

**'UENF CARIOCA' E 'UENF CARIOQUINHA': NOVAS CULTIVARES
DE PIMENTA (*Capsicum annuum* var. *annuum*) RESISTENTES À
MANCHA BACTERIANA**

SAMY PIMENTA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JUNHO - 2015**

**'UENF CARIOCA' E 'UENF CARIOQUINHA': NOVAS CULTIVARES
DE PIMENTA (*Capsicum annuum* var. *annuum*) RESISTENTES À
MANCHA BACTERIANA**

SAMY PIMENTA

“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.”

Orientador: Prof(a). Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JUNHO – 2015

**'UENF CARIOCA' E 'UENF CARIOQUINHA': NOVAS CULTIVARES
DE PIMENTA (*Capsicum annuum* var. *annuum*) RESISTENTES À
MANCHA BACTERIANA**

SAMY PIMENTA

“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 12 de junho de 2015.

Comissão Examinadora:

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

Prof^a. Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Plant Breeding) - UENF

Prof. Leandro Simões Azeredo Gonçalves (D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas) - UEL

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

À luz de minha vida Luiza R. J. Pimenta, ao meu grande amor Talitha
R. Jardim e ao meu tudo Maria Elizabeth Pimenta.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por esta sempre comigo;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por toda estrutura física e intelectual que me possibilitou cursar o doutorado de maneira prazerosa, bem como a CAPES pela concessão da bolsa de estudo e FAPERJ pelo financiamento deste trabalho;

À minha orientadora Rosana Rodrigues, por tudo que aprendi nestes anos e pelo grande apoio dado à minha vida profissional e pessoal. Do mesmo modo considero Cláudia Pombo Sudré, juntas formam a base de sucesso da equipe de melhoramento de *Capsicum* spp. na formação de profissionais capacitados;

A família Pimenta (Dyane, Reginaldo, Mayra, Wesley, Livia, Glauco, Arthur e Bernardo) pelo apoio e confiança no meu trabalho e na busca deste meu objetivo, em especial a minha querida mãe, Maria Elizabeth Pimenta. Ao meu pai, José Geraldo G. Pimenta, que quando em vida me ensinou a ser uma pessoa justa e trabalhadora;

À minha noiva Talitha R. Jardim que me deu amor, apoio e o melhor presente do mundo, Luiza R. J. Pimenta, minha filha, minha luz. A família Rodrigues Jardim em especial a Orivaldo e Izabel Auxiliadora;

Aos professores e pesquisadores que fizeram parte de minha formação profissional. Principalmente a Ana Cristina Pinto Juhász por ter me conduzido a este caminho que hoje valorizo e trabalho com prazer que é o melhoramento de

plantas. Assim como ao Prof. Dimas Rodrigues, orientador do meu mestrado, exemplo como professor e pesquisador;

Aos professores: Alexandre Pio Viana, Antônio Teixeira do Amaral Júnior, Geraldo de Amaral Gravina, Gonçalo Apolinário de Souza Filho, Helaine Christine Cancela Ramos, Messias Gonzaga Pereira, Telma Nair Santana Pereira e aos demais professores do programa de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF, por todos os conhecimentos repassados, pelas dúvidas esclarecidas e pela amizade adquirida;

Ao professor Leandro Simões Azeredo Gonçalves, pelos frequentes ensinamentos repassados e amizade;

Ao secretário Daniel pela paciência e constantes ajudas fornecidas.

A equipe da PESAGRO José Manoel, Enildo, João, Jocimar e Marquinhos pelas infinitas colaborações nos ensaios ali conduzidos, e pelos grandes ensinamentos obtidos;

As funcionárias Neiva, Dona Isa e Isabela, dedicadas ao serviço e companheiras diárias de trabalho;

Por todos que passaram ou continuam na equipe de melhoramento de *Capsicum* spp., Adilson, Alexandre, Artur, Camila, Cintia Bento, Daniele, Gabriel, Grazielle, Hérica, Igor, Ingrid, Jardel, Jéssica, Lígia, Marcio, Marilene, Monique, Ozias, Pakizza, Paola, Rodrigo, Thâmara, Vinícius e Wallace;

Aos amigos adquiridos na UENF e em Campos dos Goytacazes durante o doutorado, graças a Deus são muitos, para não cometer o erro de esquecer alguém, não identificarei todos. Assim agradeço muito a eles pela companhia, amizade e pelos momentos felizes que me proporcionaram;

Enfim, a todos que contribuíram para a conclusão desta minha etapa profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1. Objetivo geral:	5
2.2. Objetivos específicos:.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Aspectos gerais sobre o gênero <i>Capsicum</i> L.	6
3.2. Melhoramento genético de <i>Capsicum</i> L.	7
3.3. Proteção de Cultivar e Teste de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE).....	10
3.4. <i>Fingerprint</i> de cultivares	15
3.5. Caracteres de qualidade dos frutos de pimentas	17
3.5. Resistência à mancha bacteriana.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Condições experimentais e genótipos.....	20
4.1.1. Locais e Épocas	20
4.1.2. Genótipos	21
4.2. Descritores considerados	22
4.2.1. Ensaio de DHE	22
4.2.2. Atributos qualitativos dos frutos.....	26
4.2.3. Caracterização molecular	28

4.2.3.1. Marcador AFLP	28
4.2.3.2. Marcador SSR	29
4.3. Análise das variáveis	31
4.3.1. Ensaio de DHE	31
4.3.2. Atributos de qualidade dos frutos	31
4.3.3. Análise Multivariada	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Ensaio de DHE	33
5.2. Atributos qualitativos dos frutos.....	46
5.3. Genotipagem e análise multivariada	53
6. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

PIMENTA, SAMY; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Maio de 2015. 'UENF CARIOCA' E 'UENF CARIOQUINHA': NOVAS CULTIVARES DE PIMENTA (*Capsicum annuum* var. *annuum*) RESISTENTES À MANCHA BACTERIANA. Orientadora: Prof^a. Rosana Rodrigues. Conselheiros: Prof. Alexandre Pio Viana e Prof^a. Telma Nair Santana Pereira.

Aumentar a qualidade do produto a ser consumido é um desafio constante para os melhoristas de plantas, sobretudo em relação às hortaliças. Associar boa qualidade de frutos de pimenta com resistência a doenças tem sido objetivo de programas de melhoramento de *Capsicum* em diversas regiões. No Brasil, para que uma nova cultivar tenha sua proteção efetivada é necessário à realização de ensaios de DHE (Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade), requisito comum aos países membros da *International Union of Protection of Plant Varieties* (UPOV). O teste de DHE para *Capsicum* spp. é baseado em descritores qualitativos e quantitativos. Neste trabalho descreve-se a execução de ensaios de DHE para efetuar o pedido de proteção de linhagens de pimenta (*C. annuum* var. *annuum*) resistentes à mancha bacteriana, discutem-se a relevância de alguns descritores para o processo de proteção, além disso, relata a caracterização molecular e de atributos de qualidade dos frutos de duas linhagens identificadas como aptas a proteção. Quatro linhagens de *C. annuum* var. *annuum* resistentes à mancha bacteriana desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento Genético de *Capsicum* da UENF foram testadas em casa de vegetação nos períodos de Junho

a Novembro de 2013 e Janeiro a Julho de 2014, em Campos dos Goytacazes-RJ. A cultivar Jalapeño M foi utilizada como testemunha. As linhagens foram distribuídas em delineamento de blocos ao acaso, com cinco repetições e sete plantas por parcela. Além dos 48 descritores estipulados pela legislação para o DHE em *Capsicum*, incluiu-se um descritor para a resistência à mancha bacteriana. Para as linhagens aptas a proteção avaliou-se ainda as seguintes características relativas à qualidade dos frutos: comprimento e diâmetro médio; espessura média do pericarpo; teor de sólidos solúveis (SST); acidez titulável (AT); relação SST/AT; teor de vitamina C em frutos imaturos e maduros; concentração de capsaicínides. Para a caracterização molecular utilizou-se marcadores SSR e AFLP. Os descritores que permitiram a distinção variaram para cada linhagem. Apesar de serem distintas em alguns descritores as linhagens L₁ e L₂ não foram homogêneas e estáveis. As linhagens L₆ e L₈ se caracterizaram pela homogeneidade e estabilidade. Entre os descritores que permitiram a distinção entre as linhagens estão o formato do fruto, a presença de capsaicina, o número de dias até o florescimento e a resistência à mancha bacteriana. Houve diferença altamente significativa entre as linhagens para todos os caracteres quantitativos de qualidade de frutos avaliados. A linhagem L₆ se caracterizou por pimentas com frutos não pungentes, com dimensões médias de 35,22 mm de comprimento e 23,79 mm de diâmetro. A linhagem L₈ é pungente, com concentração de capsaicina entorno de 13,05 µg/10mg, dihidrocapsaicina 21,53 µg/10mg e a nordihidrocapsaicina 9,85 µg/10mg, além de comprimento médio de 53,01 mm e diâmetro de 21,55mm. As linhagens L₆ e L₈ possuem frutos com alto teor de vitamina C (204,6 e L₈ 202,9 mg/100g, respectivamente), sólidos solúveis (10,1 e 8,18 °Brix, respectivamente), coloração verde quando imaturos e vermelha quando maduros, considerados grandes atributos de interesse ao mercado destas cultivares. Os marcadores SSR não possibilitaram a distinção entre as linhagens analisadas, enquanto os marcadores AFLP produziram 158 bandas, das quais 42,4% foram polimórficas, auxiliando na distinção entre as linhagens. As linhagens L₆ e L₈ atenderam as exigências de DHE, foram denominadas como 'UENF CARIOQUINHA' e 'UENF CARIOCA', respectivamente, e foram submetidas ao processo de proteção junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

ABSTRACT

PIMENTA, SAMY; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; June 2015. 'UENF CARIOCA' AND 'UENF CARIOQUINHA': NEW VARIETIES OF CHILI PEPPERS (*Capsicum annuum* var. *annuum*) RESISTANT TO BACTERIAL SPOT. Adviser: Prof^a. Rosana Rodrigues. Co-advisers: Prof. Alexandre Pio Viana and Prof^a. Telma Nair Santana Pereira.

Increase the quality of the product being consumed is a constant challenge for plant breeders, especially in relation to vegetables, associate quality of chilli pepper fruits with disease resistance has been aim of *Capsicum* breeding programs in many regions. In Brazil, the protection of new cultivars is made through of DUS (Distinctness, Uniformity and Stability) test, which is a requirement of countries members of International Union of Protection of Plant Varieties (UPOV). The DUS test for *Capsicum* spp. is based on qualitative and quantitative traits. This study describes the implementation of DUS trails to proceed in recombinant lines of chili pepper (*C. annuum* var. *annuum*) resistant to bacterial spot, discusses the relevance of some descriptors for the protection process, and we report molecular characterization and fruit quality attributes of two pepper lines identified as suitable protection. Four recombinant lines of chili pepper developed by the *Capsicum* breeding program of the UENF, identified as L₁, L₂, L₆, L₈ and a control represented by a commercial genotype ('Jalapeño M') were tested in a greenhouse located in Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil. The periods of assays were from June to November 2013 and January to July 2014. The treatments were distributed in complete randomized blocks with five replications and seven plants

per plot. Besides 48 descriptors, was included the descriptor for spot bacterial resistance. To the recombinant lines of chili pepper able to protect evaluated the following characteristics related to fruit quality: length and average diameter of fruits; average pericarp thickness; soluble solid content; titratable acidity; ratio SSC/TA; vitamin C content in unripe and ripe fruits; capsaicinoids concentration. The molecular characterization was used AFLP and SSR markers. The distinction obtained by the descriptors varied for each line. Although distinct in some descriptors the L₁ and L₂ lines were not homogeneous and stable. The L₆ and L₈ lines were characterized by homogeneity and stability. Among the distinctness descriptors are shape of fruit, presence of capsaicin, numbers of day to flowering and spot bacterial resistance. Highly significant difference was found between recombined lineage for all quantitative parameters. The recombined lineage L₆ was characterized as non-pungent chili peppers, with average dimensions of 35.22mm length and 23.79mm diameter. The recombined lineage L₈ is pungent, with capsaicin concentration around 13.05 µg/ 10mg, dihydrocapsaicin 21.53 µg/ 10mg and nordihydrocapsaicin 9.85 µg/ 10mg, besides average length of 53.01 mm and diameter of 21.55mm. The recombined lineage, L₆ and L₈, produced fruits with high vitamin C contents (204.6 and 202.9 mg/100g, respectively) and soluble solid (10.1 and 8.18 °Brix, respectively), characteristics of great relevance for the vegetable seeds. It was not possible the distinction among recombined lineage by SSR markers, while AFLP markers produced 158 bands, of which 42.4% were polymorphic, allowing the distinction among recombined lineage. Concluding, the L₆ and L₈ recombined lineage attended the DUS exigencies, were named as 'UENF CARIOQUINHA' and 'UENF CARIOCA', respectively, were submitted to the protection process of MAPA.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo das pimentas tem crescido em importância econômica e social no mundo, principalmente devido à versatilidade do seu uso, registrando-se um aumento considerável na produção mundial de pimenta, ao longo dos últimos anos (FAOSTAT, 2014). Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) cerca de sete milhões de toneladas de pimentas e pimentão foram produzidas em todo mundo, nos últimos dez anos (2003-2012). Porém, acredita-se que este número possa ser maior, uma vez que a produção em muitos países é contabilizada de modo precário, que é o caso do Brasil. O último censo oficial realizado no Brasil para o cultivo desta cultura foi disponibilizado em 2006 e consta uma produção anual em torno de 300 mil toneladas (IBGE, 2006).

Cultivadas no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás as pimentas (*Capsicum annum* L.) pertencem à família Solanaceae. Esta família botânica inclui também outras hortaliças de importância econômica como o pimentão, o tomate, a batata, a berinjela e o jiló. No gênero *Capsicum*, a espécie *C. annum* é a mais cultivada e inclui: pimentões, pimentas doces para páprica e consumo fresco, pimentas picantes como Jalapeño, Cayenne entre outras, e ainda algumas cultivares ornamentais (Nascimento, 2012; Ribeiro, et al. 2012a).

Existem algumas cultivares de pimentas comercializadas e desenvolvidas no Brasil por meio de poucos programas de melhoramento genético específicos para as espécies do gênero. Dentre os programas nacionais destaca-se o

desenvolvimento de cultivares de pimenta doce para processamento industrial, como páprica doce e pimenta picante do tipo Jalapeño para molhos líquidos, coordenado pela Embrapa Hortaliças (Nascimento, 2012). A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) no Rio de Janeiro também vem trabalhando para o lançamento de novas cultivares de pimentas resistentes à mancha bacteriana e com características agronômicas desejáveis (Riva-Souza et al., 2007; Riva-Souza et al., 2009; Moreira et al., 2010).

De acordo com Nascimento (2012) o mercado limitado e aspectos peculiares da produção de sementes de pimenta, como o baixo rendimento, dificuldade de extração das sementes, problemas relacionados com a qualidade fisiológica das sementes, dentre outros, levam a certo desinteresse por parte das empresas de sementes pelo desenvolvimento de novas cultivares, pela produção e até mesmo pela comercialização de sementes.

Ribeiro et al. (2012b) afirmam que este desinteresse existente também é devido à pequena demanda por parte dos produtores. A explicação para tal fato pode está no tipo de polinização encontrada nas pimentas, por apresentarem flores perfeitas (hermafroditas) e se reproduzirem preferencialmente por autofecundação. Assim os produtores de pimenta podem produzir sua própria semente e teoricamente, o manejo e as características de um campo de produção de sementes não diferem muito daquele destinado à produção comercial de pimentas (Nascimento, 2012).

A introdução de novos produtos tecnológicos, ou seja, novas cultivares, na agricultura brasileira contribuirá para melhoria da qualidade do produto e redução de custos de produção. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamenta, fiscaliza e controla a cadeia produtiva vegetal no Brasil e se responsabiliza por proteger e registrar cultivares e espécies para a produção e a comercialização de sementes e mudas no País, independente do grupo a que pertencem (Brasil, 2012a).

A obtenção de novas cultivares se dá a longo prazo e exige grandes recursos financeiros. A venda de sementes, ou a exploração de *royalties* possibilita o retorno dos investimentos aplicados e permite que novos ciclos de desenvolvimento de cultivares sejam realizados. A proteção de cultivares permite que os pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento de novas cultivares de plantas assegurados em lei, sejam recompensados, e ainda promove a pesquisa

e o desenvolvimento, o que, em última análise aumenta a produção da cultura e a conservação de recursos genéticos (ISF, 2012). Dentre as exigências para a proteção de uma cultivar, a mais importante é a realização dos testes de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE), esses possibilitam verificar se a cultivar candidata satisfaz os requisitos técnicos, segundo critérios estabelecidos pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) (Aviani, 2011).

Ensaio de DHE só podem ser realizados para as espécies que possuem descritores morfológicos publicados no Diário Oficial. O SNPC recomenda para os ensaios de DHE, dividir os descritores em qualitativos e quantitativos. Para *Capsicum* ssp., os ensaios são baseados em 48 descritores binários ou multicategóricos, avaliados desde a formação das mudas, passando pela arquitetura das plantas e formato de folha e frutos (Brasil, 2006). Tais ensaios são normalmente conduzidos em apenas uma localidade e com o mínimo de dois cultivos sucessivos. Ao fim, tem-se uma nova cultivar que deverá ser própria, permitindo que a sua identificação seja distinta de outras cultivares e não induza ao erro quanto às suas características (Aviani, 2011). A proteção vigora pelo prazo de 15 anos, com exceção de algumas espécies perenes, cuja duração será de 18 anos (Brasil, 2011).

O registro de cultivares por vez não pode ser confundido com a proteção, como comumente ocorre, uma vez que o registro apenas permite a produção e comercialização de sementes no país. Também é um processo importante para os programas de melhoramento, pois assegura a identidade genética e a qualidade varietal das cultivares. Esses processos possuem objetivos e procedimentos distintos, mesmo considerando que o processo de registro de cultivares pode usufruir e até mesmo ser abreviado pelo processo de proteção de cultivares (Carvalho et al., 2009). A finalidade e alcance do Registro Nacional de Cultivares (RNC) é disciplinar a utilização de cultivares que tenham uma aplicação marcante na agricultura nacional, que reúnam as condições técnicas de serem distintas, homogêneas e estáveis e que possuam um valor de cultivo e uso - VCU, identificado (Brasil, 2007).

Apesar de não fazer parte das exigências para a proteção de cultivar, o uso de marcadores moleculares facilita a caracterização da cultivar candidata e pode ser anexada ao pedido de proteção (Aviani e Santos, 2011). Millach (1999)

descreve algumas questões relevantes a respeito da implementação rotineira de marcadores moleculares para caracterização de cultivares com vistas à proteção legal, e afirma que a experiência do melhorista é que determinará o uso ou não desta ferramenta na caracterização de suas cultivares.

Há um crescente aumento na demanda de novas cultivares de pimenta mais adaptadas a determinadas regiões do país e apresentando caracteres de interesse para a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, dentre outros (Ribeiro, et al., 2012b). Para atender tal demanda, o programa de melhoramento de *Capsicum* L. da UENF iniciou ao final da década de 90 um programa com o objetivo de obter híbridos/cultivares resistentes à mancha bacteriana a partir de um cruzamento de duas linhagens divergentes (UENF1421 x UENF 1381). Com a aplicação do método de seleção SSD (*Single Seed Descent*) algumas linhagens foram selecionadas com base em características agronômicas de interesse e na resistência à mancha bacteriana (Costa et al., 2002; Sudré, 2003; Riva, 2006; Riva-Souza et al., 2009; Moreira et al., 2009; Moreira et al., 2010). A etapa seguinte deste programa foi à realização dos ensaios experimentais com objetivo de proteger e identificar quanto as suas características quatro linhagens de pimenta resistentes à mancha bacteriana e assim lançar novos produtos tecnológicos para os agricultores brasileiros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Conduzir ensaios de Distinguíbilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE) para efetuar o pedido de proteção de linhagens de pimenta (*C. annuum* var. *annuum*) resistentes à mancha bacteriana.

2.2. Objetivos específicos:

Identificar linhagens de pimentas desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de *Capsicum* da UENF aptas à proteção de cultivares;

Identificar os descritores que permitem a diferenciação entre as linhagens de pimenta e a testemunha selecionada para o DHE;

Caracterizar molecularmente as linhagens de pimenta com marcadores AFLP para auxiliar na distinguibilidade dessas;

Caracterizar atributos de qualidade dos frutos das linhagens de pimentas aptas à proteção;

Realizar análise multivariada com base em variáveis moleculares e descritores morfológicos em linhagens de pimenta candidatas à proteção, a fim de se obter melhor informação para a distinguibilidade dos genótipos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais sobre o gênero *Capsicum* L.

O gênero *Capsicum* cujo centro de origem é o continente americano possui um total de possui 38 espécies, incluindo novas espécies descritas, como a *C. caatingae*, *C. longidentatum* e *C. eshbaughii* (Barboza et al., 2011). Na região compreendida entre o norte da Bolívia e o oeste do Brasil se localiza o centro de origem de *C. annuum* L.. Desta região houve a dispersão para outras partes da América do Sul e principalmente América Central e México, onde se encontra a maior diversidade (Moscone et al., 2007).

A importância das pimentas como planta cultivada para a humanidade iniciou-se nas Américas há milhares de anos. O cultivo data de 7000 anos a.C. no México, Peru e Bolívia. Com o descobrimento da América por Colombo, as pimentas oriundas do México e da América Central foram espalhadas pela Europa via Espanha, tornando-se um negócio lucrativo para os espanhóis (Bosland e Baral, 2007; Casali, 2011). Aproximadamente 64% de toda a área cultivada com pimentas no mundo no ano de 2011, estão no continente asiático, com as principais áreas de cultivo localizadas na China, Indonésia, Turquia e Coreia. Conseqüentemente esta região é a maior produtora, alcançando 69% da produção mundial (Faostat, 2013). A segunda região mais importante em produção de pimentas compreende o continente americano, sendo os Estados Unidos e o México os maiores produtores, com cerca de 13% do total produzido em todo mundo (Faostat, 2013).

A espécie (*C. annuum* var. *annuum*) tem flores solitárias com corola branca, hermafroditas, com cinco anteras e um estigma. A abertura da flor ocorre com maior frequência nas três primeiras horas do dia, permanecendo abertas, em média, durante 24 horas. A receptividade do estigma pode ocorrer desde a fase de botão, na véspera da antese, até duas ou três horas após a abertura (Casali et al., 1984). É uma planta de autofecundação, embora a taxa de cruzamento possa ser elevada, dependendo da ação de insetos polinizadores. A espécie *C. annuum* é diploide, com $2n = 24$ cromossomos (Moscone et al., 2007). O tamanho do genoma de *Capsicum* é estimado entre 3,300 cM e 3,600 cM (Moscone et al., 2003; Hill et al., 2013).

Segundo Chattopadhyay et al. (2011), os frutos de pimenta, tanto nas fases verdes quanto maduras, é um condimento importante, devido à pungência, decorrente de um princípio ativo conhecido como capsaicina. Bosland e Baral (2007) enfatizam que a característica de pungência e a conseqüente sensação de calor ou queima quando se consome pimenta, é um atributo importante da qualidade dos frutos e um dos mais importantes motivos das pimentas serem apreciadas. A ausência de pungência em pimentas é controlada por um único gene recessivo, o *pun-1*, também conhecido como *c* (Wang e Bosland, 2006).

Muitas são as variações dentro do gênero *Capsicum* quanto à altura e forma de crescimento, sendo que as plantas são diferenciadas de acordo com a espécie e as condições de cultivo. O sistema radicular é pivotante, com um número elevado de ramificações laterais, podendo chegar a profundidades de 70-120 cm. As folhas apresentam tamanho, coloração, formato e pilosidade variáveis. O sistema de ramificação de *Capsicum* segue um único modelo de dicotomia e, iniciam-se quando a plântula atinge 15 a 20 cm de altura. Um ramo jovem sempre termina por uma ou várias flores (Carvalho e Bianchetti, 2004).

3.2. Melhoramento Genético de *Capsicum* L.

Cultivares autógamas compreende uma única linhagem ou uma mistura de linhagens. Linhagens são definidas como plantas completamente em homozigose. O híbrido por sua vez é resultado do cruzamento de duas, três ou quatro linhagens, também denominados híbrido simples, triplo e duplo, respectivamente (Bernardo, 2002). A maioria das cultivares de pimentas comercializadas no país é

de linhas puras, apesar de resultados recentes do mercado de sementes já apresentarem pequenas quantidades de sementes híbridas (Nascimento, 2012).

Há grande variação genética em relação a alguns caracteres de importância econômica quando se trata de espécies do gênero *Capsicum*, como comprimento dos frutos (oscilando de 1 a 30 cm); formato (oval, redondo, quadrado, cônico, achatado, em forma de sino); pungência (doces ou pungentes), além de diferentes tipos de coloração do fruto. Os frutos maduros são geralmente de coloração vermelha, mas pode variar desde o amarelo-leitoso, amarelo-forte, alaranjado, salmão, roxo até preto (Carvalho e Bianchetti, 2004).

A seleção de genitores com base em sua capacidade para gerar indivíduos superiores quando em cruzamento é primordial para o sucesso de um programa de melhoramento (Allard, 1971). A estratégia do melhorista está em reunir em uma cultivar o potencial genético para produtividades superiores e melhoria da qualidade (Bosland, 1996). Em síntese, o melhoramento genético vegetal pode ser considerado como ciência, arte e gerenciamento dos recursos do aperfeiçoamento das plantas visando o benefício da sociedade (Bernardo, 2002).

Greenleaf (1986) descreve os métodos de melhoramento utilizados para obtenção das cultivares de *Capsicum* L., destacando: a) método genealógico; b) transferência de genes de cultivares obsoletas ou espécies silvestres para as principais cultivares pelo método de retrocruzamento; c) intercruzamento entre diferentes famílias e parentais por meio de seleção recorrente. Os métodos clássicos de melhoramento são utilizados aliados a ferramentas como a biometria e a biologia molecular que possibilitam o desenvolvimento de novos genótipos mais adaptados e mais produtivos, tornando o mercado de produção de sementes mais atraente (Ilbi, 2003; Riva, 2006; Riva-Souza et al., 2007; Riva-Souza et al., 2009).

O programa de melhoramento genético de espécies de *Capsicum* L. realizado pela UENF, iniciou-se no ano de 1998 com a execução de um programa com objetivo de identificar fontes de resistência; e estudar a capacidade combinatória entre genótipos de *C. annuum* L. visando à obtenção de híbridos resistentes à mancha bacteriana do pimentão (Costa et al., 2002). A partir desta data, vários projetos foram implementados, e outras espécies desse gênero foram incluídas para novos objetivos. Dentre os trabalhos concluídos, enfatizam-se alguns resultados importantes a respeito de *C. annuum* L., como: identificação

dos acessos UENF 1381, UENF 1496, UENF 1498, UENF 1558, UENF 1573, UENF 1578 e UENF 1585, como fontes de resistência à mancha bacteriana (Sudré, 2003); a indicação da combinação UENF 1421 x UENF 1381, como superior para obtenção de cultivares resistentes à mancha bacteriana com características agronômicas desejáveis (Costa et al., 2002); identificação de três genes recessivos, controlando a resistência à mancha bacteriana no cruzamento UENF 1421 x UENF 1381 (Riva et al., 2004b); e observaram-se que com o uso do método genealógico, a seleção combinada foi 6,5% mais eficiente do que a seleção entre e dentro de famílias oriundas do cruzamento UENF 1421 x UENF 1381 (Riva-Souza et al., 2007).

Os métodos genealógicos e o SSD (*single seed descent*) foram os empregados para seleção das linhagens recombinantes resistentes à mancha bacteriana pelo grupo de pesquisa da UENF. O primeiro é utilizado para a seleção em plantas individuais de uma população segregante isolando assim linhas puras em espécies autógamas (Fehr, 1987). Ramalho et al. (2012) descrevem o método da seguinte forma: inicialmente, as plantas da geração F_2 são selecionadas visualmente e colhidas separadamente. As sementes dessas plantas são semeadas em linhas, gerando progênies $F_{2:3}$. Das melhores progênies $F_{2:3}$ são selecionados os melhores indivíduos. O processo se repete até $F_{4:5}$ ou $F_{5:6}$. As sementes de cada progênie são então colhidas, para serem mais intensivamente avaliadas nos experimentos regionais de avaliação.

Para o método SSD colhe-se uma semente de cada planta da geração F_2 , e o mesmo é realizado nas gerações F_3 , F_4 , até quando a maioria dos locos se encontrar em homozigose, a partir daí seguem-se os procedimentos de avaliação necessários. Com o uso do método SSD foram identificadas 18 linhas endogâmicas recombinadas promissoras para resistência à mancha bacteriana (Riva, 2006; Riva-Souza et al., 2009). Posteriormente Moreira (2008) e Moreira et al. (2009; 2010) estudaram a interação dessas linhas com os diferentes ambientes e selecionaram oito linhas, com resistência à mancha bacteriana e características agronômicas desejáveis.

Com estas informações Moreira (2012) realizou ensaios preliminares de distinguibilidade e homogeneidade, seguindo as diretrizes do SNPC, caracterizando oito linhas endogâmicas recombinadas e diferenciando-as entre si e com o genótipo comercial, por meio de caracteres quantitativos,

multicategóricos, marcadores moleculares (ISSR), e resistência à mancha bacteriana (RMB), com a finalidade da obtenção do certificado de proteção de cultivares. Entretanto, constatou-se a necessidade de se obter maior homogeneidade das linhas antes de se prosseguir com etapas seguintes de implantação de DHE e assim adquirir o certificado de proteção e iniciar os ensaios de VCU, para o registro destas cultivares.

3.3. Proteção de cultivar e Teste de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE).

Por muito tempo a biodiversidade foi considerada patrimônio comum da humanidade. Após 1980 e devido principalmente a uma ação judicial do Supremo Tribunal dos EUA que concedeu uma patente ao obtentor de uma bactéria geneticamente modificada, a propriedade intelectual tornou-se motivo de grandes controversas (Gepts, 2006). O princípio do patrimônio comum que existia antes dessa data foi reconsiderado e incluída no Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e Agricultura (TIRFAA), da qual regulamenta o intercâmbio de germoplasma para várias culturas, em um acordo multilateral e que impõe um pagamento de benefício decorrente da comercialização de uma cultura pertencente ao tratado, considerando como uma repartição justa e equitativa (Fowler, 2004; Gepts, 2006). No Brasil, cabe ao MAPA atestar sobre o direito à propriedade intelectual, no tocante ao desenvolvimento de novas cultivares (Brasil, 2012a).

O Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC) visa à proteção da propriedade intelectual, assegurando exclusividade nos direitos de exploração comercial e uso de *royalties*. O SNPC possui legislação própria conectada a ordenamentos internacionais de proteção intelectual (Brasil, 2010).

A maioria dos países que já introduziram um sistema de proteção de variedades de plantas (PVP) escolheu para basear seu sistema na Convenção Internacional para a Proteção de Cultivares (International Union of Protection of Plant Varieties, UPOV). Sediada na Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI), em Genebra, a UPOV entrou em vigor em 1968 e foi revisada em 1972, 1978 e 1991. Criada com o fim de fornecer uma resposta eficaz, com o uso de um sistema internacionalmente reconhecido, tal sistema é projetado para encorajar a inovação no domínio do melhoramento de plantas. A esse respeito, a

Lei de 1991 da Convenção UPOV reconhece que é importante incentivar a criação em todos os gêneros e espécies vegetais e não pré-determinar para quais espécies é permitida a proteção (UPOV, 2005).

A PVP contribui de forma significativa para o desenvolvimento tecnológico e econômico do país, alterando o modelo de geração de tecnologia na área de produção de sementes em vigor (Viana, 2011). Esta contribuição é mais significativa quando se trata de uma cultivar de espécie autógama, visto que qualquer produtor de sementes pode obtê-la a partir da multiplicação das sementes de sua própria lavoura, por várias gerações. Caso não houvesse um sistema de PVP uma das consequências diretas é que o melhoramento de espécies autógamas ficaria restrito às instituições públicas (Araújo, 2010). Instituições privadas antes da LPC investiam quase que totalmente em pesquisas para o desenvolvimento de cultivares híbridas, cuja proteção é obtida por meio de informação não revelada das linhagens parentais.

Novas cultivares podem ser protegidas, pelas diretrizes da UPOV, ou por um sistema do tipo UPOV dependendo de cada país. Por exemplo, os Estados Unidos, Japão, Austrália e Coreia, optaram por um sistema de proteção misto, no qual se combinam os modelos patentário e o de proteção *sui generis*. Outros adotaram um sistema exclusivamente *sui generis* (Brasil, 2011). O termo *sui generis*, de origem latina, significa de seu próprio gênero, ou seja, único em seu gênero, é um sistema diferente de outras categorias de proteção à propriedade intelectual como as patentes (Kumar et al., 2001). Um exemplo *sui generis* é o direito do obtentor, por apresentar características únicas e particulares, próprias para o objeto de proteção, no caso, as novas cultivares. Assim, enquanto para a concessão de patentes são necessários requisitos como novidade, aplicação industrial, atividade inventiva e suficiência descritiva, para a concessão do Certificado de Proteção de Cultivares são exigidos os requisitos de novidade, distinguibilidade, homogeneidade, estabilidade e denominação própria (Brasil, 2011).

Se um país prevê a adoção de um sistema *sui generis* para proteger as variedades de plantas, a *International Seed Federations* (ISF) recomenda que este tenha pelo menos conformidade com os requisitos da Lei de 1991 da Convenção UPOV (Bruins, 2009). O Brasil aderiu oficialmente à UPOV em 23 de

maio de 1999, ainda optando pela convenção de 1978, a qual serviu de base para a elaboração da Lei de Proteção de Cultivares.

O objeto a ser protegido deve seguir a definição da lei. Sobre o objeto de proteção, deve-se fazer uma leitura atenta do artigo 3º, inciso IV, da Lei de Proteção de Cultivares: (...) *cultivar: a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, por sua denominação própria, que seja homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas e seja de espécie passível de uso pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público (...)*. Sendo assim, o termo cultivar designa um grupo de plantas com características homogêneas, que deve se diferenciar de outras cultivares para ser considerado novo e também ser passível de multiplicações seguidas sem se descaracterizar (Brasil, 2011).

Em 2015, existiam 1.994 cultivares protegidas no Brasil (Brasil, 2015). Porém quando a espécie protegida é *C. annuum* L., há apenas duas cultivares protegidas, BRS Garça e BRS Sarakura (Carvalho et al., 2009, Brasil, 2015b), ambas tendo como titular a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e protegidas a partir de 14/04/2010 (Brasil, 2012b).

Uma peculiaridade na proteção está no tempo em que as espécies ficam protegidas. Esta duração da proteção vigora a partir da data de concessão do Certificado Provisório de Proteção, pelo prazo de 15 anos, com exceção de algumas espécies (videiras, árvores frutíferas, árvores florestais e árvores ornamentais), cuja duração será de 18 anos. Ao fim do período de proteção, a cultivar entra em domínio público e nenhum direito poderá impedir sua livre utilização (Brasil, 2011).

Para que uma cultivar candidata tenha sua proteção realizada, um requisito importante é a distinguibilidade juntamente com a homogeneidade e a estabilidade que formam a base principal de requisitos técnicos chamados ensaios de DHE para proteção pelo sistema UPOV, em qualquer país do mundo. No Brasil, esses testes são de responsabilidade do requerente da proteção e devem ser entregues na apresentação do pedido de proteção (Aviani, 2011). De acordo com o MAPA (Brasil, 2012a), o sistema de proteção de cultivares brasileiro permite que os melhoristas conduzam os testes DHE e produzam um relatório final com os resultados, de acordo com os princípios contidos nas diretrizes de

DHE publicadas para cada espécie, sendo a decisão sobre a proteção da cultivar baseada nesse relatório.

A Federação Internacional de Sementes apoia plenamente os princípios previstos pela UPOV no tocante às suas características para testes DHE. Para isso os testes devem atender a alguns critérios básicos: o genótipo deve ser suficientemente consistente e repetível em um ambiente particular; apresentar diferenciação suficiente entre variedades para ser capaz de estabelecer a distinção; ser capaz de definição precisa e reconhecimento; permitir que os requisitos de uniformidade sejam cumpridos; permitir que os requisitos de estabilidade sejam preenchidos, o que significa que ele produz resultados consistentes e reproduzíveis depois de sucessivas multiplicações ou, se for caso, o final de cada ciclo de propagação (ISF, 2012).

Ensaio de DHE só podem ser realizados para as espécies que possuem descritores morfológicos publicados no Diário Oficial. Quando a espécie (ou gênero) não possuir os descritores publicados, os responsáveis pela execução dos ensaios de DHE devem entrar em contato com o MAPA/SNPC para que as diretrizes possam ser elaboradas e publicadas (Brasil, 2011).

O SNPC recomenda para o teste de DHE, classificar os descritores em características qualitativas e quantitativas. As características qualitativas (QL) são os descritores que se enquadram em dois níveis mutuamente exclusivos e não devem ser consideradas distintas, caso tenham o mesmo nível de expressão. As características quantitativas (QN) são aquelas cuja expressão cobre toda a amplitude de variação de um extremo a outro, sendo descritores multicategóricos. A expressão pode ser registrada por meio de uma escala linear unidimensional, e a divisão fornece uma distribuição homogênea da escala (Santos e Pacheco, 2011).

Para *Capsicum* ssp., o teste de DHE é baseado em 48 descritores binários ou multicategóricos, avaliados desde a formação das mudas, passando pela arquitetura das plantas e formato de folha e frutos (Brasil, 2006). Para o certificado de proteção, não importa se a cultivar a ser protegida é mais produtiva ou tem melhor arquitetura do que outras. Assim, os ensaios de DHE não englobam algumas características agrônomicas como produtividade, por estas características serem bastante influenciadas pelas condições ambientais, sendo

importantes apenas nos ensaios de valor de cultivo e uso requerido no pedido de registro da cultivar.

Os ensaios de DHE são normalmente conduzidos em apenas uma localidade. Dessa maneira, minimiza-se o efeito ambiental para serem obtidos resultados mais coerentes sobre descrição, homogeneidade e estabilidade da cultivar candidata à proteção, além de verificar melhor a consistência das diferenças dela para com as cultivares que estão sendo comparadas (Machado, 2011).

Um dos componentes essenciais do progresso genético fornecido pelas novas cultivares reside na sua capacidade de oferecer resistência efetiva a uma gama considerável de doenças e pragas. A utilização de características de reação a doenças nos formulários de descrição de cultivares tornou-se necessária para acompanhar os avanços do melhoramento genético das principais espécies cultivadas no País, como algodão, arroz, cana-de-açúcar, soja, trigo e diversas hortaliças (Lovato, 2011).

Quanto às características de resistência a pragas e doenças, iniciativas que permitem utilizá-los como características de distinção em testes DHE são bem aceitas, na medida em que: a) as resistências sejam claramente definidas, nomeadas com o gênero, espécie, e se necessário o patótipo associado com a resistência. Quando existir várias raças patogênicas, a raça específica também deve ser definida; b) a avaliação deve ser nítida, usando caracteres que devem ser documentados como um método padronizado e que esteja disponível através de uma publicação conhecida ou uma vez incorporado às diretrizes da UPOV para testar as espécies em questão; c) um nível de resistência diferente só é admissível como uma característica que permite o teste de nitidez se os níveis de expressão puderem ser claramente definidos e, se os resultados do teste sejam consistentes e tecnicamente viáveis (ISF, 2012).

Seguindo todas as premissas exigidas para proteção, tem-se por fim a denominação desta nova cultivar. A cultivar deverá possuir uma denominação própria, que permita que sua identificação seja distinta de outras cultivares e não induza a erro quanto às suas características. A denominação deve ser proposta no momento do pedido de proteção pelo requerente e atender a regras estabelecidas pela Lei de Proteção de Cultivares (Aviani, 2011).

3.4. *Fingerprint* de cultivares

A caracterização molecular de uma cultivar é um importante processo de proteção legal dos genótipos desenvolvidos por melhorista, contribuindo para a descrição detalhada desses materiais (Brammer, 2000). O uso de técnicas moleculares para proteção de cultivares é motivo de discussão por parte do Grupo de Trabalho em Técnicas Bioquímicas e Moleculares e Perfis Moleculares (BMT), da UPOV. O principal objetivo deste Grupo é gerar e referendar documentos com orientações para o desenvolvimento de metodologias harmonizadas, visando um melhor intercâmbio de informações obtidas a partir do uso de marcadores moleculares entre os países membros da UPOV. O BMT considera dois critérios fundamentais para a seleção de métodos e de marcadores moleculares para uso em atividades de apoio à proteção de cultivares. Esses critérios são a reprodutibilidade e a repetibilidade dos resultados, que permitem estas vantagens como a comprovação da origem genética da cultivar na identificação de cultivares em casos de uso indevido e em atividades de fiscalização (Aviani e Santos, 2011).

Os perfis genéticos (*fingerprinting*) de cultivares, obtidos por meio de marcadores, podem ser anexados ao pedido de proteção pelos obtentores para fins de caracterização de cultivares. Desde 2009 o SNPC vem aplicando a análise do DNA por marcadores em cultivares de espécies como soja, arroz, algodão e eucalipto para manejo dos ensaios de DHE e como um dos itens para verificação da distinguibilidade entre cultivares candidatas à proteção (Aviani e Santos, 2011).

Dentre as principais características de importância na escolha de um marcador esta no polimorfismo identificado no genótipo. Caso o marcador seja dominante os alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. No entanto, não é possível saber se o loco amplificado esta em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigotos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado (Lopes et al., 2002).

Há inúmeros trabalhos disponíveis na literatura com aplicação de marcadores em *Capsicum* L. para fins de diferenciação genotípica (Moreira, 2012;

Kong et al., 2012; Pacheco-Olvera et al., 2012), para proteção de cultivares de *Capsicum* (Kwon et al., 2005). Vários trabalhos utilizam marcadores em processos de proteção para outras culturas, tais como: beterraba (De Riek et al. 2001), pepino (Bernet et al., 2003), arroz (Islam, et al., 2011), videira (Vélez e Ibáñez, 2012), cevada (Jones et al., 2012), trigo (Potokina et al., 2012) já estão disponíveis; nesses há concordância em que os marcadores quando utilizados em conformidade com os descritores morfológicos podem ser de grande utilidade para a distinção de genótipos.

Entre os marcadores moleculares com capacidade de repetibilidade e reprodutibilidade estão os microssatélites ou *Single Sequence Repeat* (SSR), esses utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta, sendo assim úteis principalmente pela sua alta variabilidade (Akkaya et al., 1992; Lee et al., 2004). Estes marcadores são comumente utilizados com fins de elaboração de mapas genéticos em *Capsicum* L. (Lee et al., 2004; Minamiyama et al., 2006).

Marcadores AFLP são considerados como a classe de marcadores com maior poder de detecção de variabilidade genética, uma vez que explora polimorfismo de restrição e de amplificação, sendo uma ferramenta valiosa pela geração de grande número de locos polimórficos e de grande reprodutibilidade (Rodrigues e Costa, 2011). Para *Capsicum* L. é rotineiramente utilizado com diversos objetivos, Castañón-Najera et al. (2011) aplicaram marcadores AFLP para explorar heteroses em *Capsicum*; Gaikwad et al., (2013) utilizaram alguns marcadores, entre eles o AFLP, para obtenção de DNA *fingerprint* e diversidade genética em 30 cultivares de *Capsicum* L.; Krishnamurthy et al., (2013) obtiveram os limites de divergência parental para a ocorrência de heterose através de marcador morfológico e AFLP em pimentas.

A *International Seed Federations* endossa fortemente o uso de marcadores moleculares para fins de identificação de variedades, por exemplo, no caso de aplicação dos direitos de propriedade intelectual; para ajudar a determinar a similaridade genética entre as variedades e para uso em disputas sobre derivação essencial. Porém, esta mesma instituição tem certa cautela no uso de marcadores no processo de proteção em algumas situações, por exemplo: o uso de marcadores moleculares por conta própria, sem ligação direta a uma característica fenotípica que poderia criar um risco significativo diminuindo a

distância mínima entre variedades, comprometendo o processo de proteção (ISF, 2012).

3.5. Caracteres de qualidade dos frutos de pimentas

O consumo e o apreço pelas pimentas se devem principalmente pela combinação de características relativas aos frutos como cor, sabor e pungência (Lannes et al., 2007; Topuz e Ozdemir, 2007). Além disso, as pimentas também possuem muitos compostos antioxidantes como os capsaicínides, ácido ascórbico, carotenóides e flavonóides, que são considerados biologicamente ativos e que promovem a saúde (Rosa et al., 2002; Bae et al., 2014; Khan et al., 2014).

Os capsaicínides são compostos responsáveis pela pungência dos frutos de pimenta. A capsaicina e a dihidrocapsaicina são os capsaicínides mais presentes e pungentes (Reilly et al., 2001; Karnka et al., 2002). Estas substâncias são produzidas em glândulas presentes na placenta e nas nervuras existentes ao longo do fruto, sendo a placenta considerada a parte mais pungente da pimenta (Topuz e Ozdemir, 2007). Tal atributo é importante na qualidade dos frutos e um dos motivos das pimentas serem apreciadas (Bosland e Baral, 2007). Porém, não só as pimentas pungentes agradam aos consumidores: pimenteiras cujo sabor é mais suave e de melhor digestão ou pimentas não pungentes e mais aromáticas são preferidas por um nicho de mercado (Henz, 2004).

A vitamina C, é um constituinte funcional e nutricional presente principalmente em frutos, inclusive de pimenta. Sua composição nos frutos varia de acordo com o genótipo e a maturidade (Bae et al., 2014) além do manejo da adubação e fatores ambientais, que podem interferir em uma maior ou menor concentração desta vitamina. Apesar de vários estudos demonstrarem alta concentração de vitamina C em frutos de pimentas (Marín, et al., 2004; Rodríguez-Burruezo et al., 2009; Alvarez-Parrilla et al., 2010), essa característica ainda é pouco relacionada comercialmente com os frutos de pimenta, fato que pode ser atribuído a baixa quantidade de pimenta que é normalmente consumido por uma pessoa (Frank et al., 2001).

Há uma grande diversidade em relação a alguns caracteres de importância econômica relacionados aos frutos de pimentas (Rêgo et al., 2011), tais como: comprimento, diâmetro, espessura do pericarpo, coloração antes e após a

maturação, formato, textura da superfície, brilho dentre outros. Estes caracteres estão entre os utilizados em programas de melhoramento desta espécie que visam à obtenção de novas cultivares (Riva-Souza *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013). Por consequência, fazem parte dos descritores exigidos pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a proteção de novas cultivares de pimenta no Brasil (BRASIL, 2006).

3.5. Resistência à mancha bacteriana

Entre os obstáculos para a produção de pimentas em diversas partes do mundo destaca-se a ocorrência de doenças de diferentes etiologias, entre elas a mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas euvesicatoria*. Considerada a principal doença bacteriana da cultura da pimenta e do pimentão, a qual pode causar danos foliares enormes, tanto em ambiente protegido quanto no campo, acarretando perda da produção e qualidade dos frutos (Carmo *et al.*, 1996; Jones *et al.* 1998).

A bactéria é facilmente dispersa pelos respingos de água de chuva ou irrigação por aspersão, especialmente quando acompanhada por vento. Em período chuvoso, as infecções são mais abundantes e as lesões se desenvolvem mais rapidamente em número e tamanho, o que leva a desfolha intensa e precoce da planta. Além disso, mancha bacteriana é de difícil controle no campo. Como medidas de prevenção recomenda-se o uso de sementes e mudas saudáveis, destruição de restos culturais e rotação com gramíneas (Carmo *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2011)

Essa doença, altamente destrutiva é favorecida por temperaturas elevadas e alta umidade, tem sido alvo de muitas pesquisas, incluindo a busca por fontes de resistência (Costa *et al.*, 2002; Noda *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2009; Riva-Souza *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013), caracterização de genes (Jones *et al.*, 1998; Riva *et al.*, 2004) e estudos de herança genética (Hibberd *et al.*, 1987; Hibberd *et al.*, 1988; Riva *et al.*, 2004). O uso de cultivares resistentes é preconizado como o método de controle mais adequado, entretanto, o número de genótipos de pimentas com características de resistência desejáveis é incipiente.

No complexo etiológico da mancha bacteriana das solanáceas causada por espécies de *Xanthomonas* já foram identificadas três raças para tomate (*Solanum lycopersicum*) e 11 para *Capsicum* (Quezado-Durval e Camargo, 2004). As raças

são definidas com base em reações de um grupo definido de genótipos das hospedeiras. No patossistema da mancha bacteriana em *Capsicum* há interação entre os genes *Bs1*, *Bs2* e *Bs3* presentes no hospedeiro e os respectivos genes *avrBs1*, *avrBs2*, *avrBs3*, tal interação seguindo o modelo gene a gene proposto por Flor. *Xanthomonas euvesicatoria* inclui apenas estirpes do ex táxon *X. campestris* pv. *vesicatoria*. As estirpes são geralmente isoladas a partir de lesões em solanáceas, especialmente tomate e pimenta. *Xanthomonas euvesicatoria* pode ser distinguida a partir de estirpes do tipo *X. vesicatoria* pela semelhança de DNA e cinco traços fenotípicos facilmente testados: *X. euvesicatoria* é fracamente amilolítica e pectolítica, tem um padrão distinto de reação a um grupo de anticorpos monoclonais, dentre outros (Jones et al., 1998). Segundo Jones et al. (2004) os grupos fenotípicos de espécies de *Xanthomonas* associados a tomate e pimenta são: *X. euvesicatoria* (grupo A); *X. vesicatoria* (grupo B); *X. perforans* (grupo C) e *X. gardneri* (grupo D). Tal diferenciação esta associada à reação a anticorpos monoclonais; padrões de proteínas; análise em gel de eletroforese e pela atividade amilolítica e pectolítica.

Novas cultivares de pimenta com resistência à mancha bacteriana representa uma importante contribuição para o mercado de sementes e, principalmente, para os produtores e consumidores, pela redução do custo de produção e maior sustentabilidade ambiental do cultivo, visto que contribui para redução do uso de defensivos agrícolas nas lavouras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições experimentais e genótipos

4.1.1. Locais e Épocas

Os ensaios de DHE foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) da UENF, localizada a 21° 45' de latitude sul, 41° 18' de longitude oeste e 11m de altitude, no município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, nos períodos de Junho a Novembro de 2013 (1º ensaio) e de Janeiro a Julho de 2014 (2º ensaio). Todas as recomendações sobre ensaios de DHE para cultivares de *Capsicum* propostas pelo SNPC (Brasil, 2006) foram adotadas.

Nos dois ensaios, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com cinco repetições e sete plantas por parcela, totalizando 35 plantas avaliadas por linhagem. As plantas foram cultivadas em vasos de cinco litros contendo uma mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção de 1:1:1. O espaçamento utilizado entre vasos foi de 1,0 x 0,5 m. O Ato Nº 2, de 2006, determina para avaliações em cultivo protegido, que cada ensaio inclua um mínimo de 18 plantas, divididas em duas ou mais repetições (Brasil, 2006). Os tratos culturais foram adotados de acordo com o que é recomendado para a cultura (Filgueira, 2012).

Os atributos físicos e químicos de qualidade relativos aos frutos foram realizados na Unidade de Bioquímica e Fisiologia Pós Colheita do Setor de

Fisiologia Vegetal (LMGV/CCTA) da UENF em Campos dos Goytacazes, RJ. Já as análises de capsaicinoides foram realizadas no laboratório do programa de pós-graduação em química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado em Seropédica-RJ. Estes atributos foram avaliados no período de abril a julho de 2014 em delineamento inteiramente ao acaso com cinco repetições. Foram analisados apenas dos frutos oriundos do segundo ensaio de DHE.

4.1.2. Genótipos

Os genótipos de *C. annuum* var. *annuum* utilizados foram quatro linhas recombinadas identificadas como L₁, L₂, L₆ e L₈, candidatas à proteção, e a cultivar comercial Jalapeño M (*Topseed*). As linhagens foram obtidas no programa de melhoramento de *Capsicum* da UENF pelo método SSD (Figura 1).

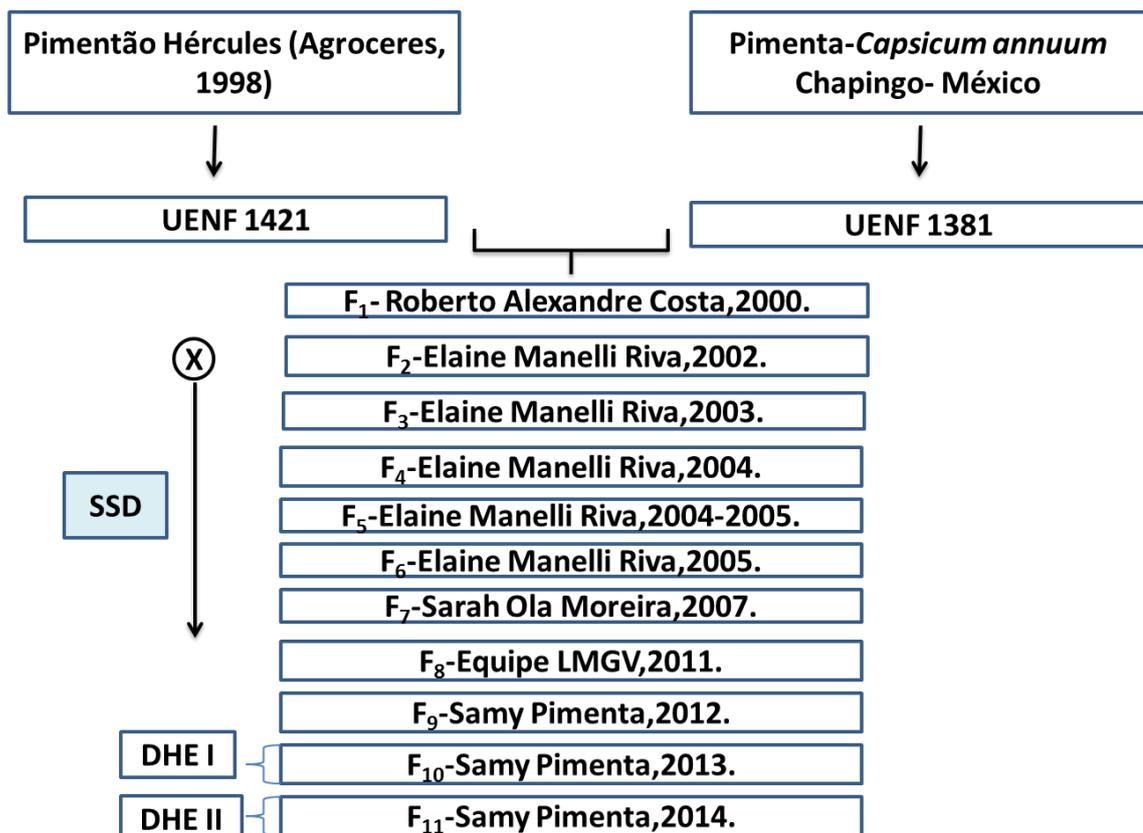


Figura 1. Genealogia do programa de melhoramento de *Capsicum* da UENF para obtenção de linhagens recombinantes resistentes à mancha bacteriana pelo método SSD. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

As linhagens correspondem à geração F₉ do cruzamento entre os acessos UENF 1421 e UENF 1381. O genitor feminino é suscetível à mancha bacteriana, com características de produção e qualidade do fruto que atendem ao mercado de pimentão. O genitor masculino é uma pimenta, fonte de resistência à mancha bacteriana, cujo controle genético se deve à presença de três genes recessivos (Riva et al., 2004). Após as gerações de endogamia conduzidas via SSD, as linhas recombinadas foram selecionadas para a resistência à mancha bacteriana e outros atributos (Moreira et al., 2009; Moreira et al., 2010).

Para obtenção das sementes necessárias para a realização dos ensaios de DHE, as linhagens foram multiplicadas, via proteção individual dos botões florais na pré-antese para garantir a autofecundação. Tal multiplicação foi realizada em casa de vegetação UAP/UENF.

As mudas para todos os ensaios foram produzidas em bandejas de poliestireno com 128 células contendo substrato comercial Vivatto[®] e mantidas em casa de vegetação. Foram semeadas de duas a três sementes por célula. Após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma plântula por célula. Ao atingirem de 10-15 cm de altura e quatro a seis folhas definitivas as mudas foram transplantadas para a área experimental de cada ensaio específico.

Para os experimentos envolvendo análises de atributos de qualidade dos frutos foram considerados apenas os frutos oriundos de plantas do segundo ensaio de DHE das linhagens L₆, L₈ e 'Jalapeño M', visto que estas linhagens foram atestadas como aptas à proteção e a 'Jalapeño M' serviu como testemunha de padrão comercial. Da mesma forma apenas estas linhagens foram avaliados via análise multivariada.

4.2. Descritores considerados

4.2.1. Ensaios de DHE

Foram avaliados descritores (01 ao 48) exigidos pelo SNPC (Tabela 1). Para avaliação dos descritores, foi utilizada a comparação lado a lado, na qual a distinguibilidade é baseada na observação direta dos genótipos nos testes em casa de vegetação. Nessa situação, não há mensuração. As características foram observadas visualmente, concedendo, uma nota por característica para cada cultivar envolvida no ensaio. Essa abordagem é utilizada para ensaios com

cultivares muito semelhantes, para espécies propagadas vegetativamente e plantas autógamas, nas quais, existe relativamente pouca variação entre as plantas da cultivar (Brasil, 2011). Os descritores comprimento da haste, comprimento, diâmetro e espessura do pericarpo do fruto, comprimento e espessura do pedúnculo foram mensurados com auxílio de fita métrica e/ou paquímetro.

Para os descritores ciclo até o florescimento e ciclo até a maturação foram contabilizados o número de dias para a abertura da primeira flor no segundo nó de floração em 50% das plantas e o número de dias para a mudança de coloração dos frutos em 50% das plantas, respectivamente.

A avaliação qualitativa, ou seja, quanto à presença ou ausência de capsaicina (descritor nº 46) foi realizada por meio da imersão de uma porção da placenta, de aproximadamente 1,0cm, distando retirada de regiões similares de frutos em uma solução de 3mL de vanadato de amônio de acordo com as modificações feitas no método de Derera (2000) por Riva (2006). Foram avaliados cinco frutos por planta. Após 24h, se houver escurecimento da placenta confirmase a presença de capsaicinoides.

Para a avaliação da homogeneidade, quando as plantas que compõem a cultivar são muito similares, como em plantas autógamas, a homogeneidade é avaliada pelo número de exemplares claramente distintos, sendo consideradas plantas atípicas (Santos e Pacheco, 2011). Assim, para a verificação da homogeneidade, foi utilizado o padrão de 2% com probabilidade de 95% de ocorrência para plantas fora de tipo, como determinado no Ato Nº 2, de 2006 (Brasil, 2006). Para ser considerada atípica, a planta deverá ser claramente distinta das outras que compõem a linhagem. Para considerar uma cultivar claramente distinta, é necessário partir do conceito de margem mínima, presente no artigo 3º, inciso III, da LPC: conjunto mínimo de descritores, a critério do órgão competente, suficiente para diferenciar uma nova cultivar ou uma cultivar essencialmente derivada das demais cultivares conhecidas (Santos e Pacheco, 2011).

Tabela 1. Descritores morfológicos de *Capsicum* avaliados em ensaios de DHE, conforme recomendação do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares para a proteção de cultivares de *C. annuum*. Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2015.

1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	25. Fruto: posição
2. Planta: posição das hastes	26. Fruto: comprimento
3. Planta: comprimento da haste	27. Fruto: diâmetro
4. Planta: entrenós curtos (na parte mais alta)	28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal
5. Planta: altura	29. Fruto: forma predominante da seção transversal
6. Planta: comprimento do entrenó (apenas cultivares sem entrenó curto)	30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	31. Fruto: textura da superfície
8. Folha: comprimento da lâmina	32. Fruto: coloração na maturidade
9. Folha: largura	33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade
10. Folha: coloração	34. Fruto: brilho
11. Folha: variegação	35. Fruto: profundidade da depressão peduncular
12. Folha: pigmentação antociânica	36. Fruto: forma do ápice
13. Folha: pilosidade	37. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares
14. Folha: rugosidade	38. Fruto: número predominante de lóculos
15. Flor: número de flores por axila	39. Fruto: espessura do pericarpo
16. Flor: posição do pedúnculo	40. Placenta: tamanho
17. Flor: coloração da corola	41. Pedúnculo: comprimento
18. Flor: mancha na corola	42. Pedúnculo: espessura
19. Flor: coloração da mancha na corola	43. Cálice: margem
20. Flor: coloração da antera	44. Cálice: constrição anelar
21. Flor: coloração do filamento	45. Cálice: aspecto
22. Flor: posição do estigma	46. Fruto: capsaicina na placenta
23. Fruto: coloração antes da maturação	47. Ciclo até o florescimento
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	48. Ciclo até a maturação
	49. Resistência à mancha bacteriana

Adicionalmente, foi incluso o descritor resistência à mancha bacteriana (descritor 49), visto que o programa de melhoramento tinha como objetivo a obtenção de cultivares resistentes a essa doença.

Para avaliação da resistência à mancha bacteriana nas linhagens, preparou-se o inóculo utilizando o isolado ENA 4135, caracterizado previamente como raça T₁P₃ (*Sensu* Jones et al., 1998). O isolado preservado em água foi recuperado, transferindo-se a suspensão bacteriana para placas de Petri, contendo meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986), com auxílio de alça de platina. Após a permanência em estufa bacteriológica por 48h a 28°C, as colônias bacterianas foram suspensas em água destilada e autoclavada, e sua concentração ajustada para 10⁸ ufc/mL com auxílio de espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 600 nm e absorvância de 0,300 ($A_{600} = 0,3$) (Quezado-Duval & Camargo, 2004). Em seguida, fez-se uma diluição em série até a concentração de 10⁵ ufc/mL. A inoculação foi realizada 15 dias após o transplântio, por meio da infiltração de suspensão bacteriana na superfície abaxial da folha previamente identificada, em uma área de aproximadamente 1,0 cm².

A avaliação da reação à mancha bacteriana foi realizada a partir do quinto dia após a inoculação, por meio de sete observações, com intervalo de um dia, conferindo notas de 1 a 5 para os sintomas no local da inoculação. A nota 1 conferida quando não havia nenhum sintoma visível; nota 2, quando o local de inoculação apresentava coloração amarelada; nota 3, aplicada quando as folhas estavam amareladas e com alguns pontos de necrose; nota 4, quando havia manchas necrosadas no local de inoculação e nota 5, quando a área inoculada estava totalmente necrosada (Figura 2). Ao final das avaliações, as plantas que receberam média das notas iguais ou inferiores a dois foram consideradas como resistentes e as que receberam notas superiores a esta, suscetíveis (Riva, 2006).

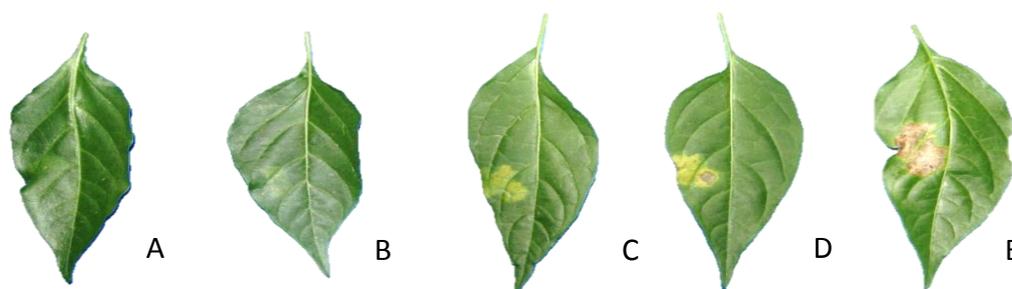


Figura 2. Escala de notas utilizada na avaliação da reação à mancha bacteriana. A- nota 1; B - nota 2; C - nota 3; D - nota 4 e E - nota 5. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

4.2.2. Atributos qualitativos dos frutos

Quatro descritores quantitativos propostos para *Capsicum* L. pelo International Plant Genetic Resources Institute, atualmente Bioversity International (IPGRI, 1995) foram considerados: comprimento (CMF) e diâmetro médio do fruto (DMF); espessura média do pericarpo (EMP) e teor de sólidos solúveis (TSS). Outros sete descritores foram adicionados a esta lista, que foram: acidez titulável (AT); relação (TSS/AT); teor de vitamina C em frutos imaturos e maduros (Vcl e VcM) e concentração de capsaicínides, capsaicina (C), dihidrocapsaicina (DHC) e a nordihidrocapsaicina (n-DRC).

Fez-se uso de paquímetro digital para mensurar os caracteres CMF, DMF e EMP. A determinação do TSS foi obtida a partir da extração de duas gotas de suco da amostra da polpa na região mediana do fruto. O suco foi extraído por prensa manual e depositado diretamente sobre o prisma de um refratômetro digital (ATAGO, modelo PR 201) e os resultados expressos em °Brix.

Determinou-se a acidez por método de titulação utilizando NaOH (0,1 N) pelo método 22.058 descrito pela AOAC (1992). Utilizou-se um titulador manual, através de uma bureta volumétrica de 50mL e um peagâmetro digital (*Scientec* versão 2.3). Em função de a polpa possuir coloração vermelha rosada que interfere na identificação da cor rósea apresentada pela viragem da fenolftaleína, foi utilizado o valor de pH 8,2 como indicação para o ponto final de titulação.

Efetou-se o corte dos frutos e pesagem de 15g, em seguida estes foram transferidos para um Becker (200mL) e o volume completado até 50mL com água deionizada que por fim foram triturados com um homogeneizador Turrtec TE 102 com rotação ajustada para 1800 RPM por 30s. Após este preparo seguiu-se a titulação das amostras. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido cítrico, sendo obtidos por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ AT} = \frac{\text{V} \times \text{N} \times \text{P}' \times 100}{\text{P}}$$

Sendo: AT= acidez titulável, em percentagem de ácido cítrico; V = volume de NaOH gasto com a titulação, em ml; N = normalidade do NaOH = 0,1; P' = miliequivalente do ácido cítrico (0,064); P = volume da amostra (ml).

Cinco frutos maduros foram colhidos, para cada genótipo, e secos utilizando um forno de circulação de ar forçado. A extração foi realizada em banho de ultra-sons de 160 W (Cristófoli EQM-CF, Brasil), frequência 42 kHz, ligada a um controlador de temperatura, o que permitiu que a água do banho fosse renovada. Quantidade de amostra (1g) e volume do solvente (25 ml) na extração foram previamente estabelecida de acordo com Barbero et al. (2008). Os extratos foram filtrados e secos no evaporador rotativo.

As curvas de calibração foram preparadas para capsaicina (C), dihidrocapsaicina (DHC) e nordihidrocapsaicina (n-DHC), que são padrão de capsaicinoides (obtidos a partir de Merck Millipore) e responsável por até 90% de pungência de frutos da pimenta (Zhang et al., 2010). Para todas as análises, as amostras foram preparadas por dissolução de 10mg de pimenta em 1mL de metanol. O acetonitrila e o ácido acético foram adquiridos à Tedia Brasil.

A separação por HPLC foi realizada usando um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20AT acoplado a um detector SPD-20A de arranjo de diodos (DAD) (forno de coluna CTO-20A, módulo de comunicações CBM-20A) e amostrador automático. A coluna de fase reversa usada foi Betasil Thermo C18 (25 cm, 4,6 mm, 5 mm) com a fase móvel consistida de água contendo ácido acético a 1% (A) e acetonitrila (B) com 20mL (cada amostra) volume de injeção. As amostras foram corridas durante 15min a um fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a absorbância foi monitorada entre 250-300nm. Foi utilizado o método isocrático consistindo em acetonitrila (60%). Os compostos foram quantificados a partir de uma curva de calibração para a capsaicina, dihidrocapsaicina e nordihidrocapsaicina as quais foram realizadas em três repetições de cinco concentrações ($0,02\text{-}0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Cinco caracteres qualitativos, seguindo descritores exigidos pelo MAPA para a proteção de novas cultivares de *Capsicum* L. (Brasil, 2006), também foram considerados. Os caracteres foram: coloração antes da maturação (CAM); textura da superfície do fruto (TSF); coloração do fruto na maturidade (CFM); intensidade da coloração na maturidade (ICM) e brilho do fruto. O registro destes descritores foi realizado por observações feitas com base no julgamento do avaliador, por meio de observações visuais que incluíram pontos de referência, diagramas e comparações lado a lado entre as linhagens. Cinco frutos por planta de cada parcela foram avaliados, totalizando 175 frutos por linhagem.

4.2.3. Caracterização molecular

4.2.3.1. Marcador AFLP

Folhas novas das linhagens L₆, L₈ e 'Jalapeño M', do mesmo estágio de desenvolvimento foram amostradas. Todo o material foi disposto em sílica gel, e mantido em dessecador por no mínimo cinco dias, até a secagem total das folhas. Aproximadamente 150mg de folhas seca foram pesadas em microtubos e trituradas utilizando o aparelho MM400 (Retsch), com frequência de 30/s, por 5m.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo modificado de Ferreira e Grattapaglia (1998) com a utilização de tampão CTAB associado à precipitação com isopropanol. Todas as amostras foram tratadas com RNase. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Já a concentração e a pureza foram determinadas por espectrofotometria, utilizando-se o NanoDrop[®] 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizadas amostras que apresentaram razões A₂₆₀/A₂₈₀ nm entre 1.8 e 2.0.

A técnica de AFLP foi realizada seguindo o protocolo descrito por Vos et al. (1995), com modificações. Aproximadamente, 700ng de DNA de cada acesso foram duplamente digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *MseI* (5U cada), em presença de 2ul de tampão de ensaio *MseI* 10X, com volume final de 20ul, incubados por 18hs a 37°C.

Os fragmentos gerados foram ligados aos adaptadores, *EcoRI* (0,5µM) e *MseI* (5 µM), com a enzima T4 DNA ligase (1U); tampão T4 DNA ligase 1X; NaCl (0,05 M); BSA (50 ng/µL); DTT (0,25 mM) para um volume final de 10µL. A reação foi incubada a 37°C por 3hs, 17°C por 30min e 70°C por 10min, em termociclador. Após a confirmação da amplificação da PCR por eletroforese em gel de agarose 1%, o produto amplificado foi diluído 1:4 vezes em água ultrapura.

Posteriormente, os fragmentos foram amplificados com um par de *primers* pré-seletivo contendo uma base seletiva. A amplificação pré-seletiva foi realizada para um volume final de 10µL, utilizando 3,5µL do kit GoTaq[®] *Green Master Mix* (Promega); 0,58uL do *primer* pré-seletivo (4,75µM); e 3,0µL da diluição da reação de restrição/ligação. A programação do termociclador consistiu de: 2min a 72°C, seguidos de 20 ciclos de 1 segundo a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 min a 72°C, e por fim, 30min a 60°C. A confirmação da PCR pré-seletiva foi obtida em gel de agarose 1% e o produto amplificado foi diluído 1:16 vezes em água ultrapura.

Para a amplificação seletiva foi utilizado 2,5µL do pré-seletivo diluído, composta de 0,54µL de cada *primer* seletivo de *MseI* (5 µM) e *EcoRI* (1 µM); 3,5µL GoTaq® *Green Master Mix* (Promega), para um volume final de 10µL. As reações para o seletivo foram realizadas, no termociclador, da seguinte maneira: ciclo inicial de 2 min a 94°C; 30 segundos a 65°C e 2 min a 72°C; 8 ciclos de 1 segundo a 94°C, 30 segundos a 64°C e 2 min a 72°C, decrescendo 1°C a cada ciclo; 23 ciclos de 1 segundo a 94°C, 30 segundos a 56°C e 2 min a 72°C, e por fim, 30 min a 60°C. Foram testados sete combinações de *primers EcoRI* e *MseI* (E-ACA/M-CAC, E-AAC/M-CTA, E-ACC/M-CTA, E-ACC/M-CAA, E-AAG/M-CTA, E-AGG/M-CAC, E-ACG/M-CAA), contendo três nucleotídeos seletivos, observados em gel de poliacrilamida 7%.

Das combinações testadas, três que permitiram o maior número de bandas polimórficas detectadas foram selecionadas (E-ACA/M-CAC, E-ACC/M-CAA, E-ACG/M-CAA), os *primers EcoRI* agora marcados com fluoróforos foram submetidos a eletroforese capilar em sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems).

Os tamanhos dos fragmentos gerados foram determinados em relação ao GeneScan™ 500 ROX® (Applied Biosystems) utilizado como um padrão para os fragmentos entre 35 a 500 pb. O resultado da eletroforese dos fragmentos foram combinados em uma matriz binária pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

4.2.3.2. Marcador SSR

Os iniciadores foram selecionados com base em informações disponíveis na literatura (Minamiyama et al., 2006; Barchi et al., 2007). Foram utilizados 19 iniciadores SSR (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas para um volume final de 13 µL, contendo: 2µL de DNA, 1,5µL do tampão, 1,5µL de dNTPs, 1,0µL do *primer*, 0,12µL da enzima Taq polimerase e 5,88µL de água ultrapura. Foram aplicadas 2 µL de DNA, e posteriormente adicionado 11 µL do mix descrito anteriormente. Para coloração foi adicionado 8 µL da mistura *gel red* e *blue juice* na concentração 1:1.

Tabela 2. Iniciadores de SSR utilizados para diferenciação de duas linhagens recombinadas de *Capsicum annuum* var. *annuum* e da cultivar Jalapeño M, adaptado de Minamiyama *et al.*, 2006. Campos dos Goytacazes, UENF, 2015.

Marcador SSR	Foward Primer	Reverse Primer
CAMS-051	acccagttccctttcttgg	gaaggttagcggatgaacg
CAMS-070	cccgcgaaatcaaggtaat	aaagctattgctactgggttcg
CAMS-072	cccgcgaaatcaaggtaat	aaagctattgctactgggttcg
CAMS-081	gttgggggagagttgggtat	tggggtgaacactagcatgt
CAMS-095	cgctagcatgacactcaagg	aaacggcaaggctacacatc
CAMS-101	tcagcaattaacatgccaaaa	tggattgggagaagatcgac
CAMS-117	ttgtggaggaaacaagcaaa	cctcagcccaggagacataa
CAMS-142	gagcgcttaagtggatcatagg	ctacaacgccccaaaacaat
CAMS-153	tgcaaaaatgaatcccaaga	aagtcagcaaacacatctgacaa
CAMS-163	tccatatagcccgtgtgtga	gcgtgggaatacaatgctaga
CAMS-177	attcttaccctgcctgtg	ctcaggagatgtcccacgat
CAMS-191	cccgaatccaagtcattgag	taaaccgggtccctttcct
CAMS-227	ttgtccttaattcaccttttga	gcatcaaaaataaggataaagttatgg
CAMS-236	ttgtagtttgcgtaccatttga	atgaatccaggggtccacaa
CAMS-237	ccttcccttgaaattgatattttac	tcccctatcactcacatctgc
CAMS-309	gaaaatcgaccggttttga	tcaattcggacaaaattagcaa
CAMS-327	gcatctaagtctacgcccttg	aaagcctttggcaatgaaca
CAMS-405	ttcttgggtcccacacttc	aggttgaaaggagggaata
CAMS-460	cctttcacttcagcccacat	accatccgctaagacgagaa

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.

4.3. Análise das variáveis

4.3.1. Ensaios de DHE

Para a descrição e a comparação das linhagens dos ensaios de DHE, foi utilizada a estatística descritiva com base na moda, que se constitui no valor mais frequente em um conjunto de variáveis, das notas atribuídas a cada genótipo. O preenchimento do relatório técnico descritivo de obtenção de cultivar exigido para o pedido de proteção instrui para a comparação de apenas uma cultivar candidata com a testemunha em cada relatório (Brasil, 2006). Porém, é permitida a utilização de várias testemunhas em um ensaio de DHE. Neste trabalho, as linhagens candidatas à proteção foram comparadas com a testemunha comercial ('Jalapeño M') e serviram de testemunhas quando comparadas entre si.

4.3.2. Atributos de qualidade dos frutos

Para os caracteres quantitativos as variáveis coletadas foram submetidas ao teste de normalidade de Lilliefors para verificação da distribuição normal, em seguida foi realizada uma análise de variância individual, segundo modelo:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

Sendo: Y_{ij} : observação obtida na parcela com i -ésimo genótipo; μ : constante geral; G_i : efeito fixo do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, g$); e_{ij} : erro aleatório associado à observação Y_{ij} NID $(0, \sigma^2)$.

Com a escala de notas observadas para resistência à mancha bacteriana as plantas que receberam médias das notas iguais ou inferiores a dois foram consideradas como resistentes, enquanto as que receberam notas superiores a esta eram suscetíveis.

As médias das linhagens foram analisadas utilizando o teste de comparação múltipla Dunnett ($p \leq 0,05$). Para o processamento destas variáveis utilizou-se o Programa Genes (Cruz, 2013). Para variáveis qualitativas, a descrição e a comparação das linhagens foram feitas utilizando-se a estatística descritiva com base na moda.

4.3.3. Análise Multivariada

A análise das variáveis foi dividida em três partes, a saber: a primeira foi relativa à obtenção da distinção genética por meio das variáveis obtidas pela análise dos marcadores, AFLP e SSR. Para os dados moleculares, com as bandas geradas de cada iniciador, foi construída a matriz binária, utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Segundo Cruz & Carneiro (2003), índice de Jaccard é dado por:

$$S_{ii'} = a / a+b+c$$

Em que: a = valor que quantifica o número de coincidência do tipo 1-1 para cada par de genótipos; b = valor que quantifica o número de coincidência do tipo 1-0 para cada par de genótipos; c = valor que quantifica o número de coincidência do tipo 0-1 para cada par de genótipos. Assim como para as variáveis multicategóricas, utilizou-se o complemento (1- $S_{ii'}$) na construção da matriz de dissimilaridade para dos dados binários entre as linhagens.

Na segunda parte obteve-se a matriz de distância relativa às variáveis multicategóricas avaliadas nos ensaios de DHE (Tabela 1). E por último obteve-se uma matriz conjunta de distância genética, considerando todas as variáveis avaliadas, moleculares e morfológicas. Tanto para a análise individual para o DHE quanto para a análise conjunta utilizou-se o algoritmo de Gower (1971). A estimação das matrizes de distância foi realizada utilizando o programa R (<http://www.r-project.org>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de DHE

Não se verificou diferenças entre as linhagens e a testemunha comercial em pelo menos 28 dos 49 descritores avaliados nos dois ensaios (Tabela 3). Tais descritores foram: posição da haste, entrenós curtos, número de entrenós, largura, coloração verde, variegação, pigmentação antociânica da folha, número de flores por axila, coloração da corola, mancha na corola, coloração da antera, coloração do filamento, intensidade e coloração dos frutos antes da maturação, posição, diâmetro, textura da superfície, coloração na maturidade, profundidade da depressão peduncular, forma do ápice, profundidade dos sulcos interoculares e número predominante de lóculos dos frutos, tamanho da placenta, comprimento e espessura do pedúnculo, aspecto e constrição do cálice, ciclo até a maturação. Dois descritores, comprimento do entrenó (descriptor nº 6) e coloração da mancha da corola (descriptor nº 19), não puderam ser avaliados, pois estes caracteres foram ausentes nas linhagens testadas. Mancha na corola é tipicamente observado apenas em *C. baccatum*, *C. praetermissum* e ausente em *C. annuum* var. *annuum* (Mcleod et al., 1982).

Tabela 3. Descritores morfológicos de *Capsicum* avaliados em ensaios de DHE, conforme recomendação do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares para a proteção de cultivares de *C. annuum*. Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2015.

Descritores	Cultivar exemplo				Código da Cultivar						
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈		
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2. Planta: posição das hastes	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta	Ereta
3. Planta: comprimento da haste	Médio	Médio	Médio	Longo	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio
4. Planta: entrenós curtos	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
5. Planta: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três	Mais de três

Tabela 3, Cont.

Descritores	Cultivar exemplo		Código da Cultivar								
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈		
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	
6. Apenas cultivares sem entrenó curto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	Muito forte	Muito forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte
8. Folha: comprimento da lâmina	Longo	Longo	Médio	Longo	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio	Médio
9. Folha: largura	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média
10. Folha: coloração verde	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura
11. Folha: variegação	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
12. Folha: pig. antociânica	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Tabela 3, Cont.

Descritores	Cultivar exemplo				Código da Cultivar					
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈	
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio
13. Folha: pilosidade	Ausente	Ausente	Ausente	Densa	Ausente	Ausente	Média	Média	Ausente	Ausente
14. Folha: rugosidade	Fraca	Fraca	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15. Flor: número de flores por axila	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma	Uma
16. Flor: posição do pedúnculo	Pendente	Pendente	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.
17. Flor: coloração da corola	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca
18. Flor: mancha na corola	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19. Flor: coloração da mancha na corola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20. Flor: cor antera	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul

Tabela 3, Cont.

Descritores	Cultivar exemplo				Código da Cultivar						
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈		
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	
21. Coloração do filamento	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca	Branca
22. Flor: posição do estigma	Excerto	Excerto	Inserto	MN	Inserto	Inserto	Excerto	Excerto	Inserto	Inserto	Inserto
23. Fruto: coloração antes da maturação	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura
25. Fruto: posição	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.
26. Fruto: comprimento	Médio	Médio	Médio	Longo	Médio	Médio	Curto	Curto	Médio	Médio	Médio
27. Fruto: diâmetro	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno	Pequeno
28. Fruto: forma da seção longitudinal	Ovalada	Ovalada	Elíptica	ET	Elíptica	Elíptica	Triang.	Triang.	Elíptica	Elíptica	Elíptica

Tabela 3, Cont.

Descritores	Cultivar exemplo				Código da Cultivar					
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈	
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio
29. Fruto: forma predominante da secção transversal	Arred.	Arred.	Elíptica	Ang.	Elíptica	Elíptica	Ang.	Ang.	Elíptica	Elíptica
30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal	MF	MF	Média	Média	MF	MF	Fraca	Fraca	MF	MF
31. Fruto: textura da superfície	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
32. Fruto: coloração na maturidade	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.	Verm.
33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade	Média	Média	Média	Média	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura	Escura

Tabela 3, Cont.

Descritores	Cultivar exemplo				Código da Cultivar						
	Jalapeño M		L ₁		L ₂		L ₆		L ₈		
	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	1ºensaio	2ºensaio	
34. Fruto: brilho	Forte	Forte	Forte	Fraco	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte	Forte
35. Fruto: profundidade da depressão peduncular	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF	A/MF
36. Fruto: Forma do ápice	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.	Arred.
37. Fruto: profundidade dos sulcos interoculares	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média	Média
38. Fruto: número predominante de lóculos	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três	Dois e três
39. Espessura do pericarpo	Grossa	Grossa	Média	Fina	Média	Média	Fina	Fina	Média	Média	Média

Tabela 3, Cont.

40. Placenta: tamanho	Grande									
41. Pedúnculo: comprimento	Médio									
42. Pedúnculo: espessura	Média									
43. Cálice: margem	Dentada	Dentada	Inter.	Inter.	Inter.	Inter.	Dentada	Dentada	Inter.	Inter.
44. Cálice: constrição	Presente									
45. Cálice: aspecto	Envol.									
46. Fruto: capsaicina na placenta	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
47. Ciclo até o florescimento	Precoce	Precoce	Média							
48. Ciclo até a maturação	Média									
49. Reação à mancha bacteriana	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R

Inter.- intermediária; MN- mesmo nível; ET- estreito triangular; Triang.-triangular; Arred.-arredondada; Ang.- angulada; Verm.- vermelha; A/MF- ausente ou muito fraca; MF- muito fraca; Envol.- envolvente; S- suscetível; R- resistente.

A ausência de diferenciação em muitos dos 28 caracteres já era esperada visto que descritores específicos para flores, por exemplo, são mais úteis na discriminação entre espécies, o que não é o caso deste trabalho, em que todos os genótipos são representantes de *C. annuum* var. *annuum* L.. Flores desta espécie se caracterizam pela coloração branca, sem manchas na corola e uma flor por nó (Bosland, 1996).

Descritores como coloração verde da folha, intensidade e coloração dos frutos antes e após a maturação, por exemplo, podem gerar falta de homogeneidade e estabilidade pela simples troca de avaliador dentro de um ensaio ou ainda de um ciclo de cultivo para o outro, já que se trata de uma análise subjetiva relacionada à visualização de cores, sem a utilização de tabelas ou referências específicas para auxiliar a observação. Como consequência dessa subjetividade, devem-se ressaltar pontos importantes na utilização dos descritores: o avaliador deve ter conhecimentos específicos sobre a cultura, e deve-se dar preferência a um mesmo avaliador, a fim de se garantir uma padronização nas avaliações. O avaliador dos ensaios de DHE deve adotar um mesmo padrão de precisão e repetição no preenchimento dos descritores em um ensaio de DHE, assegurando assim a confiabilidade dos resultados (Gilliland & Gensollen, 2010).

Não foi possível distinguir a linhagem L₁ de 'Jalapeño M' com base em 33 dos 48 descritores. No entanto diferiu em 15 descritores. Alguns descritores como comprimento da haste, comprimento da lâmina foliar, pilosidade e capsaicina na placenta não foram homogêneos no primeiro ensaio. Porém, para o segundo ensaio esta homogeneidade foi confirmada. A falta de homogeneidade no primeiro ensaio resultou em ausência de estabilidade, observada nos dois ensaios (Tabela 3). A homogeneidade é assegurada aceitando-se o padrão de 1% com probabilidade de 95% para ocorrência de plantas atípicas em cultivo protegido (Brasil, 2006). A estabilidade é atestada quando a descrição de suas características essenciais é mantida em sucessivos ciclos. A falta de homogeneidade e estabilidade desses descritores culminou em uma não adequação dos requisitos exigidos para a proteção desta linhagem.

Verificou-se também a falta de homogeneidade para a linhagem L₂ nos descritores forma predominante da seção longitudinal e da transversal do fruto, além do brilho e capsaicina na placenta do fruto, observando-se um número

acima do permitido de plantas atípicas no primeiro ensaio. Porém, o mesmo não ocorreu no segundo ensaio, durante o qual se constatou homogeneidade para L₂. Apesar disso, considerando a análise por Moda utilizada para classificar cada descritor, não se detectou falta de estabilidade para esta linhagem. A experiência em processos de proteção de cultivares no Brasil tem mostrado que na maioria dos casos uma cultivar homogênea será estável (Santos & Machado, 2011). Porém, para essa linhagem a estabilidade não teve relação com a homogeneidade.

A avaliação de estabilidade em variedades autógamas possibilita a comprovação dos níveis de homozigose e a ausência de contaminantes (Brasil, 2006). Possivelmente a falta de homogeneidade e estabilidade detectada nas linhagens L₁ e L₂ podem estar associadas a uma contaminação por mistura de sementes, uma vez que, todas as linhagens se encontravam em um nível avançado de homozigose, na geração F₉.

Para a linhagem L₆, 31 descritores foram idênticos em classificação com a testemunha. Porém, 16 descritores possibilitaram a distinção da L₆ em relação à 'Jalapeño M' (Tabela 3). Entre esses se pode dar ênfase ao descritor capsaicina na placenta do fruto (descritor nº 46), por não ter sido detectada capsaicina nos frutos desta linhagem. Tal descritor possibilita a classificação da L₆ como uma pimenta do tipo "doce", o que pode ser um produto interessante, uma vez que não só as pimentas pungentes agradam aos consumidores, havendo um nicho de mercado para consumo de pimenta *in natura* com sabor mais suave, menos pungente e mais aromática (Henz, 2004), ou ainda sem pungência, mas com aroma típico. Além da comprovação da distinção, houve homogeneidade e estabilidade para todos os descritores avaliados, assim esta linhagem poderá ser protegida.

De acordo com Machado (2011), um descritor útil nos ensaios de DHE é aquele que permite a diferenciação entre os genótipos candidatos. Neste contexto, 13 descritores foram considerados úteis na distinção da L₈ em relação à testemunha (Tabela 3). A homogeneidade e estabilidade também foram obtidas para esta linhagem. Os descritores forma predominante da seção longitudinal do fruto (descritor nº 28) e resistência à mancha bacteriana (descritor nº 49) foram importantes na diferenciação desta linhagem em comparação com 'Jalapeño M'. Para a linhagem L₈ verificou-se presença de capsaicina (descritor nº 46) nos

frutos, um atributo importante na qualidade dos frutos e um dos motivos das pimentas serem apreciadas (Bosland & Baral, 2007).

O formato do fruto (descriptor nº 28) foi de grande importância na distinção das linhagens candidatas à proteção, sendo que apenas as linhagens L₂ e L₈ receberam a mesma classificação para esta característica. A testemunha comercial foi classificada como fruto ovalado, enquanto a L₁ variou para este descriptor, considerando-se os dois ensaios: no primeiro foi classificada como elíptica e no segundo como formato estreito triangular; a L₆, por sua vez, foi considerada triangular, enquanto L₂ e L₈ foram classificadas como elíptica (Figura 3). Uma das características dos frutos de *Capsicum* L. é a grande variabilidade observada para o formato dos frutos. Esse caráter bem como outros relativos ao fruto como cor, textura, brilho e presença de capsaicina são importantes para o mercado, por serem as características observadas pelo consumidor no momento da compra desses vegetais (Frank et al., 2001; Filgueira, 2012).

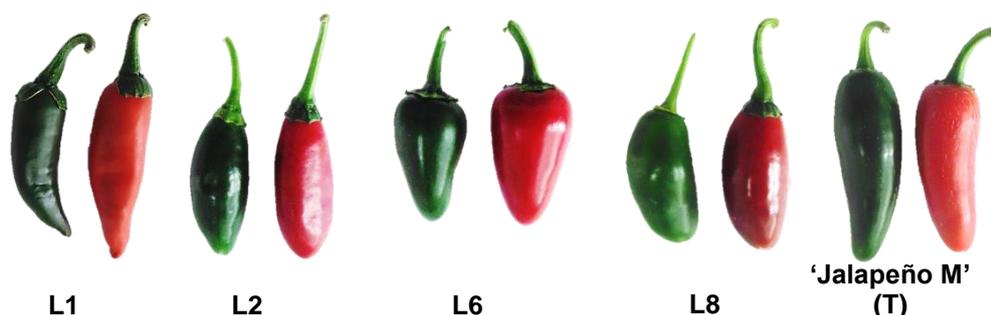


Figura 3. Formato e coloração dos frutos de *C. annuum* var. *annuum* avaliados no segundo ensaios de DHE, sendo: T = Testemunha ('Jalapeño M', fruto ovalado); Linhagens candidatas à proteção: L₁ (fruto estreito angular); L₂ e L₈ (fruto elíptico); L₆ (fruto triangular). Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2014.

É importante ressaltar que o descriptor adicionado (descriptor nº 49), que visa à identificação da resistência à mancha bacteriana, se tornou, neste trabalho, o principal descriptor entre os avaliados, pois permitiu a diferenciação entre todas as linhagens candidatas com a testemunha (Figura 4). Além disso, este descriptor por si só possibilitaria a distinção destas novas linhagens com qualquer outra testemunha desta espécie, uma vez que não há cultivares de pimenta *C. annuum* L. com esta característica protegidas ou registradas no Brasil até a presente data (Brasil, 2014). A adição de descritores de resistência a doenças em ensaios de

DHE é permitida, desde que seja assegurada a consistência dos resultados pelo uso de métodos apropriados de avaliação (Lovato, 2011).



Figura 4. Folhas de *C. annuum* var. *annuum* com ausência de sintomas de mancha bacteriana (L_6 e L_8) e com sintomas (T), demonstrando a resistência e suscetibilidade, respectivamente. Sendo: L_6 e L_8 linhagens candidatas à proteção e T = Testemunha ('Jalapeño M'). Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2014.

Por se tratar de linhagens oriundas do mesmo cruzamento biparental, há necessidade de se observar características morfológicas que possibilitem a diferenciação entre as mesmas, além dos caracteres agrônômicos utilizados durante as etapas finais de seleção dessas linhagens no programa de melhoramento, conforme efetuado por Moreira et al. (2009) e Moreira et al. (2010). Os descritores utilizados nos ensaios de DHE possibilitaram a distinção entre estas linhagens. Apenas a L_2 e L_8 obtiveram as mesmas classificações, não sendo possível diferir entre as duas linhagens com os descritores utilizados, apesar de ensaios de campo indicar diferenças entre elas. Porém, apenas L_8 está apta à proteção, visto que a L_2 não obteve a homogeneidade requerida. No geral, os principais descritores que comprovam a diferenciação entre as linhagens foram: forma predominante da seção longitudinal e transversal dos frutos, além da presença ou ausência da capsaicina na placenta (Tabela 3).

Alguns descritores foram considerados de certa dificuldade de uso, por serem totalmente dependentes da consideração do avaliador, devido ao tipo de classificação proposta. Como exemplo tem-se comprimento (descriptor nº 26), diâmetro (descriptor nº 27) e espessura do pericarpo (descriptor nº 39) do fruto. Apesar de serem de caráter quantitativo e influenciado por diversos fatores ambientais, a avaliação desses descritores segundo as normas para os ensaios de DHE, estabelece uma análise qualitativa. Dessa forma, os valores observados devem ser incluídos em intervalos de classes, sem, no entanto, haver uma

especificação sobre o valor da diferença métrica que separa as notas determinadas nas diferentes classes para caracterizar a distinção entre os genótipos em teste. Portanto, a classificação fica a critério do avaliador e pode ser diferente entre avaliadores distintos. No caso de descritores relativos ao ciclo até o florescimento e até a maturação (descriptor nº 47), diferença de dias pode ser ou não considerada suficiente para determinar se uma cultivar é precoce, média ou tardia. No caso desses descritores, um critério prévio precisa ser estabelecido para normatizar as classificações.

Um ponto importante na execução do ensaio de DHE está na escolha da testemunha, visto que a opção por uma cultivar com características totalmente diferentes das pré-candidatas à proteção poderia garantir esta proteção. Entretanto, de acordo com Aviani e Machado (2011) deve-se escolher como testemunha nos ensaios comparativos de DHE, cultivares muito parecida com as linhagens em teste. Para atender a essa determinação, neste trabalho optou-se pela escolha de uma cultivar registrada no Brasil com algumas características semelhantes com as linhagens candidatas à proteção. Prova disso, é que quando se comparam todas as linhagens com a testemunha, cerca de 60% dos descritores avaliados receberam a mesma classificação. As duas únicas cultivares protegidas de pimenta no Brasil até esta data possuem características diferentes das linhagens aqui avaliadas (Carvalho et al., 2009), além de não serem resistentes à mancha bacteriana, assim não foram utilizadas como testemunhas neste trabalho.

Apesar do grande número de descritores exigidos para a proteção de espécies de *Capsicum* L., poucos foram considerados eficientes para a distinção entre genótipos da espécie *C. annuum* var *annuum*. Entretanto, esses descritores são úteis na verificação de similaridade entre as linhagens candidatas à proteção e genótipos comerciais. Além disso, alguns descritores, como: número de flores por axila, coloração da corola, mancha na corola e coloração da mancha na corola não necessitariam de serem avaliados quando se executam ensaios de DHE para genótipos da espécie *C. annuum* var. *annuum*, uma vez que estes não devem variar visto que são características típicas para a identificação da espécie.

Outro aspecto que deve ser considerado trata da distinguibilidade requerida entre as linhagens. Um ponto que não é considerado pelas normas vigentes para a proteção e que talvez seja o mais importante na comprovação da

distinguíbilidade seja a origem das novas linhagens candidatas à proteção. Se as linhagens em questão forem oriundas de um programa de melhoramento consolidado, pelo qual a execução das etapas de obtenção dos genótipos seja corretamente efetuada, essas linhagens certamente atenderão ao quesito de distinguíbilidade, ou seja, serão novas variedades vegetais distintas das já existentes. A única exceção, neste caso, se relaciona com as cultivares essencialmente derivadas.

A acessibilidade às informações a respeito da proteção de cultivares no Brasil pode ser considerada suficiente pela ótica de quem se interessa pelo assunto, uma vez que esclarecimentos quanto à LPC são bem divulgadas na *webpage* do MAPA e por algumas publicações específicas. Além disso, o contato com o Serviço Nacional de Proteção de Cultivares é fácil, a equipe de técnicos é solícita, e as informações prestadas são esclarecedoras. Entretanto, poucos trabalhos acadêmicos relatam as etapas de ensaios de DHE para as diferentes espécies de interesse agrícola, bem como suas dificuldades e obstáculos, embora existam centenas de cultivares protegidas relacionadas na página eletrônica do MAPA. A divulgação científica dessas informações podem ser úteis para fomentar debates para a otimização dos procedimentos de proteção, além de servirem para orientar os novos melhoristas ainda em fase de formação profissional.

A realização de ensaios de DHE, embora trabalhosa, é muito importante para assegurar que apenas novos genótipos sejam protegidos, garantindo os direitos dos obtentores das novas variedades. É também um protocolo que completa a formação de um melhorista de plantas, que deve estar apto para gerar novos produtos com potencial para serem efetivamente utilizados pelos agricultores.

Como observada as linhagens L₆ e L₈ estão aptas à proteção, assim sendo foram preenchidos os formulários exigidos pelo MAPA (em anexo) junto com a denominação proposta, por essa fica denominada a L₆ como 'UENF Carioquinha' e L₈ como 'UENF Carioca'.

5.2. Atributos qualitativos dos frutos

Para os descritores quantitativos verificou-se diferença altamente significativa ($p \leq 0,01$) para os caracteres CMF; DMF; EMP; TSS; AT; VcM; C; n-DHC e significativa ($p \leq 0,05$) para os caracteres SST/AT; Vcl e DHC. Os

coeficientes de variação (CV) variaram de 4,87 a 25,86 para estes caracteres avaliados (Tabela 4). O coeficiente de variação é um parâmetro útil para especificar com certa eficiência a exatidão dos resultados experimentais permitindo comparações entre variáveis de naturezas distintas e fornecendo uma ideia de precisão. Segundo Silva et al. (2011) valores de CV relativo aos caracteres CMF, DMF e EMP em frutos de pimentas podem ser classificados como baixos ($CV < 13\%$). Para as outras variáveis com $CV < 23\%$ consideram-se como médio. Para a ANOVA dos caracteres C; DHC e n-DHC utilizou-se resultados apenas da linhagem L₈ e 'Jalapeño M', uma vez que a L₆ não foi constatada a presença destes metabólitos.

As médias das linhagens para os caracteres CMF DMF e EMP foram de 48,66; 21,76 e 2,87 mm, respectivamente (Tabela 4). Não houve diferença entre as médias do CMF e do DMF da linhagem L₈ quando comparada com a testemunha comercial (Tabela 5) indicando que frutos da linha recombinada possuem comprimento e diâmetro dos frutos similares ao padrão do tipo Jalapeño. Em geral, frutos deste tipo possuem valores de comprimento variando entre 50 a 80 mm e o diâmetro em torno de 30 mm (Oliveira et al., 2000). Já na espessura do pericarpo do fruto verificou-se superioridade na média da testemunha em relação às linhas recombinadas.

Tabela 4. Análise de variância para características quantitativas relativos aos frutos avaliados em duas linhagens recombinadas e uma cultivar de pimenta (*Capsicum annuum* var. *annuum*), Campos dos Goytacazes-RJ, 2014.

FV	GL	CMF	DMF	EMP	TSS	AT	SST/AT	Vcl	VcM	C	DHC	n-DHC
		QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM	QM
Genótipo	2	418,2**	18,4**	2,9**	6,6**	0,02**	586,60*	4706,3*	25893,8**	363,4**	81,6*	30,4**
Erro	12	19,01	1,00	0,15	0,37	0,002	72,63	836,67	743,50	2,41	3,63	0,19
CV		11,53	4,87	9,49	5,65	17,02	20,58	25,86	18,20	10,49	19,3	5,51
Média		48,66	21,76	2,87	9,52	0,248	40,66	127,36	162,26	14,79	9,85	7,9

(**) significativo em nível de 1% e (*) 5% pelo teste F. CMF- comprimento médio do fruto (mm); DMF- diâmetro médio do fruto (mm); EMP- espessura média do pericarpo (mm). TSS- sólidos solúveis (°Brix); AT- acidez titulável (% ácido cítrico); SS/AT- relação sólidos solúveis pela acidez titulável; Vcl- teor de vitamina C frutos imaturos, mg/100g; VcM- teor de vitamina C frutos maduros mg/100g; C- capsaicina (µg/10mg); DHC- dihidrocapsaicina (µg/10mg); n-DHC- nordihidrocapsaicina (µg/10mg).

Tabela 5. Média e teste de comparação múltipla Dunnett para características de fruto avaliadas em duas linhagens recombinadas e uma cultivar de pimenta (*C. annuum* var. *annuum*). Campos dos Goytacazes-RJ, 2014.

Genótipo	CMF	DMF	EMP	TSS	AT	SS/AT	Vcl	VcM	C	DHC	n-DHC
	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.	Med.
L₆	35,22	23,79	2,26	10,1 a	0,32	32,3	148,7	204,6	0	0	0
L₈	53,01 a	21,55 a	2,61	8,18	0,23 a	36,6	141,2	202,9	13,05	21,53	9,85
'Jalapeño M'	57,76 a	19,68 a	3,74 a	10,2 a	0,19 a	52,9 a	92,21 a	79,2 a	6,66 a	8,05 a	5,95 a

CMF- comprimento médio do fruto (mm); DMF- diâmetro médio do fruto (mm); EMP- espessura média do pericarpo (mm). TSS- sólidos solúveis (°Brix); AT- acidez titulável (% ácido cítrico); SS/AT- relação sólidos solúveis pela acidez titulável; Vcl- teor de vitamina C frutos imaturos, mg/100g; VcM- teor de vitamina C frutos maduros mg/100g C- capsaicina (µg/10mg); DHC- dihidrocapsaicina (µg/10mg); n-DHC- nordihidrocapsaicina (µg/10mg). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett (p<0,05).

Observou-se variabilidade entre as linhagens avaliadas para o teor de sólidos solúveis. Na linhagem L₆ e em 'Jalapeño M' constatou-se maiores valores de TSS (Tabela 5). Maiores valores para TSS contribuem para maior qualidade dos frutos, uma vez que esse caráter está diretamente relacionado à quantidade de sacarose em soluções puras (Mendonça et al., 2007). Ghasemnezhad et al. (2011) afirmam que o TSS em frutos de pimentão (*C. annuum* var. *annuum*) aumenta a medida que o fruto amadurece, fato que ocorre devido à degradação ou biossíntese dos polissacarídeos e o acúmulo de açúcares. O TSS está ligado diretamente ao sabor adocicado e quando comparados com outros frutos, à pimenta é um fruto rico em açúcares simples como glicose, frutose e sacarose (Braga et al., 2013).

Variabilidade também foi observada entre as linhagens para a concentração de ácido cítrico, caráter diretamente relacionado com a apreciação e a conservação dos frutos de pimenta. Enquanto a linhagem L₈ e a testemunha tiveram valores de 0,20 a 0,23% de ácido cítrico, L₆ produziu frutos com valores maiores, contendo em média 0,31% de ácido cítrico (Tabela 5). Os teores de ácido cítrico encontrados neste trabalho se elevam muito acima do que para outras cultivares. Rebouças et al. (2013) avaliaram os teores de ácido cítrico em pimenta malagueta e encontraram médias de 0,035%, quase sete vezes menos comparando-se os teores encontrados nas linhagens estudadas neste trabalho.

As análises da relação TSS/AT evidenciaram variação entre as linhagens, sendo que as linhagens L₆ e L₈ obtiveram valores de 32,37 e 36,68, respectivamente, enquanto nos frutos de 'Jalapeño M' observou-se valor de 52,91 (Tabela 5). Estes resultados indicam uma maior influência do sabor ácido sobre as linhagens L₆ e L₈, provavelmente em função do elevado teor de ácido cítrico verificado nestas linhagens. Estes resultados vão influenciar diretamente o sabor destas pimentas e sua aceitação pelo consumidor, visto que o teor de ácidos orgânicos em relação à quantidade de açúcares confere um balanço (TSS/AT), quanto maior a concentração de ácidos maior o sabor ácido, e quanto maior o valor de sólidos solúveis maior será o sabor adocicado, valores muito baixos destas duas variáveis tornam o sabor menos atraente (Couto e Canniatti-Brazaca, 2010).

Crisóstomo et al. (2008), avaliando a relação TSS/AT em pimenta tabasco, encontraram valores médios de 47,93, valor intermediário aos observados neste

trabalho. Luitel e Kang (2013) avaliando caracteres quantitativos relacionados à qualidade de frutos em diferentes genótipos de pimentas (*C. annuum* L.) atribuíram à variação existente nos caracteres TSS e AT às diferenças genéticas entre as cultivares avaliadas, ainda que as técnicas pré-colheita e pós-colheita aplicadas no cultivo e no armazenamento sejam de marcante influência na composição dos açúcares bem como dos ácidos orgânicos.

Resultados expressivos foram observados para o teor de vitamina C com diferenças marcantes entre as linhagens quando comparadas à testemunha comercial tanto em frutos imaturos quanto maduros. As linhas recombinadas destacaram-se com um teor de vitamina C de 148,72 mg/100 g (L₆) e 141,20 mg/100g (L₈) em frutos imaturos, valores cerca de 53% maiores do que os observados para a testemunha comercial que foi de 92,21 mg/100g (Tabela 4).

No estágio final da maturação dos frutos, os teores de vitamina C total obtidos nas linhagens L₆ e L₈ atingiram valores 204,66 mg/100g e 202,96 mg/100g, respectivamente, enquanto a testemunha comercial obteve um teor de 79,2 mg/100g, menor inclusive do que o registrado para os frutos imaturos deste genótipo.

A composição de vitamina C em frutos de *Capsicum* varia de acordo com o genótipo e a maturidade. Em geral, o conteúdo de ácido ascórbico em frutos de pimenta aumenta de acordo com a maturação (Howard et al., 1994; Howard et al., 2000, Marin et al., 2004; Alós et al. 2013; Bae et al., 2014). Porém, Deepa et al. (2007) avaliando frutos frescos de *C. annuum* em diferentes estágios de maturação encontraram menores níveis de ácido ascórbico em frutos maduros quando comparados aos frutos frescos imaturos, como por exemplo: Parker 94,25 mg/100g e 88,95 mg/100g; Flamingo 94,10 mg/100g e 91,50 mg/100g; Mazurka 94,0 mg/100g e 90,0 mg/100g, frutos imaturos e maduros, respectivamente. As linhagens em teste L₆ e L₈ tiveram teores de vitamina C em frutos imaturos e maduros superiores aos encontrados em frutos dos genótipos avaliados por Deepa et al., (2007). Desempenho superior também quando comparado aos genótipos estudados por Bae et al., (2014) avaliando oito diferentes cultivares de pimenta em dois estágios de maturação nos anos de 2008 e 2009 obtiveram valores máximos de ácido ascórbico de 137,3 mg/100g em ambos os anos, e valores mínimos de 1,95 mg/100g e 2,73 mg/100g.

A pungência é um atributo importante da qualidade das pimentas, e sua expressão está associada à presença, em maior ou menor proporção, de alcaloides conhecidos como capsaicinoides (Appendino, 2008). Dentre estes, a capsaicina (C), seu dihidro derivado (dihidrocapsaicina – DHC) e a nordihidrocapsaicina (n-DRC) constituem mais de 90% do total de capsaicinoides na maioria das variedades pungentes (Kosuge e Furuta, 1970). Os teores de C são geralmente maiores do que os de DHC e n-DRC (Antonious et al., 2009), e estes são considerados as principais características para se determinar a qualidade comercial de um fruto ou produto derivado de pimenta (Frary e Frary, 2012).

O teor médio de C, DHC e n-DHC encontrado para a linhagem L₈ foi de 13,05 µg/10mg, 21,53 µg/10mg e 9,85 µg/10mg, respectivamente (Tabela 5) isto é, superior ao encontrado para a cultivar ‘Jalapeño M’ o que possibilita afirmar que esta linhagem possui maior pungência do que o padrão comercial aqui avaliado. Por outro lado, não foi possível detectar a presença de capsaicinoides na linhagem L₆, o qual pode ser classificada como uma nova cultivar de pimenta do tipo “doce”.

Esta classificação fica mais precisa quando se observa os picos nos cromatogramas considerando apenas a capsaicina, em que nota-se nitidamente a ausência do pico de capsaicina na linhagem L₆ (Figura 5). Comparada a outras cultivares de pimentas da espécie *C. annuum* L., a linhagem L₈ obteve pungência superior às cultivares mexicanas como Don Matias (2,9 µg/10mg de MS) e San Luis (1,7 µg/10mg de MS), mas inferior às cultivares Don Julio (80,3 µg/10mg de MS) e Don Diego (15,2 µg/10mg de MS) (González-Zamora et al. 2013). É interessante observar que para essas cultivares os teores de dihidrocapsaicina foram superiores aos de capsaicina, o que também foi observado nas linhagens avaliadas do presente estudo.

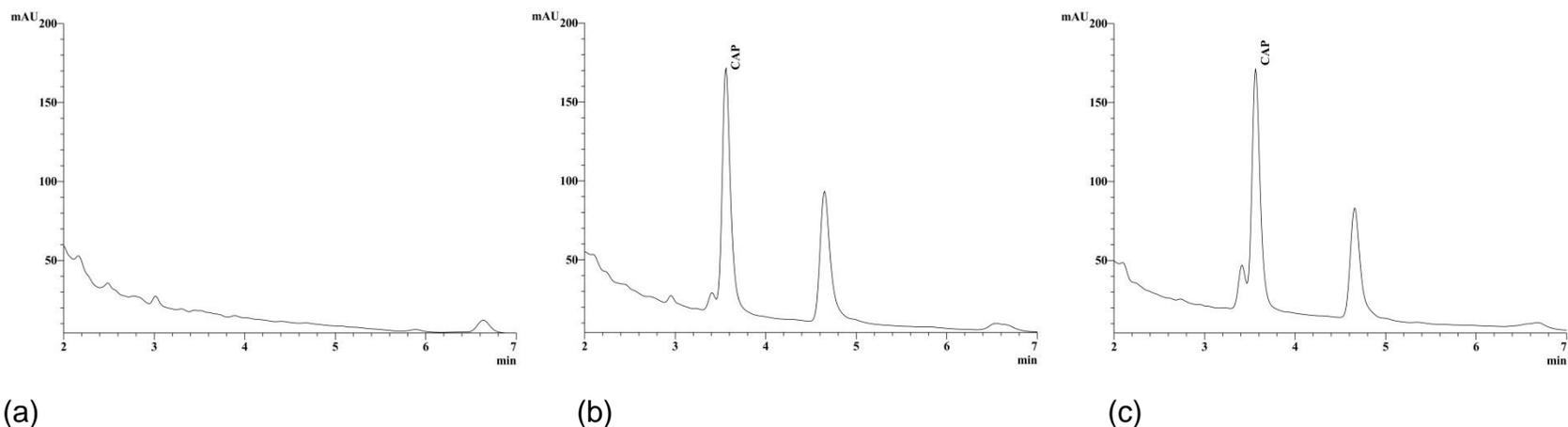


Figura 5. Cromatogramas HPLC de extrato de duas linhagens (L₆ “a” e L₈ “b”) e um genótipo comercial de pimenta (T “c”) (*C. annuum* var. *annuum*) (picos: capsaicina). Campos dos Goytacazes RJ, 2015.

Tabela 6. Moda de cinco descritores qualitativos avaliados em duas linhas recombinadas e uma cultivar de pimenta (*C. annuum* var. *annuum*). Campos dos Goytacazes-RJ, 2015.

Genótipos	Fruto				Planta	
	CAM	TSF	CFM	ICM	Brilho	Resistencia à Mancha Bacteriana
L ₆	Verde	Lisa	Vermelha	Média	Forte	Resistente
L ₈	Verde	Lisa	Vermelha	Forte	Forte	Resistente
‘Jalapeño M’	Verde	Lisa	Vermelha	Forte	Forte	Suscetível

CAM- coloração antes da maturação; TSF- textura da superfície do fruto; CFM- coloração do fruto na maturidade; ICM- intensidade da coloração na maturidade; Brilho do fruto.

Pelas observações realizadas para os caracteres qualitativos CAM, TSF, CFM, ICM e brilho relativo aos frutos, verificou-se igualdade entre as linhagens para todas estas variáveis, com exceção da intensidade de coloração na maturidade, pois L₆ diferiu das demais linhagens, obtendo intensidade média, enquanto L₈ e a testemunha tiveram forte intensidade da coloração nos frutos maduros (Tabela 6).

De acordo com a análise de resistência pela escala de notas verificou-se que as duas linhagens recombinantes, L₆ e L₈, foram resistentes à mancha bacteriana, enquanto a cultivar Jalapeño M foi suscetível (Tabela 6). Tal resultado é importante principalmente porque até o presente momento não são comercializadas no Brasil cultivares de pimenta com resistência à mancha bacteriana.

5.3. Genotipagem e Análise Multivariada

Todos os 19 iniciadores SSR utilizados não possibilitaram a detecção de polimorfismo entre as linhagens L₆, L₈ e a 'Jalapeño M', a ausência de polimorfismo pode ser detectada ao analisar os géis de agarose obtidos da análise dos marcadores CAMS 51, CAMS 101, CAMS 95 e CAMS 153 (Figura 6). Apesar da robustez deste tipo de marcador, a detecção de polimorfismo é reduzida à medida que as linhagens forem oriundas dos mesmos genitores e comparadas com uma testemunha de mesma espécie. Kwon et al., (2005) utilizando 316 iniciadores SSR em 66 cultivares de *Capsicum* detectou baixo nível de polimorfismo (8,5%) entre as cultivares, tais autores afirmam que há baixa variabilidade entre as cultivares comerciais de pimenta e conseqüentemente a distinção destas variedades por marcadores SSR é muitas vezes difícil.

As três combinações de iniciadores de marcadores AFLP utilizados (E-ACA/M-CAC, E-ACC/M-CAA, E-ACG/M-CAA) produziram 158 bandas, das quais 42,4% foram polimórficas. Desses a testemunha 'Jalapeño' M obteve 37 locos polimórficos em relação às demais linhagens, por vez L₈ e L₆ obtiveram 18 e 12 locos polimórficos, respectivamente. A observação do número de locos polimórficos encontrados evidencia certo grau de dissimilaridade entre as linhagens, comprovado a partir da distância genética obtida pelo índice de Jaccard (Tabela 7). Por esta matriz, verificou-se uma dissimilaridade de 63,13% entre L₈ e 'Jalapeño M' e de 49,38% em relação a L₆. Já quando se considera a

dissimilaridade em relação à linhagem L₆ e a ‘Jalapeño M’, esta foi de 60,69% de distinguibilidade (Tabela 7).

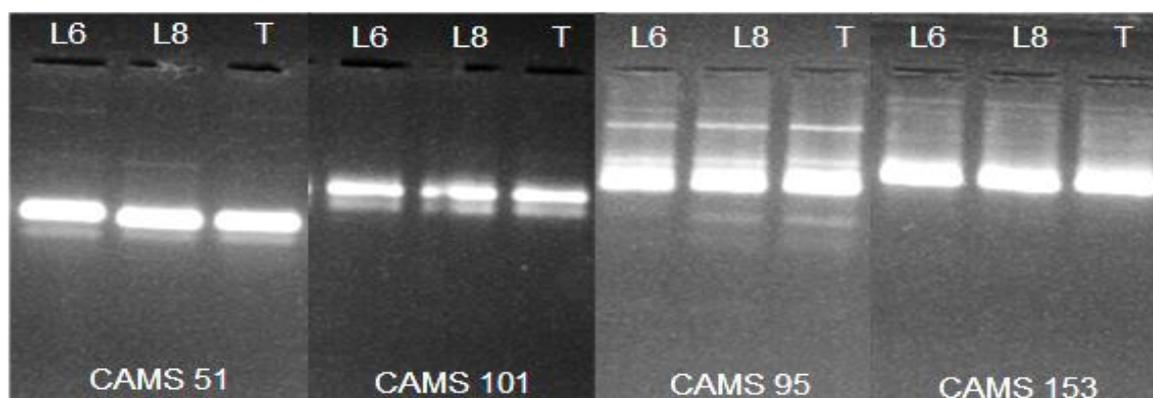


Figura 6. Gel agarose ‘Metaphor’ 4%; amplificação de fragmentos de DNA utilizando os microssatélites CAMS-51; CAMS-101; CAMS-95; CAMS-153.

Tabela 7 – Matrizes de dissimilaridade AFLP, DHE e DHE+AFLP de duas linhagens recombinantes, L₆ e L₈, e uma testemunha (T) ‘Jalapeño M’. Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2015.

Genótipos	AFLP			DHE			DHE + AFLP		
	L ₆	L ₈	T	L ₆	L ₈	T	L ₆	L ₈	T
L ₆	-	0,49	0,60	-	0,19	0,31	-	0,19	0,31
L ₈		-	0,63		-	0,27		-	0,33
‘Jalapeño M’			-			-			-

Fica evidente que a análise via marcadores AFLP possibilitou a distinção entre as linhagens candidatas à proteção e a testemunha comercial, e o mais importante, distinguem as linhagens aparentadas, L₆ e L₈ que possuem características fenotípicas similares. Além disso, o DNA *fingerprinting* dessas linhagens não só auxilia na comprovação da distinção com outras cultivares de pimenta já existentes ou com novas cultivares que surgirão, como possibilitar futuras comprovações e identificação da pureza genética das sementes destas cultivares. Outro ponto possível de ser considerado é a utilização desses marcadores em futuros ensaios de DHE para a proteção de novas cultivares de pimenta similares àquelas avaliadas neste trabalho.

Os marcadores moleculares são amplamente utilizados para DNA *fingerprint*. Ibarra-Torres et al., (2015) fizeram uso de marcadores ISSR e SSR para auxiliar na distinção genética intraespecífica em cultivares de pimenta. Kumar et al., (2001) por sua vez utilizaram marcadores na comprovação da distinguibilidade genética e para garantir o direito do obtentor de uma cultivar de *Capsicum*. Pali et al., (2014) realizaram caracterização molecular e confirmação de pureza genética em estudo com linhaça (*Linum usitatissimum* L.) indicando marcadores específicos para esta cultura.

Outra opção em ensaios de DHE é o uso de marcadores para verificar a estabilidade da cultivar, uma vez que a característica deve se manter em gerações sucessivas. A identificação de determinado caráter com o uso de marcador poderá ser utilizada como comprovação desta estabilidade, como verificado no estudo de Wang et al., (2014) que identificaram e utilizaram marcadores microssatélites específicos na comprovação da estabilidade em linhagens de trigo.

O uso de marcadores moleculares pode ainda auxiliar na escolha da testemunha a ser utilizada nos ensaios de DHE, conforme indicado pela UPOV (2011). As informações obtidas por marcadores possibilitaria indicar cultivares mais próximas geneticamente da variedade candidata à proteção, de forma que as cultivares mais divergentes não sejam utilizadas como testemunhas, reduzindo o tempo e custo na realização dos ensaios. Esta pode ser uma das principais justificativas para o uso do *fingerprint* de cultivares protegidas, uma vez que para grande maioria das cultivares de diversas espécies vegetais há um grande número de cultivares similares. Porém, a manutenção de um grande número de coleções para realização de ensaios de distinguibilidade é inexecutável e o uso de marcadores moleculares específicos poderia atenuar este problema.

Tal como os descritores morfológicos para os ensaios DHE, a aplicação de técnicas moleculares na identificação e caracterização da variedade exigiria o estabelecimento de protocolos e técnicas próprias, padronizadas. Neste quadro, os marcadores devem ser considerados como características e, como tal, cumprir os mesmos requisitos que qualquer outro descritor (UPOV, 2011).

De acordo com as análises realizadas por escala de notas para resistência à mancha bacteriana, verificou-se que as linhagens candidatas à proteção, L₆ e L₈, foram resistentes, o contrário foi verificado a testemunha 'Jalapeño M'. Após

sete avaliações, observou-se sintomas de suscetibilidade apenas em folhas 'Jalapeño M' (Figura 7), com a área inoculada amarelada e com pontos de necrose ou manchas necrosadas. Foi possível também atestar a resistência das linhagens pela ausência destes sintomas típicos da doença após 12 dias de inoculação.

A distinção obtida pela análise dos descritores morfológicos, realizada com as duas linhagens e a 'Jalapeño M' permitiu a obtenção da matriz de dissimilaridade na qual a maior distância genética foi observada entre a linhagem L₆ e 'Jalapeño M', seguida pela distância entre a linhagem L₈ e a 'Jalapeño M', sendo 31% e 27% de dissimilaridade, respectivamente (Tabela 7). A distância genética obtida entre as linhagens candidatas à proteção foi menor, correspondendo a 19% de dissimilaridade. É notório que esse resultado expressa o maior nível de semelhança já esperada entre as linhagens, uma vez que foram oriundas de um mesmo cruzamento, possuindo assim genitores idênticos.

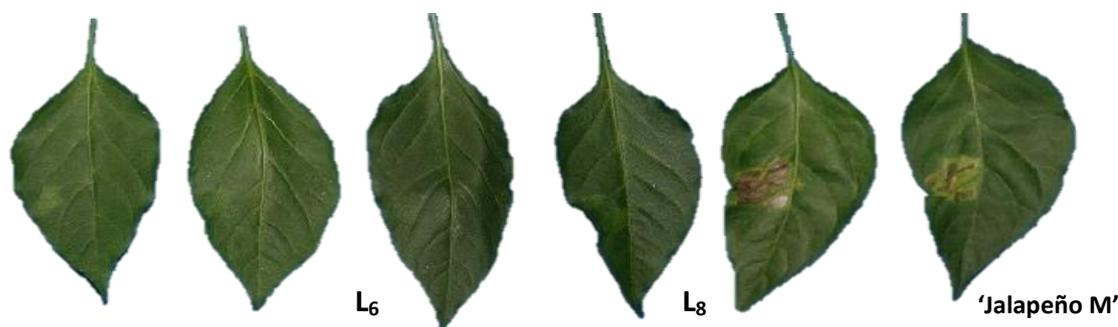


Figura 7. Folhas de *C. annuum* var. *annuum* com ausência de sintomas de mancha bacteriana (L₆ e L₈) e com sintomas ('Jalapeño M'), demonstrando a resistência e suscetibilidade, respectivamente. Campos dos Goytacazes-RJ, UENF, 2015.

A distinção entre as linhagens é essencial no pedido de proteção de cultivares candidatas, tanto na exigência nacional como internacional para os países signatários da UPOV. O que não é levado em consideração é o quanto de distinção é necessário, ou seja, considerando a distância genética obtida entre a(s) linhagens candidata(s) à proteção e a(s) testemunha(s), qual a porcentagem mínima de dissimilaridade que seria necessária para aceitação ou não o quesito distinguibilidade. Todavia, a padronização da distância mínima exigida já está pré-

estabelecida se for considerado que a diferenciação de apenas um dos descritores exigidos seria suficiente para a proteção da nova cultivar. Assim, há possibilidade de uma nova cultivar ser protegida, exceto nos casos de cultivares essencialmente derivadas, considerando apenas uma ou poucas características, inclusive algumas consideradas controversas, tais como: pilosidade foliar, coloração antociânica do hipocótilo, comprimento e espessura do pedúnculo. Portanto, é necessário que o obtentor da nova cultivar considere o maior número e maior nível de importância das características que possibilitam a distinguibilidade entre as linhagens candidatas à proteção e as cultivares testemunhas.

Considerando o grande número de variáveis disponíveis para a diferenciação genotípica e fenotípica, descritores moleculares e morfológicos, uma análise discriminante considerando todas as variáveis poderia representar de maneira mais exata a diferença genética entre as linhagens. Tal análise é possível quando se utiliza o algoritmo de Gower (1971), que analisa conjuntamente as variáveis quantitativas, multicategóricas e binárias na obtenção da matriz de dissimilaridade. Com os resultados obtidos por esta análise verificou-se maior distinguibilidade entre a linhagem L₈ e a testemunha 'Jalapeño M', seguida de L₆ e 'Jalapeño M', com 33% e 31%, respectivamente. Assim como obtido nas matrizes de distâncias individuais para AFLP e descritores do DHE, a menor diferença genética foi verificada para as linhagens L₆ e L₈ (Tabela 7).

A redução verificada nas porcentagens que representam as diferenças genéticas obtidas pelos marcadores AFLP e aquelas obtidas considerando todas as variáveis, não podem ser consideradas como uma perda de distinguibilidade entre as linhagens, e sim como uma representação mais fidedigna das diferenças e semelhanças genéticas entre os mesmos, justamente por considerar muitas variáveis na obtenção desta distinguibilidade. A consideração do tipo de reprodução de *C. annuum* var. *annuum*, uma planta autógama, por si só possibilitaria um entendimento prévio de uma menor dissemelhança entre os genótipos desta espécie, quando comparada a espécies vegetais predominantemente alógamas.

A análise conjunta de vários caracteres está consolidada em ensaios de DHE. Chanda et al., (2014) obtiveram resultados satisfatórios na distinção de linhagens de milho em ensaios de DHE com o uso de análise conjunta de

caracteres quantitativos e qualitativos. Jones et al., (2013) discutem que o uso de informações oriundas de marcadores moleculares e descritores morfológicos é vantajoso na distinção de genótipos de cevada para fins de proteção, contudo necessitaria de um nível maior de correlação entre estas informações, de forma que, caso esta correlação não seja de um para um, acarretaria em um risco a distinção entre os genótipos, no caso de que esta fosse comprovada apenas por marcadores, um risco eminente ao direito do obtentor sobre uma cultivar protegida desta forma. Hong et al., (2015) por sua vez, identificou marcadores EST-SSR que atendem aos vários requisitos estabelecidos pela UPOV (UPOV, 2011) para uso de marcadores em ensaios de DHE, sendo úteis na distinção de cultivares de alface e como alternativa para a realização de ensaios de DHE para esta cultura.

Esta abordagem também é discutida em outros trabalhos e para várias culturas como beterraba (De Riek et al., 2001); pepino (Bernet et al., 2003); arroz (Islam, et al., 2011); videira (Vélez e Ibáñez, 2012); cevada (Jones et al., 2012); trigo (Potokina et al., 2012). Nesses trabalhos houve concordância de que os marcadores moleculares quando utilizados em conformidade com os descritores morfológicos, proximamente relacionados, podem ser de grande utilidade para a distinção de genótipos.

6. CONCLUSÕES

Após os ensaios de DHE, verificou-se que duas linhagens, L₆ e L₈, que reúnem boas características agrônômicas e resistência à mancha bacteriana, estão aptas à proteção, pois foram comprovadamente distintas, homogêneas, estáveis, segundo os critérios estabelecidos pelo SNPC/MAPA, representando novos produtos tecnológicos.

As características de qualidade relacionadas aos frutos forneceram informações capazes de diferenciar as linhagens recombinadas em teste da testemunha comercial, atingindo valores superiores em alguns caracteres, obtendo assim padrões favoráveis ao consumo *in natura* destas pimentas. A linhagem L₆ pode ser caracterizada por pimenta não pungente, a L₈ por sua vez é pungente, com alta concentração de capsaicinóides. Ambas possuem frutos com alto teor de vitamina C e sólidos solúveis, possuem coloração verde quando imaturos e vermelha quando maduros, além de outros atributos de interesse ao mercado desta cultivares.

O uso da maior quantidade de informações, a avaliação do maior número de caracteres, permite uma descrição mais completa e exata de um genótipo. O acúmulo destas informações facilita no momento comprobatório dos requisitos exigidos nos ensaios de DHE, principalmente no que se refere à distinguibilidade genotípica. A avaliação molecular possibilitou maiores distâncias genéticas entre as linhagens avaliadas, provando ser uma ferramenta com grande potencial para detecção de distinguibilidade em ensaios de DHE. Por vez, a avaliação

morfológica é sem dúvida ainda a forma mais segura na detecção da distinguibilidade entre variedades candidatas à proteção e as variedades e/ou cultivares comerciais semelhantes, por isso, apenas estes descritores são os exigidos nos ensaios de DHE pelos países membros a UPOV. Porém a adição de ferramentas moleculares que auxiliie nesta distinção esta cada vez mais presente. Todavia o uso dessas necessita de certos cuidados, tanto na escolha dos marcadores como na interpretação dos resultados.

A análise conjunta destas duas fontes de informação, genotípica e fenotípica, pode ser considerada a melhor forma de comprovação da distinguibilidade, e como visto neste trabalho, possibilita tanto a identificação do nível de semelhança entre candidatas à proteção oriundas de um mesmo cruzamento, como a distinção da cultivar utilizados no ensaio de DHE realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allard, R.W. (1971). Princípios do melhoramento genético das plantas. Edgard Blucher. 381p.
- Alós, E., Rodrigo, M.J., and L. Zacarías. (2013). Transcriptomic analysis of genes involved in the biosynthesis, recycling and degradation of L-ascorbic acid in pepper fruits *Capsicum annuum*. *Plant Science*, 207, p. 2-11.
- Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132:1131-1139.
- Alvarez-Parrilla, E., L.A. de la Rosa, R. Amarowicz, and F. Shahidi. (2010). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(1), p. 163-173.
- Antonious, G.F., T. Berke, and R.L. Jarret. (2009). Pungency in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, v. 44, n. 2, p. 179-184.
- AOAC. 1992. Official methods of analysis of the Association of Agricultural Chemists 13. ed. Washington, p.627-845.

- Appendino, G. 2008. Capsaicin and Capsaicinoids. In: Modern Alkaloids. Structure, Isolation, Synthesis and Biology. Wiley-VCH, Weinheim, p. 73-109.
- Araújo, J. C. (2010). A lei de proteção de cultivares: análise de sua formação e conteúdo. *Edições Câmara*, Brasília, 137p.
- Aviani, D. M.; Machado, R. M. (2011). União internacional para proteção das obtenções vegetais (UPOV). IN: Proteção de cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 17-22.
- Aviani, D.M. (2011). *Requisitos para Proteção*. IN: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p.37-43.
- Aviani, D.M., Santos, F.S. (2011). Uso de Marcadores Moleculares em Proteção de Cultivares. IN: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 155-160.
- Bae, H., G.K. Jayaprakasha, K. Crosby, K.S. Yoo, D.I. Leskovar, J. Jifon, and B.S. Patil. (2014). Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), p. 195-202.
- Barbero, G.F., A. Liazid, M. Palma and C.G. Barroso. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5). p.1332–1337.
- Barboza, 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.

- Barchi, L., Bonnet, J., Boudet, C., Signoret, P., Nagy, I., Lanteri, S., ... & 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(1), 51-60.
- Bernardo, R. (2002). *Breeding for quantitative traits in plants*. Woodbury MN: Stemma Press. 369p. 29-38
- Bernet, G.P., Bramardi, S., Calvache, D., Carbonell, E.A., & Asins, M.J. (2003). Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding*, 122(2), 146-152.
- Bosland, P.W. (1996). *Capsicums: Innovative uses of an ancient crop*. *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, Virginia, 479-487. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/v3-479.html>. Acesso: 02 de fevereiro 2013.
- Bosland, P.W. and J.B. Baral. (2007). "Bhut Jolokia" The World's Hottest Known Chile Pepper is a Putative Naturally Occurring Interspecific Hybrid. *HortScience*, 42(2), p. 222-224.
- Braga, T.R., R.D.C.A. Pereira, M.R.S. da Silveira, L.R., da Silva, and M.M.T. de Oliveira. (2013). Caracterização físico-química de progênies de pimentas (*Capsicum frutescens* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 112(1), p. 6-10.
- Brammer, S.P. (2000). *Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal*. Embrapa Trigo.
- Brasil (1997). Decreto-lei 9456 de 28 de abril de 1997. Lei de proteção de cultivares. Diário oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 28 de abril de 1997, 79:8241-8246, seção 1.

Brasil (2014). Ministério da Agricultura. SNPC - Sistema de Cultivar Web. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php. Acesso em: 16 agosto 2014. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Brasil (2015). Ministério da Agricultura. SNPC - Sistema de Cultivar Web. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php?acao=pesquisar&postado=1. Acesso em: 11 maio 2015. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Brasil, (2006). Ato n.º2 de 22 de março de 2006. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de pimentão e pimenta (*Capsicum spp.*). *Diário oficial [da República Federativa do Brasil]*, Brasília, 27 de março de 2006, p. 7, seção 1. BRASIL.

Brasil, (2007). Registro Nacional de Cultivares RNC, Orientações e Informações Técnicas. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Sementes_e_mudas/Registro_Nacional_de_Cultivares.pdf. Acesso: 23 de agosto de 2012.

Brasil, (2010). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informações aos usuários dos SNPC. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/INFORMACOES_AOS_USUARIO_S_SNPC_nov2010.pdf. Acesso em 23 de setembro de 2012.

Brasil, (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Proteção de Cultivares no Brasil* / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: Mapa/ACS. 202 p. 30 39

Brasil, (2012a). Registros e Autorizações. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes>, acesso em 23 de

agosto de 2012. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Brasil, (2012b). Lista de cultivares protegidas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protecao-cultivares/cultivares-protegidas>, acessado em 18 de agosto de 2012. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Bruins, M., (2009). The evolution and contribution of plant Breeding to global agriculture. IN: Responding to the challenges of a changing world: The role of new plant varieties and high quality seed in agriculture. *FAO Headquarters*, Rome, September 8-10p. Disponível em http://www.upov.int/about/en/pdf/354_seed_conf.pdf. Acessado em 03 de 18 fevereiro de 2012.

Carmo, M.G.F.; Kimura, O.; Maffia, L.A.; Carvalho, A.O. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, n. 1, p. 66-70, 1996.

Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Lopes, A.C.A., Cruz, E.M., (2012). Agência de Informação Embrapa, Pimenta. Pré-Produção/ Características. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT00_0gn05zz5y02wx5ok0liq1mqvd1bet3.html. Acesso em 01 de fevereiro de 2012.

Carvalho, S.I.C.; Bianchetti, L.B., (2004). Sistema de produção de pimentas (*Capsicum* spp.): Botânica. Embrapa Hortaliças. Brasília. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/sistprod/pimenta/botanica>. Acesso em 22 de setembro de 2012.

Carvalho, S.I.D., Bianchetti, L.D.B., & Reifschneider, F.J. (2009). Registration and protection of cultivars in Brazil: the experience of Embrapa Vegetables' *Capsicum* breeding program. *Horticultura Brasileira*, 27(2), p.135-138.

- Casali, V.W.D. (2011). Prefácio. In: Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas (*Capsicum* spp.)/ Rêgo, E. R.; Finger, F.L.; Rêgo, M. M. Recife. 223p.
- Casali, V.W.D.; Pádua, J.G.; Braz, L.T. (1984). Melhoramento de pimentão e pimenta. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.10, n.113, p.19-20.
- Castañón-Najera, G., Ramírez-Meraz, M., Ruiz-Salazar, R., & Mayek-Pérez, N. (2011). Aplicación de marcadores AFLP para explorar heterosis en *Capsicum* spp. *Phyton (Buenos Aires)*, 80(1), 53-58.
- Chanda, R., Mukanga, M., Mwala, M., Osiru, D. S., & MacRobert, J. (2014). A comparative analysis of distinctness, uniformity and stability (DUS) data in discriminating selected Southern African maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *African Journal of Agricultural Research*, 9(41), 3056-3076.
- Chattopadhyay, A., Sharangi, A.B., Dai, N., & Dutta, S. (2011). Diversity of genetic resources and genetic association analyses of green and dry chillies of Eastern India. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 3.
- Costa, R.A., R. Rodrigues and C.P. Sudré. (2002). Resistência genética à mancha bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20(1), p. 86-89.
- Couto, M.A.L. and S.G. Canniatti-Brazaca. (2010). Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, 30(Supl.1). p.15-19.
- Crisóstomo, J. R., Furtado, R. F., Barreto, P. D., de Miranda, F. R., Gondim, R. S., Bleicher, E., ... & Rabelo Filho, F. D. A. C. (2008). Pesquisa e desenvolvimento para o agronegócio pimenta no Ceará. Embrapa Agroindústria Tropical.

- Cruz, C.D. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3), p. 271-276.
- Cruz, C.D., A.J. Regazzi and P.C.S. Carneiro. (2004). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. UFV: Imprensa Universitária, 390 p.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas. v.2. Viçosa: UFV, 585p.
- Da Silva, A.R., P.R. Cecon, E.R. do Rêgo and M. Nascimento. (2011). Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. *Revista Ceres*, 58(2), p.168-171.
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(8), 1254-1265.
- Deepa, N., C. Kaur, B. George, B. Singh and H.C. Kapoor. (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper *Capsicum annuum* L. genotypes during maturity. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), p.121-129.
- Derera, N.F. (2000). Condiment Paprika: Breeding, Harvesting & Commercialisation: a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC. 33p.
- Faostat, (2013). Database results. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Acessado em: 02 de fevereiro de 2013.
- FAOSTAT. (2014). Database results. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, Italy. Disponível em <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E>. acessado em agosto de 2014.

- Fehr, W. R. (1987). Principles of cultivar development. New York: Macmillan, p. 247-260.
- Ferreira M.E.; Grattapaglia D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa Cenargen. 220 p.
- Filgueira F.A.R. (2012). Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV. 402p.
- Fowler, C. (2004). Accessing genetic resources: international law establishes multilateral system. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(6), 609-620.
- Frank, C.A., R.G. Nelson, E.H. Simonne, B.K. Behe and A.H. Simonne. (2001). Consumer preferences for color, price, and vitamin C content of bell peppers. *HortScience*, 36(4), p.795-800.
- Frary, A., A. Frary. (2012). Physiology of Metabolites. In: Russo VM (ed) Peppers: botany, production and uses. CABI, Wallingford, p. 176-188.
- Gaikwad, A. B., Archak, S., & Gautam, D. (2013). DNA profiling of *Capsicum annuum* L. cultivars based on AFLP and ISSR markers. *Gene Conserve*, 12(49), 4-12.
- Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization. *Crop Science*, 46(5), 2278-2292.
- Ghasemnezhad, M., M. Sherafati, and G.A. Payvast. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper *Capsicum annuum* fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3(1), p.44-49.
- Gilliland TJ; Gensollen V. (2010). Review of the protocols used for assessment of DUS and VCU in Europe Perspectives. In: Huyghe C. (eds). Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding. *Springer Netherlands*. p. 261-275.

- González-Zamora, A., E. Sierra-Campos, J.G. Luna-Ortega, R. Pérez-Morales, J.C.R. Ortiz and J.L. García-Hernández. (2013). Characterization of Different *Capsicum* Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules*, 18(11), p.13471-13486.
- Gower J.C. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*. 27: 857-874.
- Greenleaf, W.H. (1986). Pepper breeding, In: Bassett, M.J. (ed.). Breeding vegetable crops. AVI, Westport, CT. p. 67–134.
- Henz, G.P. (2004). Perspectivas e potencialidades do mercado de pimentas. Anais do I Encontro Nacional de Agronegócio de Pimentas.
- Hibberd, A. M., R. E. Stall, and M. J. Bassett. (1988). Quantitatively assessed resistance to bacterial leaf spot in pepper that is simply inherited. *Phytopathology*. v 78.5. p.607-612.
- Hibberd, A.M., M.J. Bassett and R.E. Stall. (1987). Allelism tests of three dominant genes for hypersensitive resistance to bacterial spot of pepper. *Phytopathology* v. 77.9. p.1304-1307.
- 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.
- Hong, J. H., Kwon, Y. S., Mishra, R. K., & Kim, D. H. (2015). Construction of EST-SSR Databases for Effective Cultivar Identification and Their Applicability to Complement for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Distinctness Test. *American Journal of Plant Sciences*, 6(01), 113.

- Howard, L.R., R.T. Smith, A.B. Wagner, B. Villalon and E.E. Burns. (1994). Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed Jalapeños. *Journal of Food Science*, 59(2), p.362-365.
- Howard, L.R., S.T. Talcott, C.H. Brenes and B. Villalon. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), p.1713-1720.
- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezuma, E., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Campos, J., & Jaramillo-Flores, M. E. (2015). Inter-and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 181, 137-146.
- IBGE. Censo agropecuário de 2006/2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatística/economia/agropecuaria/censoagro/2006/agropecuario.pdf>. Acessado agosto de 2014.
- Ilbi, H. (2003). RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia horticulturae*, 97(3), p. 211-218.
- IPGRI. (1995). Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, p. 49.
- ISF (2012). International Seed Federation. ISF View on Intellectual Property. Disponível em: [http://www.worldseed.org/isf/onintellectualproperty.html.View_on_Intellectual_Property_2012\(2\).pdf](http://www.worldseed.org/isf/onintellectualproperty.html.View_on_Intellectual_Property_2012(2).pdf). Acessado em 16 de Agosto de 2014.
- Islam, M.M., Hoque, M.E., Rabbi, S.M.H.A., & Ali, M.S. (2011). DNA Fingerprinting and Diversity Analysis of BRRI Hybrid Varieties and their Corresponding Parents. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 21(2), 189-198.

- Jones, H., Norris, C., Smith, D., Cockram, J., Lee, D., O'Sullivan, D. M., & Mackay, I. (2013). Evaluation of the use of high-density SNP genotyping to implement UPOV Model 2 for DUS testing in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(4), 901-911.
- Jones, H., Norris, C., Smith, D., Cockram, J., Lee, D., O'Sullivan, D.M., & Mackay, I. (2012). Evaluation of the use of high-density SNP genotyping to implement UPOV Model 2 for DUS testing in barley. TAG. *Theoretical and applied genetics*. Theoretische und angewandte Genetik.
- Jones, J.B., R.E. Stall and H. Bouzar, (1998). Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology*, v.36. p.41-58.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and applied microbiology*, 27(6), 755-762.
- Karnka, R., M. Rayanakorn, S. Watanesk and Y. Vaneesorn. (2002). Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical sciences*. v.18(6). p.661-666.
- Khan, F.A., T. Mahmood, M. Ali, A. Saeed and A. Maalik. (2014). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Natural product research*, 28(16). p.1267-1274.
- 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*, 5 99(2), e59-e61.

- Kosuge, S. and M. Furuta. (1970). Studies on the Pungent Principle of *Capsicum*: Part XIV Chemical Constitution of the Pungent Principle. *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 34, n. 2, p. 248-256.
- Krishnamurthy, S. L., Rao, A. M., Reddy, K. M., Ramesh, S., Hittalmani, S., & Rao, M. G. (2013). Limits of parental divergence for the occurrence of heterosis through morphological and AFLP marker in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Current Science*, 104, 738-746.
- Kwon, Y. S., Lee, J. M., Yi, G. B., Yi, S. I., Kim, K. M., Soh, E. H., ... & Kim, B. D. (2005). Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Mol. Cells*, 19(3), 428-435.
- 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 (1): 63-68.
- Lannes, S.D., F.L. Finger, A.R. Schuelter and V.W. Casali. (2007). Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. *Scientia Horticulturae*, 112(3). p.266-270.
- LEE , J. M. , S. H. NAHM , Y. M. KIM , AND B. D. KIM . 2004 . Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 108 : 619 – 627 .
- Lopes, R., Lopes, M. T. G., Figueira, A. V. D. O., Camargo, L. E. A., Fungaro, M. H. P., Carneiro, M. S., & Vieira, M. L. C. (2002). Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 5(29), 56-60.
- Lovato F.A. (2011). Uso de Características de Resistência à Doenças em Ensaios de DHE. In: Proteção de Cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura,

- Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: Mapa/ACS. p. 147-154.
- Luitel, B.P. and W.H. Kang. (2013). Assessment of fruit quality variation in doubled haploids of minipaprika (*Capsicum annuum* L.). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 54(3). p.257-265.
- Machado RZ. (2011). Elaboração de diretrizes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE). In: Proteção de cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 121-142.
- Marín, A., F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán and M.I. Gil. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), p.3861-3869.
- Mcleod MJ; Guttman SI; Eshbaugh WH. (1982). Early evolution of chili peppers (*Capsicum*). *Economic Botany*. 36 (4). 361-368.
- Mendonça, R.D., K.S. Ferreira, L.M. de Souza, C.S. Marinho and S.L. Teixeira. (2007). Tecnologia de Pós-Colheita. *Bragantia*. 66(4). p.685-692.
- Millach, S.C.K. (1999). Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro*.
- Minamiyama, Y.; Tsuru, M.; Hirai, M. (2006). An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed.* 18, 157-169.
- Moreira S.O.; Araújo R.R.M.L.; Sudré C.P.; Riva-Souza E.M. (2009). Desempenho agrônomico de linhas endogâmicas recombinadas de pimenta em dois sistemas de cultivo. *Ciência Rural*. 39(5): 1387-1393.

- Moreira S.O.; Rodrigues R.; Araújo M.L; Riva-Souza E.M.; Oliveira R.L. (2010). Desempenho Agronômico de Linhas Endogâmicas Recombinadas de *Capsicum annuum* L. em Sistema Orgânico Sob Cultivo Protegido. *Ciênc. agrotec.* 34(4): 886-891.
- Moreira, S.O. (2008). *Reação à mancha bacteriana e desempenho agrônômico de linhas recombinadas de Capsicum annuum L.* Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 115p.
- Moreira, S.O. (2012). *Caracterização morfológica e molecular de linhagens de Capsicum annuum L. Com resistência à mancha bacteriana.* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 124p.
- Moreira, S.O., R. Rodrigues, H.S. Oliveira, A.M. Medeiros, C.P. Sudré and L.S.A. Gonçalves. (2013). Phenotypic and genotypic variation among *Capsicum annuum* recombinant inbred lines resistant to bacterial spot. *Genetics and Molecular Research.* 12(2). p.1232-1242.
- Moreira, S.O., R. Rodrigues, M.L. de Araújo, E.M. Riva-Souza and R.L. de Oliveira, R.L. 2010. Desempenho Agronômico de Linhas Endogâmicas Recombinadas de *Capsicum annuum* L. em Sistema Orgânico Sob Cultivo Protegido. *Ciência e agrotecnologia.* 34(4). p. 886-891.
- Moreira, S.O., R.R.M.L de Araújo, C.P. Sudré and E.M. Riva-Souza. 2009. Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de pimenta em dois sistemas de cultivo. *Ciência Rural.* v.39(5), p.1387-1393.
- 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, Scaldaferrro, M.A, Grabielle, M., Cecchini, N.M, García, Y.S., Jarret, R., Daviña, J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulturae*, 745: 137-169.
- Nascimento, W.M. (2012). Agência de Informação Embrapa, Pimenta. Produção Sementes. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0jdxdz02wx5ok0liq1mq1rcr3cq.html>. Acesso em 24 de agosto de 2012.
- Noda, H., F.M. Machado and A.L.U. Martins. (2003). Seleção de genótipos de pimentão resistentes à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. sob condições naturais de infecção. *Acta Amazônica*, 33(3), p.371-380.
- Oliveira, A. D., A.D. Silva, C. Lopes, C.D.C. Ribeiro, D. Lopes, D. Cruz and V. Casali. (2000). *Capsicum*: pimentas e pimentões no Brasil. Brasília: Embrapa.
- Pacheco-Olvera, A., Hernández-Verdugo, S., Rocha-Ramírez, V., González-Rodríguez, A., & Oyama, K. (2012). Genetic Diversity and Structure of 44 Pepper (L.) from Northwestern Mexico Analyzed by Microsatellite Markers. *Crop Science*, 52(1), 231-241.
- Pali, V., Verma, S. K., Xalxo, M. S., Saxena, R. R., Mehta, N., & Verulkar, S. B. (2014). Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax ('*Linum usitatissimum*'L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments. *Australian Journal of Crop Science*, 8(1), 119-126.
- Pinto, C.M.F.; Santos, I.C.; Pinto, F.A. (2011). Importância sócio-econômica da pimenta (*Capsicum* spp). In: Rêgo, E. R., Finger, F. L., & Rêgo, M. M. (2011). Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.). *Recife: Imprima*. p. 137-164.

- Potokina, E.K., Alekseeva, E.A., Lysenko, N.S., & Eggi, E.E. (2012). Genetic Diversity of Russian Advanced Wheat Cultivars Revealed With SSR Markers. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(3).
- Pozzobon, M.T., Schifino-Wittmann, M.T., & Bianchetti, L.B. (2006). Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian *Capsicum* L. (Solanaceae) species: do $x=12$ and $x=13$ represent two evolutionary lines?. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(2), 259-269.
- Quezado-Duval A.M.; Camargo L.E.A. (2004). Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira*. 22(1): 80-86.
- Ramalho, M.A.P. (2012). *Aplicações da genética quantitativa no melhoramento de plantas autógamas*. Ed.-Lavras: Ed. UFLA, 522p.
- Rebouças, T.N., R.M. Valverde and H.L. Texeira. (2013). Bromatologia da pimenta malagueta in natura e processada em conserva. *Horticultura Brasileira*, 31(1). p.163-165.
- Rêgo, E.D., F.L., Finger, N.F.F. Nascimento, E.R. Araújo and M.J.L.C. Sapucay. (2011). Genética e Melhoramento de Pimenteiras. Produção, Genética e Melhoramento de Pimentas. p.117-136.
- Reilly, C.A., D.J. Crouch, G.S. Yost and A.A. Fatah. (2001). Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 912(2). p. 259-267.
- Ribeiro, C.S.C., Amaro, G.B., Reifschneider, F.J.B. Carvalho, S.I.C. (2012b). Agencia de Informação Embrapa, Pimenta. Pré-produção/Características/Cultivares. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn08zc7m02wx5ok0liq1mqxe28z6u.html>. Acessado em 03 de fevereiro de 2013.

- Ribeiro, C.S.C., Henz, G.P., Vilela, N.J., Amaro, G.B., Melo, W.F., Reifschneider, F.J.B. (2012a). Agência de Informação Embrapa, Pimenta. Pré-produção Socioeconômica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn05zz5y02wx5ok0liq1mqmbc6m9w.html>. Acessado em 03 de fevereiro de 2013.
- Riva E.M.; Rodrigues R.; Pereira M.G.; Sudré C.P.; Karasawa M.; Amaral Junior A.T. (2004). Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annuum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4(4):490-494.
- Riva, E.M. (2006). Uso dos métodos genealógico e —*single seed descent* (SSD) para obtenção de linha de pimentão resistentes à mancha bacteriana. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 101p.
- Riva, E.M., R. Rodrigues, C.P. Sudré, M. Karasawa and M.G. Pereira. (2004b). Three recessive genes controlling bacterial spot resistance in pepper. *Anais do 17th International Pepper Conference, Naples, USA*. p.21.
- Riva-Souza, E.M., R. Rodrigues, C.P. Sudré, M.G. Pereira, C. dos Santos Bento and F. de Pina Matta. (2009). Genetic parameters and selection for resistance to bacterial spot in recombinant F₆ lines of *Capsicum annuum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9(2). p.108-115.
- Riva-Souza, E.M., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Pereira, M.G., Viana, A.P., & Amaral Júnior, A.T.D. (2007). Obtaining pepper F_{2:3} lines with resistance to the bacterial spot using the pedigree method. *Horticultura Brasileira*, 25(4), 567-571.
- Rodrigues R. e Costa, F. R. (2011). Marcadores moleculares em pimenteira. In: Rêgo, E. R., Finger, F. L., & Rêgo, M. M. (2011). Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum* spp.). *Recife: Imprima*. p. 137-164.

- Rodrigues J.N.; Malavolta V.A; Victor O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12(1-2): 16.
- Rodríguez-Burruezo, A., J. Prohens, M.D. Raigón, and F. Nuez. (2009). Variation for bioactive compounds in ají (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.) and implications for breeding. *Euphytica*, 170(1-2). p. 169-181.
- Rosa, A., M. Deiana, V. Casu, S. Paccagnini, G. Appendino, M. Ballero, and M.A. Dessí. (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(25). p. 7396-7401.
- Santos FS; Machado RZ. (2011). Analisando a estabilidade. In: Proteção de cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 183-185.
- Santos, F.S.; Pacheco, L.G.A. (2011). *Ensaio de DHE*. IN: Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília : Mapa/ACS. 202 p.
- Silva, A. R., Cecon, P. R., do Rêgo, E. R., & Nascimento, M. (2011). Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiros. *Revista Ceres*, 58(2), 168-171.
- Sudré, C.P. (2003) *Divergência genética e avaliação de resistência à anchabacteriana em acessos de Capsicum spp.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 112p.

- Thakur, P. P., Mathew, D., Nazeem, P. A., Abida, P. S., Indira, P., Girija, D., e Valsala, P. A. (2014). Identification of allele specific AFLP markers linked with bacterial wilt [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.] resistance in hot peppers (*Capsicum annuum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 87, 19-24.
- Topuz, A., and F. Ozdemir. (2007). Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars *Capsicum annuum* L. grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7). p.596-602.
- UPOV. (2005). *International Union for the Protection of New Varieties of Plants* (UPOV). UPOV Report on the Impact of Plant Variety Protection.98 p.
- UPOV/INF/18/1 (2011) Possible Use of Molecular Markers in the Test of Distinctness, Uniformity, and Stability (DUS). Geneva.
- Vélez, M.D., & Ibáñez, J. (2012). Assessment of the uniformity and stability of grapevine cultivars using a set of microsatellite markers. *Euphytica*, 1-14.
- Viana AAN. (2011). A proteção de cultivares no contexto da ordem econômica mundial. In: *Proteção de Cultivares no Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS. p. 11-16.*
- Vos P; Hogers R; Bleeker M; Reijans M; De Lee TV; Hornes M; Frijters A; Pot J; Peleman J; Kuiper M; Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21):4407-4414.
- Wang, D., & Bosland, P.W. (2006). The genes of *Capsicum*. *HortScience*, 41(5), 1169-1187.

Wang, L. X., Li, H. B., Gu, T. C., Liu, L. H., Pang, B. S., Qiu, J., & Zhao, C. P. (2014). Assessment of wheat variety stability using SSR markers. *Euphytica*, 195.

Zhang Q., J. Hu, L. Sheng and Y. Li. (2010). Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878. p.2292–2297.