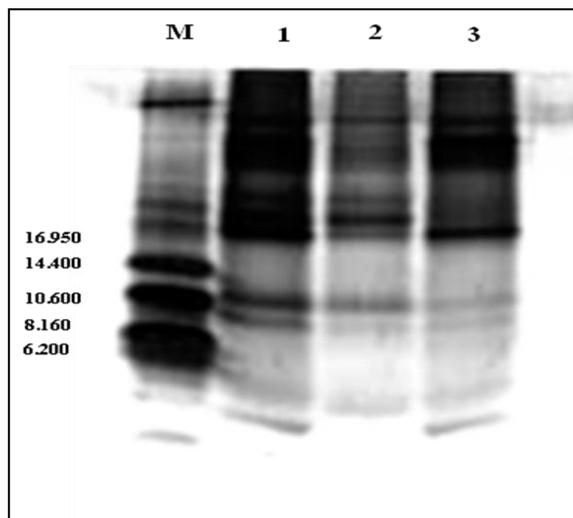


Figura 6. Eletroforese em gel de Tricina SDS-PAGE das frações obtidas após cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 do extrato total obtido após extração de folhas com 120 horas de crescimento. (M) refere-se ao marcador de massa molecular (kDa); (1) refere-se ao pico denominado *Cb-R2* obtido em coluna C2/C18 do extrato não inoculado; (2) refere-se ao pico denominado *Cb-R2'* obtido em coluna C2/C18 do extrato inoculado e, (3) refere-se ao pico denominado *Cb-R3'* obtido em coluna C2/C18 do extrato inoculado.

Para identificar em qual fração estava a atividade inibitória sobre a tripsina os picos obtidos antes do início do gradiente de acetonitrila foram submetidos a um ensaio de atividade enzimática de tripsina e detectou-se que o inibidor da atividade da tripsina estava presente nas frações coletadas a partir dos picos não retidos (Figura 7), enquanto nos três picos retidos não foi verificada inibição da atividade da tripsina. As frações obtidas a partir do pico não retido inoculado com PepYMV e pico não retido não inoculado com vírus foram recromatografadas (Figura 8) para purificação das proteínas, sendo obtido um pico *Cb-R2* para o extrato não inoculado com PepYMV e em um pico *Cb-R2'* para o extrato inoculado com vírus. Nos dois cromatogramas, foi observado um pico não retido com alta absorbância em 220 nm (*Cb-R1* e *Cb-R1'*) que sai antes do início do gradiente de acetonitrila.

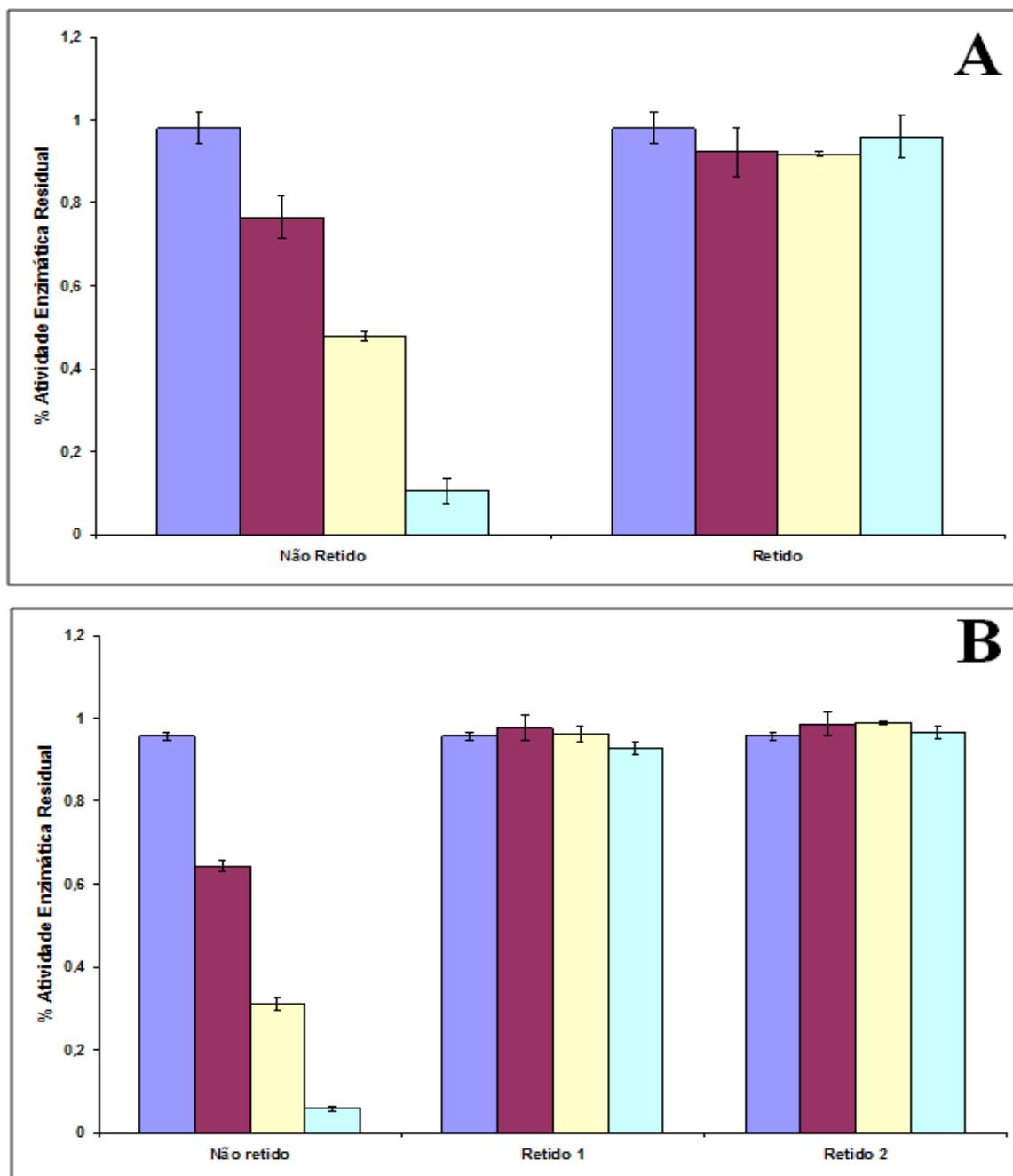


Figura 7. Atividade enzimática residual de tripsina dos extratos do tempo de 120 horas de cultivo das frações não retidas e retidas. Concentrações crescentes das frações obtidas após cromatografia em coluna C2/C18 do extrato total obtido após extração de folhas com 120 horas de crescimento, foram adicionadas a uma concentração fixa da tripsina (10 mg). A atividade enzimática residual foi determinada na presença do substrato BApNA (5 mM). Cada ponto representa a média de três ensaios independentes. (A) Folhas não inoculadas com o vírus. (B) Folhas Inoculadas com o vírus. (■) Tripsina; (■) 20 μ L extrato; (■) 40 μ L extrato e (■) 80 μ L extrato.

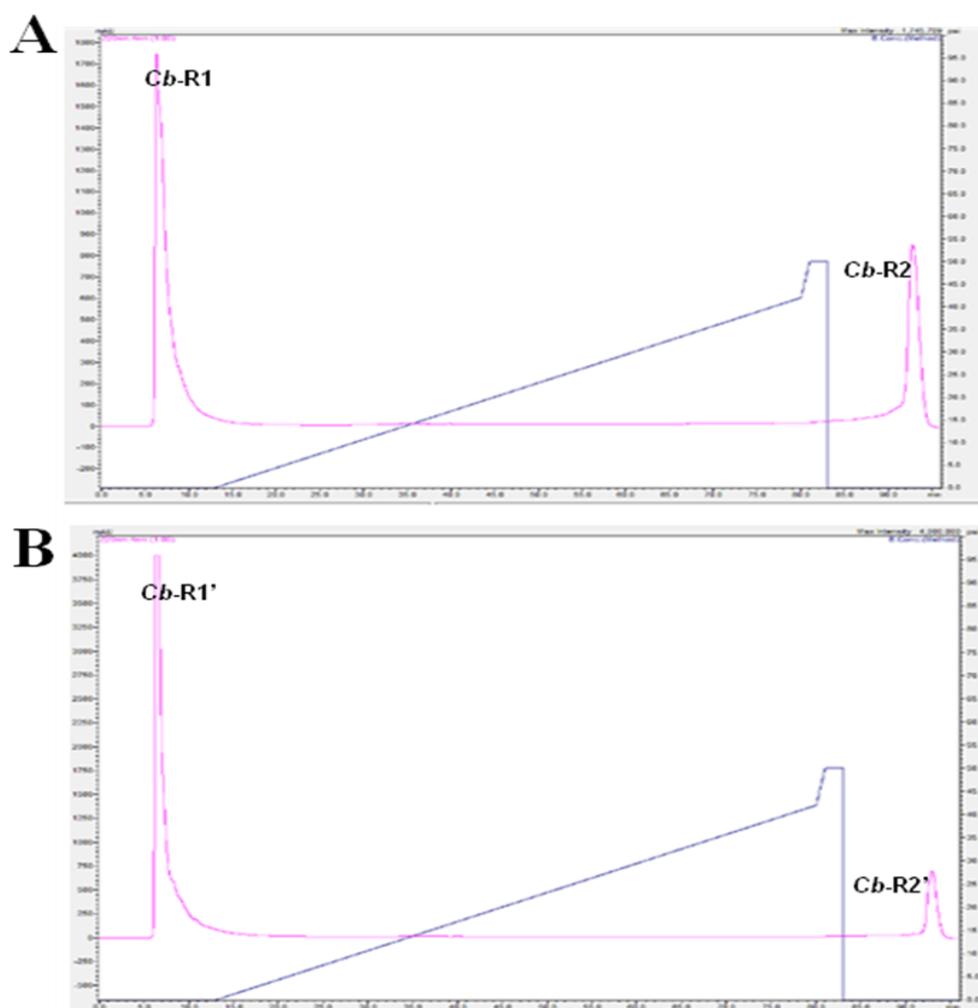


Figura 8. Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 do extrato obtido no pico não retido do tempo de 120 horas de cultivo. (A) Extrato não inoculado com o PepYMV. (B) Extrato inoculado com o vírus.

O gel de tricina-SDS-PAGE obtido (Figura 9) a partir das frações recromatografadas demonstrou um perfil completamente diferente entre extrato do pico retido (Cb-2 e Cb-2') e o do pico não retido (Cb-1 e Cb-1'), que saiu após o gradiente de acetonitrila, indicando que o inibidor de tripsina está presente possivelmente na fração não retida. Devido à presença de bandas de baixa massa molecular detectadas nas raias referentes aos picos não retidos, sugere-se que essas bandas sejam possivelmente inibidoras de tripsina nos extratos avaliados, uma vez que têm massas moleculares que correspondem às descritas na literatura.

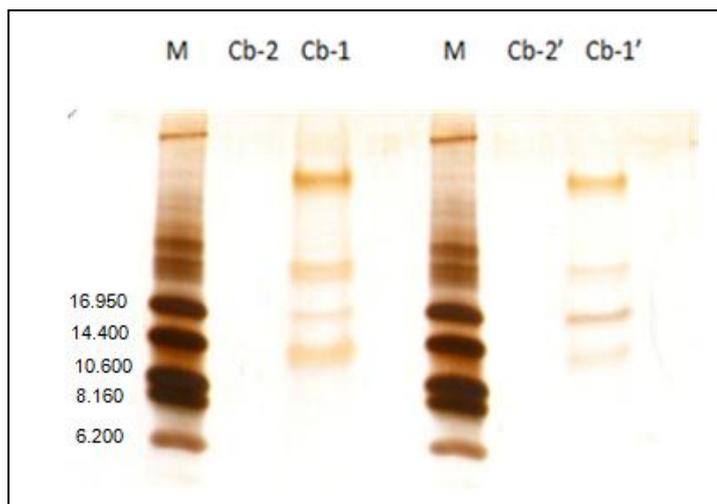


Figura 9. Eletroforese em gel de tricina dos extratos obtidos a partir da coleta do pico retido e pico não retido da cromatografia do tempo de 120 horas. (Cb-2) pico retido extrato não inoculado, (Cb-1) pico não retido extrato não inoculado, (Cb-2') pico retido extrato inoculado, e (Cb-1') pico não retido extrato inoculado; (M) Marcador de massa molecular em kDa.

A sequência N-terminal das bandas Cb-1 e Cb-1', obtida no gel de tricina-SDS-PAGE, que têm massa molecular em torno de 10 e 14 kDa, foi avaliada. As bandas Cb-1 e Cb-1' mostraram as seguintes sequências: GFPLLNGPDQDQGDFIMFG e, GFKGEQGVPQEMQNEQATIP, respectivamente. A análise da sequência N-terminal das bandas Cb-1 e Cb-1' não revelou homologia com nenhuma das sequências de inibidores de tripsina conhecidas, entretanto todas essas foram isoladas de sementes. Dias et al., (2013) ao estudarem a espécie *Capsicum chinense* isolaram um inibidor desse mesmo tipo, cuja massa molecular dos peptídeos revelados foi de 5 e 8 kDa, e as sequências N-terminal foram respectivamente: GICTNCCAGRKGCNYFSAD e QICTNCCAGRKGCNYYSAD. Ribeiro et al., (2007) isolaram um inibidor de tripsina de *C. annuum* com aproximadamente 6 kDa de massa molecular e a seguinte sequência N-terminal foi obtida: SEPRNEPTEISYSVAPSVS.

Macedo et al., (2011) purificaram, caracterizaram e determinaram a estrutura primária parcial de um inibidor de tripsina isolado da família Sapindaceae. Ao realizarem uma análise em gel tricina-SDS-PAGE observaram uma proteína constituída por uma cadeia polipeptídica de 18 kDa. Yang et al., (2006) isolaram uma proteína com massa molecular de 18 kDa de *Psoralea corylifolia* L. e através do sequenciamento da região N-terminal, verificaram que

esta proteína tinha homologia com inibidores de tripsina de plantas, possuindo também ação antifúngica. Kim et al., (2005) isolaram um inibidor de protease em *Solanum tuberosum*, cuja massa molecular foi de 5,6 kDa.

Dois inibidores de proteases foram purificados a partir de folhas de *Capsicum annuum*, CapA1 e CapA2, observando-se sua atividade *in vitro* e *in vivo* inibitória das proteases de *Helicoverpa armigera*. Os inibidores possuíam massa molecular de 12 kDa, com atividade inibitória da tripsina (68 a 91%) e quimiotripsina (39 a 85%) bovina. Estimou-se uma inibição de 60 a 80% das proteases produzidas pelo patógeno (Tamhane et al., 2005).

Outros trabalhos de caracterização e isolamento de inibidores de proteases para o gênero *Capsicum* estão disponíveis na literatura (Antcheva et al., 1996; Moura & Ryan, 2001; Tamhane et al., 2007; Tamhane et al., 2009; Mishra et al., 2012). Entretanto, não há inibidores de proteases descritos para *C. baccatum* tampouco associados a mecanismo de defesa na interação *C.baccatum*-PepYMV, sendo esse estudo pioneiro na análise de padrões proteicos associados a esses inibidores na espécie.

3.2.5. CONCLUSÕES

Os resultados possibilitam afirmar que inibidores de tripsina são sintetizados constitutivamente nos tecidos foliares de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, sendo obtidas bandas possivelmente associadas a esses inibidores. Entretanto, maior caracterização dos inibidores em *C. baccatum* deve ser feita com base no material obtido neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B.D. (2007) Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties. *Nutrition and Food Science*, 37:178-183.
- Ahmed, S.M. (2013) Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in the evaluation of genetic polymorphism of Egyptian *Capsicum* L. hybrids. *African Journal of Biotechnology*, 12:665-669.
- 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.
- Albrecht, E., Zhang, D., Saftner, R.A., Stommel, R.J. (2012) Genetic diversity and population structure of *Capsicum baccatum* genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59:517–538.
- Alimi, N.A., Bink, M.C.A.M., Dieleman, J.A., Nicolai, M., Wubs, M., Heuvelink, E., Magan, J., Voorrips, R.E., Jansen, J., Rodrigues, P.C., Van der Heijden, G.W.A.M., Vercauteren, A., Vuylsteke, M., Song, Y., Glasbey, C., Barocsi, A., Lefebvre, V., Palloix, A., Eeuwijk, A.F. (2013) Genetic and QTL analyses of yield and a set of physiological traits in pepper. *Euphytica*, 190:181–201.
- Alzate-Marin, A.L., Cervigni, G.D.L., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2005) Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas

resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira* 30: 333-342.

Andrews, J. (1995) Peppers: the domesticated *Capsicum*. Austin: University of Texas Press. 170p.

Antcheva, N., Patthy, A., Athanasiadis, A., Tchorbanov, B., Zakhariiev, S., Pongor, S. (1996) Primary structure and specificity of serine protease inhibitor from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1298:95–101.

Ashrafi, H., Hill, T., Stoffel, K., Kozik, A., 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.

Asins, M.J., Bernet, G.P., Ruiz, C., Cambra, M., Guerri, J., Carbonell, E.A. (2004) QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:603-611.

Ávila, A.C., Inoue-nagata, A.K., Costa, H., Boiteux, L.S., Neves, L.O.Q., Prates, R.S., Bertini, L.A. (2004) Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*, 22:655-658.

Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., Lozano, M., García, M.A., Espinosa, V.M., Pérez, M. M. (2008) Quality characteristics of different red pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) for hot paprika production. *European Food Research and Technology*, 227:557–563.

Barbosa, G.E., Agra, M.F., Romero, M.V., Scaldaferrro, M.A., Moscone, E.A. (2011) New endemic species of *Capsicum* (Solanaceae) from the Brazilian Caatinga: comparison with the re-circumscribed *C. parvifolium*. *Systematic Botany*, 36:768-781.

Barbosa, G.E. (2011) Lectotypifications, synonymy, and a new name in *Capsicum* (Solanoideae, Solanaceae). *Phytokeys*, 2:23-38.

- Barchi, L., Bonnet, C., Boudet, P., Signoret, I., Nagy, S., Lanteri, A., Palloix, A., Lefebvre, V. (2007) A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. *Genome*, 50: 51–60.
- Barchi, L., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A.M., Lanteri, S., Palloix, A. (2009) QTL analysis of plant development and fruit traits in pepper and performance of selective phenotyping. *Theoretical and Applied Genetics*, 118:1157–1171.
- Bariani, A., Gonçalves, J.F.C., Chevreuil, L.R., Cavallazzi, J.R.P., Souza, L.A.G., Bentes, J.L.S., Pando, S.C. (2012) Purificação parcial de inibidores de tripsina de sementes de *Caesalpinia ferrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos proteicos sobre fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathologica*, 38:131-138.
- Bar-Ziv, A., Levy, Y., Hak, H., Mett, A., Belausov, E., Citovsky, V., Gafni, Y. (2012) The *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) V2 protein interacts with the host papain-like cysteine protease CYP1. *Plant Signaling & Behavior*, 7:983-989.
- Bento, C.S., Rodrigues, R., Zerbini Júnior, F.M., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2009) Sources of resistance against the *Pepper yellow mosaic virus* in chili pepper. *Horticultura Brasileira*, 27:196-201.
- Bento, C.S. (2012) Melhoramento de *Capsicum baccatum* var. *pendulum*: herança de caracteres agronômicos e resistência ao *Pepper yellow mosaic virus*. Tese, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 159p.
- Bento, C.S., Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Oliveira, H.S., Santos, M.H., Pontes, M.C., Sudré, C.P. (2013) Inheritance of resistance to Pepper yellow mosaic virus in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genetics and Molecular Research*, 12:1074.
- Ben Chaim, A., Paran, I., Grube, R.C., Jahn, M., van Wijk, R., Peleman, J. (2001) QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 102:1016–1028.
- Ben-Chaim, A., Borovsk, E., Rao, G.U., Tanyolac, B., Paran, I. (2003) Fs3.1: A major fruit shape QTL conserved in *Capsicum*. *Genome*, 46:1-9.

- Benko-Iseppon, A.M., Galdino, S.L., Calsa Jr, T., Kido, E.A., Tossi, T., Belarmino, L.C., Crovella, S. (2010) Overview on Plant Antimicrobial Peptides. *Current Protein Peptides Science*, 11:181-188.
- Bernardo, R. (2008) Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. *Crop Science*. 48:1649-1664.
- Bernatzky, R.B., Tanksley, S.D. (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*, 112:887-898.
- Bhering, L.L., Cruz, C.D. (2008) Tamanho de população ideal para mapeamento genético em famílias de irmãos completos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 43:379-385.
- Bhering, L.L., Cruz, CD., Vasconcelos, E.S., Resende Junior, M.F.R., Barros, W.S., Rosado, T.B. (2009) Efficiency of the multilocus analysis for the construction of genetic maps. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9: 308-312.
- Boiteux, L.S., Cupertino, F.P., Silva, C., Dusi, A.N., Monte-Nesich, D.C., Van Der Vlugt, R.A.A. (1996) Resistance to potato virus Y (pathotype 1–2) in *Capsicum annum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. *Euphytica*, 87:53–58.
- Borovsky, Y., Paran, I. (2011) Characterization of *fs10.1*, a major QTL controlling fruit elongation in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 123:657-665.
- Broman, K.W., Sen, S.A.A. (2009) Guide to QTL mapping with R/qlt.. New York: Springer, 396p.
- Buso, G.S.C., Brondani, R.P.V., Amaral, Z.P.S., Reis, A.M.M., Ferreira, M.E. (2000) Desenvolvimento de primers SSR para análise genética de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) utilizando biblioteca genômica enriquecida. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (*Boletim de Pesquisa Embrapa*).

- Büttow, M.V., Barbieri, R.L., Neitzke, R.S., Heiden, G., Carvalho, F.I.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões da Embrapa Clima Temperado. *Ciência Rural* [online], 40:1264-1269.
- Caixeta, E.T., Oliveira, A.C.B., Brito, G.G., Sakiyama, N.S. (2006) Tipos de Marcadores Moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. Marcadores Moleculares. Viçosa: UFV. Cap. 1, p. 9-78.
- Calderon, L.A., Almeida Filho, H.A., Teles, R.C.L., Medrano, F.J., Bolch Jr., C., Santoro, M.M., Freitas, S.M. (2010) Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon *Inga cylindrica* [Vell.] Mart. seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, 22:73 – 79.
- Caranta, C., Thabuis, A., Palloix, A. (1999) Development of a CAPS marker for the *Pvr4* locus: A tool for pyramiding potyvirus resistance genes in pepper. *Genomics*, 42:1111-1116.
- Carlier, J.D.D. Mapeamento genético do ananaseiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Universidade do Algarve. Tese, 37p.
- Carneiro, M.S., Vieira, M.L.C. (2002) Mapas genéticos em plantas. *Bragantia*, Campinas, 61:89-100.
- 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, S.I.C., Bianchetti, L.B., Bustamante, P.G., Silva, D.B. (2003) Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças (*Boletim de Pesquisa Embrapa*). Brasília, 49 p.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B. (2004) Sistema de Produção de Pimentas (*Capsicum* spp.): botânica. Embrapa Hortaliças, sistemas de produção. Disponível em: [HTTP://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botânica.htm](http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botânica.htm). Acesso em: 29 de agosto de 2013.

- Chen, M., Wei, C., Qi, J., Chen, X., Su, J., Li, A., Tao, A., Wu, W. (2011) Genetic linkage map construction for kenaf using SRAP, ISSR and RAPD markers. *Plant Breeding*, 130: 679–687.
- Chevreuril, L. R., Goncalves, J.F.C., Schimpl, F. C., Souza, C.S.C., Souza, L.A.G., Pando, S.C. (2011) Prospecção de inibidores de serinoproteases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. *Acta Amazônica*, 41(1):163 – 170.
- Chutimanitsakun, Y., Nipper, R. W., Cuesta-Marcos, A., Cistué, L., Corey, A., Filichkina, T., Johnson, E.A., Hayes, P.M. (2011) Construction and application for QTL analysis of a Restriction Site Associated DNA (RAD) linkage map in barley. *BMC Genomics*, 12:4-12.
- Coelho, A.S.G., Silva, H.D. (2002) Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs. Esalq, Piracicaba, 77p.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.
- Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions Royal Society*, 363:557-572.
- Costa, L.M., Moura, N.F., Marangoni, C., Mendes, C.E., Teixeira, A.O. (2010) Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:51-59.
- Cruz, D.M.R., Banci, C.A. (2008) Produção de mudas e plantio. In: Ribeiro, C.S.C de. Pimentas – *Capsicum*. Embrapa Hortalias, Brasília, p.73-79.
- Cunha, L.C.V., Resende, R.O., Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K. (2004) Distinct features of *Pepper yellow mosaic virus* isolates from tomato and sweetpepper. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, 29:663-667.

- Dias, G.B., Gomes, V.M., Morais, T.M.S., Zottich, U.P., Rabelo, G.R., Carvalho A.O., Moulin, M.M., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Cunha, M. (2013) Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research*, 23:222-232.
- Dias, G.B., Gomes, V.M., Zottich, U.P., Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., Machado, O.L., T., Fernandes, K.V.S., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Da Cunha, M. (2013) Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Protease Inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *The Protein Journal*, 32:15-26.
- Dianese, E.C., Resende, R.O., Inoue-Nagata, A.K. (2008) Alta incidência de *Pepper yellow mosaic virus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal. *Tropical Plant Pathology*. Brasília, 33:67-68.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Echer, M.M., Da Costa, C.P. (2002) Reação da pimenta doce ao vírus Y da Batata PVYm. *Scientia Agricola*, 59:8-13.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A., Caskey, C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, 49:746-756.
- Eshbaugh, W. H. (1970) A Biosystematic and Evolutionary Study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 22:31-43.
- FAO (2011) <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acessado em 04 de setembro de 2013.
- Fermi, C., Pernossi, L. (1984) Untersuchungen über die Enzyme. Vergleichendes Studie. *Z Hyg Infeektionskr*, 18:83-89.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 220p.

- Ferreira, A., da Silva, M.F., da Costa e Silva, L., Cruz, C.D. (2006) Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics Molecular Biology*, 29:182-192.
- Garcia, A.A.F., Kido, E.A., Meza, A.N., Souza, H.M.B., Pinto, L.R., Pastina, M.M., Leite, C.S., da Silva, J.A.G., Ulian, E.C., Figueira, A., Souza, A. (2006) Development of an integrated genetic map of a sugarcane (*Saccharum* spp.) commercial cross, based on a maximum-likelihood approach for estimation of linkage and linkage phases. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:298–314.
- Gebhardt, C., Ritter, T., Debener, U., Schachtschabel, B., Walkemeier, H., Uhrig., Salamini, F. (1989) RFLP analysis and linkage mapping of *Solanum tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 78:65-75.
- Geethanjali, S., Chen, K., Pastrana, D.V., Wang, J.F. (2010) Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. *Euphytica*, 173:85–97.
- Gioria, R. (2009) Breakdown of resistance in sweet pepper against *Pepper yellow mosaic virus* in Brazil. *Scientia Agricola*, 66:267-269.
- Gonçalves, L.S.A. (2010) Herança de caracteres agronômicos e da resistência ao Pepper yellow mosaic virus em *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 118p.
- Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Bento, C.S., Robaina, R.R., Amaral Júnior, A.T. (2011) Herança de caracteres relacionados à produção de frutos em *Capsicum baccatum* var. *pendulum* com base em análise dialélica de Hayman. *Revista Ciência Agronômica*, 43: 662-669.
- Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Diz, M.S.S., Robaina, R.R., Amaral Júnior, A.T., Carvalho, A.O., Gomes, V.M. (2013) Peroxidase is involved in Pepper yellow mosaic virus resistance in *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Genetics and Molecular Research*, 12:1411-1420.

- Gupta, M., Verma, B., Kumar, N., Chahota, R.K., Rathour, R., Sharma, S. K., Bhatia, S., Sharma, T.R. (2012) Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR, RAPD and SSR markers. *Journal of Genetics*, 91:279-287.
- Gutierrez, M.V., Vaz Patto, M.C., Huguet, T., Cubero, J.I., Moreno, M.T., Torres, A.M. (2005) Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 110:1210-1217.
- Habib, H., Fazili, K.M. (2007) Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2 (3):68-85.
- Haldane, J.B.S. (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics*, Bangarole, 8:299-309.
- Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T. (1982) A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:6465–6469.
- Hartl, M., Giri, A.P., Kaur, H., Baldwin, T. (2010) Serine Protease Inhibitors Specifically Defend *Solanum nigrum* against Generalist Herbivores but Do Not Influence Plant Growth and Development. *The Plant Cell*, 22:4158–4175.
- Hill, T. A., Ashrafi, H., Wo, R.C.S., Yao, J., Stoffel, K., Truco, J.M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Deynze, A.V. (2013) Characterization of *Capsicum annuum* Genetic Diversity and Population Structure Based on Parallel Polymorphism Discovery with a 30K Unigene Pepper GeneChip. *Plos One*, 8:1-16.
- Huang, S., Zhang, B., Milbourne, D., Cardle, D.L., Yang, G., Guo, J. (2001) Development of pepper SSR markers from sequence databases. *Euphytica*, 117: 163–167.
- Hull, R. (2009) *Comparative Plant Virology*. Elsevier Academic Press, second edition. San Diego CA, USA.

- Ince, A.G., Karaca, M., Onus, A.N. (2010) Genetic Relationships Within and Between Capsicum Species. *Biochemical Genetics*, 48:83–95.
- Inoue-Nagata, A.K., Fonseca, M.E.N., Resende, R.O., Boiteux, L.S., Monte, D.C., Dusi, A.N., Ávila, A.C., Van Der Vlugt, R.A.A. (2002) Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology*, 147:849-855.
- Inoue-Nagata, A.K., Fonseca, M.E.N., Lobo T.O.T.A., Ávila. A.C., Monte, D.C. (2008) Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3' untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 26:45-52.
- Jacob, H.J., Lindpaintner, K., Lincoln, S.E., Kusumi, K., Bunker, R. K., Mao, Y.-P., Ganten, D., Dzau, V.J., Lander, E.S. (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell*, Cambridge, 67:213-224.
- Jamal, F., Pandey, P.K., Singh, D., Khan, M.Y. (2013) Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemical Review*, 12:1–34.
- Jiang, G.L. (2013) Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. Plant Breeding from Laboratories to Fields. Capítulo 3, p.45-84. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/52583>.
- Joshi, R.R., Mishra, M., Suresh, C.G., Gupta, V.S., Giri, A.P. (2013) Complementation of intramolecular interactions for structural–functional stability of plant serine protease inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830: 5087–5094.
- Juhász, A.C.P., Silva, D.J.H., Zerbini Júnior, F.M., Soares, B.O., Carneiro, P.S.C., Cruz, C.D. (2008) Base genética da resistência de um acesso de tomate silvestre ao mosaico-amarelo do pimentão. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 43:713-720.

- Kang, B.C., Nahm, S.H., Huh, J.H., Yoo, H.S., Yu, J.W., Lee, M.H., Kim, B.D. (2001) An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F2 linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102:531–539.
- Kim, J.Y., Park, S.C., Kim, M.H., Lim, H.T., Park, Y., Hahm, K.S. (2005) Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 330:921-927.
- Kim, J.Y., Park, S.C., Hwang, I. (2009) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6):2860–2872.
- Kim, H.J., Han, J.H., Kim, S., Lee, H.R., Shin, J.S., Kim, J.H., Cho, J., Kim, Y.H., Lee, H.J., Kim, B.D., Choi, D. (2011) Trichome density of main stem is tightly linked to PepMoV resistance in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122:1051–1058.
- Kole, C., Olukolu, B.A., Kole, P., Rao, V.K., Bajpai, A., Backiyarani, S., Singh, J., Elanchezhian, R., Abbott, A.G. (2012) The First Genetic Map and Positions of Major Fruit Trait Loci of Bitter Melon (*Momordica charantia*). *Journal of Plant Science & Molecular Breeding*, 1:1-6.
- Kong, Q., Zhang, G., Chen, W., Zhang, Z., Zou, X. (2012) Identification and development of polymorphic EST-SSR markers by sequence alignment in pepper, *Capsicum annuum* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 99:59-61.
- Kosambi, D.D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Annuaire of Eugenetics*, 12:172-175.
- Kuleung, C., Baenziger, P.S., Dweikat, I. (2003) Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:1147–1150.

- Kumar, L. D., Kathirvel, M., Rao, G.V., Nagaraju, J. (2001) DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum*) using ISSR–PCR and FISSR–PCR marker assays. *Forensic Science International*, 116:63–68.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R., Pandey, B.K. (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal Southern*, 2(4):141-162.
- Lacape, J.M., Dessauw, D., Rajab, M. (2007) Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling a highly informative genotyping set of cotton SSRs. *Molecular Breeding*, Dordrecht , 19:45-58.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, E.E., Newburg, L. (1987) Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1:174-181.
- Lannes, S.D., Finger, F.L., Schuelter, A.R., Casali, V.W.D. (2007) Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Science Horticulturae*, 112:266–270.
- Lanteri, S., Acquadro, A., Comino, C., Mauro, R., Mauromicale, G., Portis, E. (2006) A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:1532–1542.
- Lee, J.M., Nahm, S.H., Kim, Y.M., Kim, B.D. (2004) Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 108:619–627.
- Lee, H.R., Cho, M.C., Kim, H.J., Park, S.W., Kim, B.D. (2008) Marker development for erect versus pendant-orientated fruit in *Capsicum annuum* L.. *Molecular Cells*, 26:548–553.

- Lee, H.R., Bae, I.H., Park, S.W., Kim, H.J., Min, W.K., Han, J.H., Kim, K.T., Kim, B.D. (2009) Construction of an integrated pepper map using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, and BAC end sequences. *Molecular Cells*, 27:21-37.
- Lee, H.R., Kim, K.T., Kim, H.J., Han, J.H., Kim, J.H., Yeom, S.I., Kim, H.J., Kang, W.H., Shi, J., Park, S.W., Bae, I.H., Lee, S., Cho, J., Oh, D., Kim, B.D. (2011) QTL analysis of fruit length using rRAMP, WRKY, and AFLP markers in chili pepper. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52(6):602–613.
- Lee, J.Y., Lu H. (2011) Plasmodesmata: The battleground against intruders. *Trends in Plant Science*, 16:201-210.
- Lefebvre, V., Palloix, A., Caranta, C. Pochard, E. (1995) Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome*, 38:112–121.
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J.C., Daubèze, A.M., Palloix, A. (2002) Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome*, 45:839–854.
- Lefebvre, V., Daubeze, A.M., Van der Voort, J.R., Peleman, J., Bardin, M., Palloix, A. (2003) QTL for resistance to powdery mildew in pepper under natural and artificial infections. *Theoretical and Applied Genetics*, 107:661–666.
- Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I.Y. (2002) Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Science*, 163:1011-1019.
- Lijun, O., Xuexiao, Z. (2012) Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. *African Journal of Biotechnology*, 11:752-757.
- Lim, T.K. (2013) Edible Medicinal and Non-medicinal plantas. *Capsicum baccatum var. pendulum*. Vol. 6, Cap. 23, 202p.

- Litt, M., Luty, J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, 44:397-401.
- Liu, B.H., Knapp, S. (1992) GMendel, a program for Mendelian segregation and linkage analysis of individual or multiple progeny population using log-likelihood ratios. *Journal of Heredity*, Washington, 8:407-418.
- Liu, B.H.(1998) *Statistical genomics*. New York: CRC, 610p.
- Livingstone, K.D., Lackney, V.K., Blauth, J.R., Van Wijk, R., Jahn, M.K. (1999) Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics*, 152:1183–1202.
- Lopes, C.A., Santos, J.R.M. (1994) Doenças do tomateiro. Embrapa – SPI, Brasília, DF, 61p.
- Lopes, C.A., Ávila, A.C. (2003) *Doenças do pimentão: diagnose e controle*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 96p.
- Lorieux, M., Ndjondjop, M.N., Ghesquière, A. (2000) A first interspecific *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 100:593–601.
- Lourenção, A.L., Siqueira, W.J., Melo, A.M.T., Palazzo, S.R.L., Melo, P.C.T., Colariccio, A. (2005) Resistência de cultivares e linhagens de tomateiros a *Tomato chlorotic spot virus* e a *Potato virus Y*. *Fitopatologia Brasileira*, 30:609-614.
- Lu, F.H., Kwon, S.W., Yoon, M.Y., Kim, K.T., Cho, M.C., Yoon, M.K., Park, Y.J. (2012) SNP Marker Integration and QTL Analysis of 12 Agronomic and Morphological Traits in F8 RILs of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecular Cells*, 34:25-34.
- Lucinda, N., Rocha, W.B., Inoue-Nagata, A.K., Nagata, T. (2012) Complete genome sequence of pepper yellow mosaic virus, a potyvirus, occurring in Brazil. *Archives of Virology*, 157:1397–1401.

- Macedo, M.L.R., Sá, C.M., Freire, M.G.M., Parra, J.R.P. (2004) A Kunitz-type inhibitor of Coleopteran proteases isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:2533–2540.
- Macedo, M.L.R., Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Richardson, M. (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68:1104–1111.
- Macedo, M.L.R., Pando, S.C., Chevreuril, L.R., Marangoni, S. (2009) Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein & Peptide Letters*, 16:1459-1465.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Franco, O.L., Migliolo, L., Oliveira, C.F.R. (2011) Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 158:164–172.
- Maciel-Zambolim, E., Costa, H., Capucho, A.S., Avila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., Kitajima, E.W. (2003) Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 29:325-327.
- Manly, K.F., Cudmore Jr, R.H., Meer, J.M. (2001) Map Manager QTX, crossplatform software for genetic mapping. *Mamm. Genome*, 12:930–932.
- Martinez, M.L., Vukasinovic, N., Freeman, A.E. (1999) Random model approach for QTL mapping in half-sib families. *Genetics Selection Evolution*, 31:319-340.
- Martins, K.C., Pereira, T.N.S., Souza, S.A.M., Costa, F.R. (2010) Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. *Ciência Rural* [online], 40:1746-1751.
- McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H. (1982) Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*, 36:361-368.

- Miklas, P.N., Johnson, W.C., Delorme, R., Gepts, P. (2001) QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. *Crop Science*, 41:309-315.
- Mimura, Y., Kageyama, T., Minamiyama, Y., Hirai, M. (2009) QTL analysis for resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Capsicum* accession 'LS2341'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78:307–313.
- Mimura, Y., Minamiyama, Y., Sano, H., Hirai, M. (2010) Mapping for axillary shooting, flowering date, primary axis length, and number of leaves in pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 79:56–63.
- Mimura, Y., Inoue, T., Minamiyama, Y., Kubo, N. (2012) An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*, 62:93–98.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M. (2006) An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18:157–169.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Kubo, T., Hirai, M. (2007) QTL analysis for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper using a high density SSR-based map. *Breeding Science*, 57:129–134.
- Mishra, M., Mahajan, N., Tamhane, A.V., Kulkarni, J.M., Baldwin, I.T., Gupta, V.S., Giri, A.P. (2012) Stress inducible protease inhibitor diversity in *Capsicum annuum*. *BMC Plant Biology*, 12:12-14.
- Monteiro, E.R., Bastos, E.M., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Nunes, J.A.F. (2010) Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40:288-283.
- Moreira, G.R., Caliman, F.R.B., Silva, D.J.H., Ribeiro, C.S.C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:16-29.
- Moretzsohn, M.C., Barbosa, A.V.G., Alves-Freitas, D.M.T., Teixeira, C., Leal-Bertioli, S.C.M., Guimarães, P.M., Pereira, R.W., Lopes, C.R., Cavallari, M.M., Valls, J.F.M., Bertioli, D.J., Gimenes, M.A. (2009) A linkage map for the B-

genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC plant biology*, 9:1-10.

Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, 117:307-310.

Moscone, E.A., Baranyi, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F. (2003) Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92:21–29.

Moscone, E.A., Escaldaferro, M.A., Gabrielle, M., Cecchini N.M., García, Y.S., Jarret, R., Daviña J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of the chili pepper (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulture*, 745:137-169.

Mosolov, V.V., Loginova, M.D., Fedurkina, N.V., Benken, I.I. (1976) The Biological significance of protease-inhibitors in plants. *Plant Science Letters*, 7:77-80

Mosolov, V.V., Valueva, T.A. (2006) Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants with phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*, 71:838–845.

Moura, D.S., Ryan, A.C. (2001) Wound-Inducible Protease Inhibitors in Pepper. Differential Regulation upon Wounding, Systemin, and Methyl Jasmonate. *Plant Physiology*, 126:289–298.

Moura, M.F., Mituti, T., Marubayashi, J.M., Gioria, R., Kobori, R.F., Pavan, M.A., Silva, N., Krause-Sakate, R.A. (2011) Classification of Pepper *yellow mosaic virus* isolates into pathotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 131:549–552.

Moura, M.F., Marubayashi, J.M., Mituti, T., Gioria, R., Kobori, R., Pavan, M.A., Krause-Sakate, R. (2012) Comparative analysis of coding region for the coat protein of PepYMV and PVY isolates collected in sweetpepper. *Summa Phytopathologica*, 38:93-96.

- Nascimento, I.R., Valle, L.A.C., Maluf, W.R., Gonçalves, L.D., Gomes, L.A.A., Moreto, P., Lopes, E.A.G.L. (2007) Reação de híbridos, linhagens e progênes de pimentão à requeima causada por *Phytophthora capsici* e ao mosaico amarelo causado por *Pepper yellow mosaic vírus* (PepYMV). *Ciência e Agrotecnologia*, 31:121-128.
- 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.
- Norton, G. (1991) Protease inhibitors. In: D'Mello, J.P.F., Duffus, C.M., Duffus, J.H. (eds) Toxic substances in crop plants. *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 1:68–106.
- Novelli, V.M., Cristofani-Yaly, M., Machado, M.A. (2000) Evaluation of microsatellite markers in cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Acta Horticulturae*, 535:47-50.
- Nunome, T., Ishiguro, K., Yoshida, T., Hirai, M. (2001) Mapping of fruit shape and color development trait in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding Science*, 51:19-26.
- Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A., Ohshima, K. (2008) Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 131:199-212.
- Okmen, B., Sigva, H.O., Gurbu, N., Ulger, M., Frary, A., Doganlar, S. (2011) Quantitative trait loci (QTL) analysis for antioxidant and agronomically important traits in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35:501-514.
- Oliva, M.L.V., Ferreira, R.S., Ferreira, J.G., Salas, C.E., Sampaio, M.U. (2011) Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from Leguminosae: A Mini Review. *Current Protein Peptides Science*, 12:348-357.

- Oliveira, C.F.R., Macedo, M.L.R. (2011) Emprego de inibidores de proteases vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. *Perspectiva on line Ciências Biológicas e da Saúde*. 1:1-11.
- Panorama Rural. (2006) Pimenta - um mundo de cores e sabores. *Panorama Rural*, 84:30-35.
- Paran, I.J.R., Van der Voort, V., Lefebvre, M., Jahn, L., Landry, M., Van Schriek, B., Tanyolac, C., Caranta, A., Ben-Chaim, K., Livingstone, A. (2004) An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). *Molecular Breeding*, 13:251–261.
- Patel, A.S., Sasidharan, N., Ashish, G.V., Vinay, k. (2011) Genetic relation in *Capsicum annuum* [L.] cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. *Electronic Journal of Plant Breeding*. 2:67-76.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E. (1991) DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*, San Diego, 46:39-89.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Burow, M.D., Draye, X., Elsik, C.G., Jiang, C.X., Katsar, C.S., Lan, T.H., Lin, Y.R., Ming, R., Wright, R.J. (2000) Comparative Genomics of Plant Chromosomes. *Plant Cell*, 12:1523–1540.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D.M. (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the americas. *Science*, 315:986–988.
- Pickersgill, B. (1991) Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: Tsuchiya, T., Gupta, P.K. Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Amsterdam: Elsevier, p.139-160. Disponível em: <<http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19931636082>>. Acesso em: 16 de agosto de 2013.
- Portis, E., Nagy, I., Sasvi, Z., Stigel A., Barchi L., Lanteri S. (2007) The design of *Capsicum* spp. SSR assays via analysis of *in silico* DNA sequence, and their potential utility for genetic mapping. *Plant Science*, 172:640–648.

- Potnis, N., Minsavage, G., Smith, J.K., Hurlbert, J.C. (2012) Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 25:307-320.
- Prasad, E.A., Dutta-Gupta, A., Padmasree, K. (2010) Purification and characterization of a Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of black gram (*Vigna mungo*). *Phytochemistry*, 71:363–372.
- Prince, J.P., Pochard, E., Tanksley S.D. (1993) Construction of molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*, 36:404–417.
- Priyamedha, B.K., Singh, G., Sangha, M.K.K., Banga, S.S. (2012) RAPD, ISSR and SSR Based Integrated Linkage Map From an F2 Hybrid Population of Resynthesized and Natural *Brassica carinata*. *National Academy Science Letters*, 35(4):303–308.
- Qi, X., Pittaway, T.S., Lindup, S., Liu, H., Waterman, E., Padi, F.K., Hash, C.T., Zhu, J., Gale, M.D., Devos, K.M. (2004) An integrated genetic map and a new set of simple sequence repeat markers for pearl millet, *Pennisetum glaucum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1485-1493.
- Rao, G.U., Ben-Chaim, A., Borovsky, Y., Paran, I. (2003) Mapping of yield-related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:1457–1466.
- Refaat, M.H., Hoda, A.S., Elgarhy. (2007) Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Annual Agriculture Science*, 45:1565-1579.
- Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Finger, F.L., Cruz, C.D., Casali, V.W.D. (2009) A diallel study of yield components and fruit quality in chilli pepper (*Capsicum baccatum*). *Euphytica*, 168:275-287.
- (a) Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Cruz, C.D., Finger, F.L., Casali, V.W.D. (2011) Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality

- and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*). *Genetics Resources and Crop Evolution*, 58:909-918.
- (b) Rêgo, E.R., Rêgo, M.M., Matos, I.W.F., Barbosa, L.A. (2011) Morphological and chemical characterization of fruits of *Capsicum* spp. accessions. *Horticultura Brasileira*, 29:364-371.
- Reifschneider, F.J.B. org. (2000) *Capsicum*. Pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças. 113p.
- Ribeiro, C.S.C., Cruz, D.M.R. (2003) Tendência de mercado: comércio de pimentão em expansão. *Cultivar*, Pelotas, 3:16-19.
- Ribeiro, C.S.C., Carvalho, S.I.C., Lopes, C.A., Reifschneider, F.J.B. (2008) Pimentões e pimentas do gênero *Capsicum*. In: Albuquerque, A.C.S., Silva, A.G.S. (org). *Agricultura tropical - quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1:595-608.
- Ribeiro, S.F.F., Silva, M.S., Cunha, M., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Rabelo, G., Mello, E.O., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V.M. (2012) *Capsicum annum* L. trypsin inhibitor as a template scaffold for new drug development against pathogenic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* (Gedrukt), 101:657-670.
- Ribeiro, S.F.F., Fernandes, V.S.K., Santos, I.S., Taveira, G.B., Carvalho, A.O., Lopes, J.L.S., Beltramini, L.M., Rodrigues, R., Vasconcelos, I.M., Da Cunha, M., Souza-Filho, G.A., Gomes, V.M. (2013) New Small Protease Inhibitors from *Capsicum annum* Seeds: Characterization, Stability, Spectroscopic Analysis and a cDNA Cloning. *Biopolymers Peptide Science Journal*, 100:132-140.
- Richardson, M. (1977) The protease inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16:159-169.
- Rocha, R.B., Pereira, J.F., Cruz, C.D., Queiroz, M.V., Araújo, E.F. (2003) O mapeamento genético no melhoramento de plantas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 30:27-32.

- Rodriguez-Burruezo, A., Prohens, J., Raigo, M.D., Nuez, F. (2009) Variation for bioactive compounds in aji' (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R & P) and implications for breeding. *Euphytica*, 170:169–181.
- Rodrigues, R., Gonçalves, L.S.A., Bento, C.S., Sudré, C.P., Robaina, R.R., Amaral Júnior, A.T. (2012) Combining ability and heterosis for agronomic traits in chili pepper. *Horticultura Brasileira*, 30:226-233.
- Rufino, J.L.S., Penteado, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:7-15.
- Ryan, C.A. (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review Phytopathology*, Washington, 8:425-449.
- Santos, M.M.P., Vieira-da-Motta, O., Vieira, I.J.C., Braz-Filho, R., Gonçalves, P. S., Maria, E.J., Terra, W.S., Rosana, R., Souza, C.L.M. (2011) Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Natural Medicines*, 60:1-3.
- Schägger, H., Von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166:368-379.
- Shirasawa, K., Ishii, K., Kim, C., Ban, T., Suzuki, M., Ito, T., Muranaka, T., Kobayashi, M., Nagata, N., Isobe, S., Tabata, S. (2012) Development of *Capsicum* EST–SSR markers for species identification and in silico mapping onto the tomato genome sequence. *Molecular Breeding*, 4:201-1210.
- Schuster, I., Cruz, C.D. (2004) Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Editora UFV, Viçosa, 568p.
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjioudjop, M.N. (2006) Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5:2569-2587.
- Silva, C.Q. (2013) Potencial ornamental de acessos de *Capsicum* spp. Monografia (Graduação - Agronomia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense

Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, p44.

- Simko, I. (2009) Development of EST-SSR Markers for the Study of Population Structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity*, 100(2):256–262.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Osion, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76-85.
- Souza, J.A., Maluf, W.R. (2003) Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq). *Scientia Agricola*, 60:105–113.
- Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M. (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, Alexandria, 31:729-740.
- Sturtevant, A.H. (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, New York, 14:43-59.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C.S. (2010) Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9(1):283-294.
- Sugita, T., Kinoshita, T., Kawano, T., Yuji, Y.K., Yamaguchi, K., Nagata, R. (2005) Rapid construction of a linkage map using high-efficiency genome scanning/ AFLP and RAPD, based on an Intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. *Breeding Science*, 55:287-295.
- Sugita, T., Yamaguchi, K., Kinoshita, T., Yuji, K., Sugimura, Y., Nagata, R., Kawasaki, S., Todoroki, A. (2006) QTL analysis for resistance to *Phytophthora blight* (*Phytophthora capsici* Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*. *Breeding Science*, 56:137–145.

- Sugita, T., Semi, Y., Sawada, H., Utoyama, Y., Hosomi Y., Yoshimoto, E., Maehata, Y., Fukuoka, H., Nagata, R., Ohya, A. (2013) Development of simple sequence repeat markers and construction of a high-density linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 31:909-920.
- Tamhane, V.A., Chougule, N.P., Giri, A.P. (2005) In vivo and in vitro effect of *Capsicum annuum* protease inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722(2):156–167.
- Tamhane, V.A., Giri, A.P., Sainani, M.N., Gupta, V.S. (2007) Diverse forms of Pin-II family protease inhibitors from *Capsicum annuum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Gene*, 403:29–38.
- Tamhane, V.A., Giri, A.P., Kumar, P., Gupta, V.S. (2009) Spatial and temporal expression patterns of diverse Pin-II protease inhibitor genes in *Capsicum annuum* Linn. *Gene*, 442:88–98.
- Tanksley, S.D. (1984) Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma*, 89:352–360.
- Tanksley, S.D., Bernatzky, R., Lapitan, N.L., Prince, J.P. (1988) Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85:6419–6423.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.W., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., Martin, O., Röder, M.S., Wing, R.A., Wu, W., Young, N.D. (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132:1141-1160.
- Tanksley, S.D. (1993) Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto, 27:205-233.
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubeze, A.M., Caranta, C., Lefebvre, V. (2003) Comparative mapping of Phytophthora resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:1473–1485

- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2008) Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57(3):562-572.
- Toledo, E.R., Leandro, R.A., Souza Júnior, C.L., Souza, A.P. (2008) Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. *Revista Brasileira de Biometria*, São Paulo, 26:107-114.
- Truta, A.A.C., Souza, A.R.R., Nascimento, A.V.S., Pereira, R.C., Pinto, C.M.F., Brommonschenkel, S.H., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. (2004) Identidade e propriedades de isolados de potyvírus provenientes de *Capsicum* spp. *Fitopatologia Brasileira*, 29:160-168.
- Valueva, T. A., Mosolov, V.V. (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*, 69:1305-1309.
- Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E. (2001) JoinMap version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps (software). Wageningen. *Plant Research International*, 51p.
- Van Ooijen, J.W. (2006) JoinMap version 4.0: software for the calculation of genetic linkage maps. *Kyazma BV*, Wageningen, The Netherlands, 23p.
- Varshney, R.K., Sigmund, R., Börner, A., Korzun, V., Stein, N., Sorrells, M.E., Langridge, P., Graner, A. (2005) Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science*, 168:195–202.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., Garcia, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajíes*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.
- Voorrips, R.E., Palloix, A., Dieleman, J.A., Bink, M.C.A.M., Heuvelink, E., Van der Heijden, G.W.A.M., Vuylsteke, M., Glasbey, C., Barocsi, A., Magan, J., Van Eeuwijk, F.A. (2010) Crop growth models for the -omics era: the EU-SPICY project. In: *Advances in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*:

proceedings. XIVth EUCARPIA Meeting on genetics and breeding of *Capsicum* and Eggplant. Editorial Universidad Politecnica de Valencia, Valencia, Spain. p. 315–321.

- Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Tikunov, Y., Vos, R.C.H., Pelgrom, T.B.K., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, J.R., Bovy, A.G. (2013) Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9:130–144.
- Wang, L.H., Zhang, B.X., Lefebvre, V., Huang, S.W., Daubeze, A.M., Palloix, A. (2004) QTL analysis of fertility restoration in cytoplasmic male sterile pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1058–1063.
- Wu, R., Ma, C., Casella, G. (2007) Statistical genetics of quantitative traits: linkage, maps and QTL. New York. Springer, 365p.
- Wu, F., Eannetta, N.T., Xu, Y., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M.M., Tanksley, S.D. (2009) A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 118:1279–1293.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Yang, X., Li, J., Wang, X., Fang, W., Bidochka, M.J., She, R., Xiao, Y., Pei, Y. (2006) Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*. 27:1726-1731.
- Yao, H., Zhao, Y., Chen, D.F., Zhou, T.S. (2008) ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Glycyrrhiza uralensis*. *Biologia Plantarum*, 52:117–120.
- Yarnes, S.C., Ashrafi, H., Reyes-Chin-Wo, S., Hill, T.A., Stoffel, K.M., Deynze, A.V. (2013) Identification of QTLs for capsaicinoids, fruit quality, and plant architecture-related traits in an interspecific *Capsicum* RIL population. *Genome*, 56:61–74.

- Xu, L.M., Zhou, L., Zeng, Y.W., Wang, F.M., Zhang, H.L., Shen, S.Q., Li, Z.C. (2008) Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a japonica rice near-isogenic line. *Plant Science*, 174:340–347.
- Zambolim, E.M., Costa, A.H., Capucho, A.S., Avila, A.C., Inoue-Nagata, A.K., Kitajima, E.W. (2004) Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região Serrana do Estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, 29:325-327.
- Zhu, X.C., Wu, H.W., Raman, H., Lemerle, D., Stanton, R., Burrows, G.E. (2012) Evaluation of simple sequence repeat (SSR) markers from *Solanum* crop species for *Solanum elaeagnifolium*. *Weed Research*, 52:217–223.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomic*, 20(2):176-183.
- Zygier, S., Chaim, A.B., Efrati, A., Kaluzky, G., Borovsky, Y., Paran, I. (2005) QTL mapping for fruit size and shape in chromosomes 2 and 4 in pepper and a comparison of the pepper QTL map with that of tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 111:437–445.