

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PRÉ-
CULTIVARES DE *Capsicum annuum* L. COM RESISTÊNCIA À
MANCHA-BACTERIANA

SARAH OLA MOREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2012

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PRÉ-
CULTIVARES DE *Capsicum annuum* L. COM RESISTÊNCIA À
MANCHA-BACTERIANA

SARAH OLA MOREIRA

“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 Doutora em Genética e
Melhoramento de Plantas”.

Orientadora: Prof.^a Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO - 2012

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE PRÉ-
CULTIVARES DE *Capsicum annuum* L. COM RESISTÊNCIA À
MANCHA-BACTERIANA

SARAH OLA MOREIRA

“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 Doutora em Genética e
Melhoramento de Plantas”.

Aprovada em 16 de março de 2012.

Comissão Examinadora:

Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Genética e Melhoramento) – UENF

Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves (D.Sc., Genética e Melhoramento de
Plantas) – UENF

Dra. Elaine Manelli Riva-Souza (D.Sc., Produção Vegetal) – INCAPER

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

A Deus.
AGRADEÇO

Ao meu pai, Frederico (*in memoriam*).
DEDICO

À minha mãe, Maria, e aos meus irmãos, Juninho e Léo.
OFEREÇO

“Há um casamento que ainda não foi feito no Brasil: entre o saber acadêmico e o saber popular. O saber popular nasce da experiência sofrida, dos mil jeitos de sobreviver com poucos recursos. O saber acadêmico nasce do estudo, bebendo de muitas as fontes. Quando esses dois saberes se unirem, seremos invencíveis.”
(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que, de forma simples e grandiosa, expressa seu imenso amor, guiando-me e fortalecendo-me em todos os momentos;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Doutorado;

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ, pelo apoio financeiro, imprescindível para a execução do curso;

Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Espírito Santo – IEMA, por ter cedido o tempo necessário para a conclusão do curso;

À minha orientadora, Prof^a Rosana Rodrigues, por toda a atenção, apoio, amizade, compreensão e exigências, que me fizeram crescer e aprimorar meus ensinamentos e meus trabalhos;

Aos professores colaboradores e conselheiros, Elaine, Alexandre, Messias e Leandro, pelas sugestões que enriqueceram o trabalho;

Aos demais professores do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal - LMGV, pelos preciosos ensinamentos fornecidos durante toda a realização do curso;

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO, especialmente aos funcionários da Estação Experimental de Campos: José Manoel, Enildo, Marcos, João e Jocimar, pela competência e dedicação na condução de parte dos experimentos;

Aos colegas de laboratório, Cláudia, Cíntia, Marilene, Monique, Artur, Hérica, Soraia, Ozias e Márcio, pelo esforço, troca de idéias, pela excelente convivência, por dividirem o trabalho comigo, tornando-o mais leve e divertido;

À técnica do LMGV, Vitória Régia, por ter o poder de tranquilizar e incentivar, além dos cafezinhos proporcionados durante a execução da análise molecular;

Aos amigos Juliana Guimarães e Leandro Hespanhol, por me receberem com tanto carinho e por serem meus procuradores perante a UENF;

A todos os meus amigos de Guaçuí, do IEMA, do CCA-UFES, da UENF, por estarem presentes e dividirem comigo todas as alegrias e tristezas.

Ao meu pai, Frederico dos Santos Moreira, que, mesmo não estando presente fisicamente, esteve em meus pensamentos, em todos os momentos. Saudades eternas;

À minha família, avó, tios, primos e agregados, por toda a ajuda, incentivo, companheirismo e por me fazerem sentir saudade de casa;

À minha cunhada, Carolina Rodrigues Moreira, por ter aceitado fazer parte da minha família e por me incentivar;

Aos meus amores, Arthur e Hugo, por serem a alegria da casa, fazendo-me lembrar os tempos de criança e esquecer os problemas, trazendo novas alegrias e esperanças;

Aos meus queridos irmãos, Frederico dos Santos Moreira Júnior e Leonardo Ola Moreira, por terem se sacrificado por mim durante tantos anos, por terem me ajudado durante toda a minha vida;

À minha amada mãe, Maria da Penha Ola Moreira que, mesmo desejando que eu ficasse sob suas asas, dedicou-se tanto para que eu concluísse o curso, motivou-me e amou-me;

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, durante todo o curso de Doutorado, tornando possível a concretização de um sonho. Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar os nossos objetivos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso. Muito obrigada a todos;

À Sarah Ola Moreira, por não desanimar diante das dificuldades, por ir atrás dos sonhos, por não ter vergonha de pedir ajuda, por ter a certeza de que iria conseguir... E consegui!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Origem, domesticação e botânica de <i>Capsicum annuum</i> L.....	4
2.2. Usos e conteúdo nutricional	5
2.3. Ocorrência de doenças: um fator limitante às culturas de pimentão e pimenta.....	7
2.3.1. Mancha-bacteriana.....	8
2.4. Melhoramento de <i>Capsicum annuum</i> na UENF	11
2.5. Proteção de cultivares	12
2.5.1. Proteção de cultivares em plantas autógamas.....	16
2.5.2. Participação pública e privada na proteção de cultivares.....	17
2.5.3. Teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade	20
2.5.4. Uso de marcadores moleculares nos testes de DHE	22
2.6. Divergência genética	24
2.6.1. Algoritmo de Gower.....	25
2.6.2. Métodos de agrupamento.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Genótipos	30
3.2. Condições experimentais	31

3.3. Características avaliadas.....	32
3.3.1. Descritores quantitativos	32
3.3.2. Descritores multicategóricos	33
3.3.2.1 Reação à mancha-bacteriana	41
3.3.3. Análise molecular	45
3.3.3.1. Condições de amplificação.....	46
3.4. Divergência genética	48
3.4.1. Obtenção das matrizes de dissimilaridade.....	48
3.4.2. Algoritmo de Gower.....	50
3.4.3. Agrupamentos	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Variáveis quantitativas.....	55
4.2 Resistência à mancha-bacteriana.....	59
4.3. Teste de distinguibilidade e homogeneidade.....	61
4.4. Divergência genética	82
4.4.1. Variáveis quantitativas.....	82
4.4.2. Variáveis qualitativas.....	88
4.4.3. Variáveis moleculares	90
4.4.4. Algoritmo de Gower	93
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE	121

RESUMO

Moreira, S.O.; D.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2012. Caracterização morfológica e molecular de pré-cultivares de *Capsicum annuum* L. com resistência à mancha-bacteriana. Professora orientadora: Rosana Rodrigues. Professores Conselheiros: Alexandre Pio Viana e Antônio Teixeira do Amaral Júnior.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro possui um programa de melhoramento com o objetivo de se obter cultivares de *Capsicum annuum* resistentes à mancha-bacteriana, uma doença importante para a cultura do pimentão e das pimentas. Nesse programa, iniciado em 1998, foram obtidas linhas recombinadas, por meio do método *Single Seed Descent* (SSD), promissoras para o lançamento de cultivares de pimentão e pimenta. Este trabalho teve como objetivos realizar ensaios preliminares de distinguibilidade e homogeneidade, seguindo as diretrizes estabelecidas pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), caracterizando oito linhas recombinadas (LR) por meio de variáveis quantitativas, qualitativas e marcadores moleculares *inter simple sequence repeat* (ISSR); e avaliar as LRs em relação à resistência à mancha-bacteriana (RMB). Foram analisados oito LRs, o genitor UENF 1381 e a cultivar Casca Dura Ikeda, que foi utilizada com o padrão. Foram instalados dois experimentos, um em condições de campo para a avaliação dos descritores fenotípicos (seis quantitativos e 47 qualitativos) e outro em casa de vegetação para análise da RMB e coleta de material para análise molecular. Para análise molecular foram utilizados 15 pares de iniciadores ISSR. Para cada tipo de

variável (quantitativo, qualitativo e molecular), foram obtidas matrizes de dissimilaridade e, com o algoritmo de Gower, foi realizada uma matriz de dissimilaridade conjunta. Para cada matriz obtida foi realizado um agrupamento pelo método da ligação média entre grupo (UPGMA) e pelo método de Tocher. Foram analisados o coeficiente de correlação cofenético e a correlação de Mantel. As LRs testadas tiveram ampla variabilidade quanto à produção e o formato de frutos e as linhas LR 1, 2, 6 e 8 foram resistentes à mancha-bacteriana. Dezoito descritores multicategóricos foram idênticos para todos os genótipos analisados. Dentre os descritores com capacidade de distinção entre os genótipos estão a pigmentação antociânica dos nós, o comprimento e a pilosidade da folha, a profundidade da depressão peduncular do fruto, a intensidade da coloração dos frutos antes da maturação, a forma do ápice, o comprimento e o diâmetro de fruto, e a RMB. A homogeneidade foi verificada para todos os genótipos em 28 dos 47 descritores. As LR 1, 2, 3, 5 e 6 foram as mais homogêneas. Para as variáveis quantitativas, o dendrograma formou dois grupos, sendo um formado pela cultivar padrão, e o outro por todas as LR. Para os dados qualitativos, o agrupamento permitiu uma melhor diferenciação entre as linhas estudadas. A formação dos grupos pelo método de Tocher foi idêntica ao UPGMA para os dados fenotípicos. Para os dados moleculares, houve a formação de cinco grupos, sendo que as linhas 1, 2, 3 e 5 ficaram isoladas. Na análise conjunta, usando o algoritmo de Gower, foi observada a formação de três grupos distintos, sendo menos eficiente na distinção dos genótipos, porém, concordante com os demais dendrogramas. Para todos os agrupamentos, o coeficiente de correlação cofenética foi superior a 83 %. Foi observado que há descritores com capacidade de distinção entre as linhas, porém há a necessidade de melhorar a uniformidade dentro das linhas antes de iniciar os testes de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade solicitados pelo SNPC para a proteção de cultivares.

ABSTRACT

Moreira, S.O.; D.S.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March, 2012. Morphological and molecular characterization of pre-cultivars of *Capsicum annuum* L. with resistance to bacterial spot. Advisor: Rosana Rodrigues. Committee members: Alexandre Pio Viana and Antônio Teixeira do Amaral Júnior.

The Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro has a plant improvement program with the objective of breeding *Capsicum annuum* cultivars resistant to bacterial spot, a relevant disease of pepper and spice crops. By this program, initiated in 1998, promising recombinant lines for new sweet and hot pepper cultivars were obtained by the single seed descent (SSD) method. The purpose of this study was to characterize eight recombinant lines (RL) in preliminary tests of distinctness and uniformity, according to the guidelines of the Brazilian plant variety protection service (SNPC), based on quantitative variables, qualitative variables and inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers; and to evaluate the RLs for resistance to bacterial spot (RBS). The eight RLs, the parent UENF 1381 and the control cultivar Casca Dura Ikeda were analyzed. Two experiments were established, one in field conditions to assess the phenotypic (6 quantitative and 47 qualitative) descriptors, and the other in a greenhouse for analysis of the RBS and sampling for molecular analysis. Fifteen pairs of ISSR primers were used for molecular analysis. For each type of variable (quantitative, qualitative and molecular) dissimilarity matrices were obtained, and by the Gower algorithm, a joint dissimilarity matrix was constructed. For each matrix, clustering

was performed by the Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) and the Tocher method. Analyses using the cophenetic correlation coefficient and the Mantel correlation were performed. The tested RLs had wide variability in terms of yield and fruit shape and the RL 1, 2, 6, and 8 were resistant to bacterial spot. Eighteen multicategoric descriptors were identical for all genotypes analyzed. Some of the descriptors capable of distinguishing genotypes from each other are anthocyanin pigmentation of the nodes, length of leaf hairs, depth of the peduncular fruit depression, fruit color intensity prior to maturation, apex shape, length and fruit diameter, and RBS. Homogeneity of all genotypes was observed for 28 of 47 descriptors. RL 1, 2, 3, 5 and 6 were the most homogeneous. For the quantitative variables, the dendrogram formed two groups, one with the control cultivar and the other containing all RL. For the qualitative data, the grouping allowed a better differentiation of the lines. The groups formed by Tocher were identical to those based on UPGMA for phenotypic data. By the molecular data analysis, five groups were formed, from which the lines 1, 2, 3 and 5, were isolated. In the combined analysis, using the Gower algorithm, three distinct groups were clustered, which were less effective in distinguishing genotypes, but consistent with the other dendrograms. For all groups, the cophenetic correlation coefficient was higher than 83%. Some of the descriptors were capable of distinguishing between the lines, although the uniformity within lines should be improved before testing distinctness, uniformity and stability, as required by the SNPC for the protection of plant varieties.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Capsicum*, que engloba as pimentas e os pimentões, possui grande importância econômica, e seus frutos são utilizados em todo o mundo, *in natura* ou na forma processada. O agronegócio, envolvendo somente a espécie *Capsicum annuum*, exerce importância na agricultura familiar e na integração do pequeno agricultor com a agroindústria (Ribeiro e Cruz, 2004). Além disso, por sua elevada capacidade de geração de emprego e renda e por seu custo de produção por hectare ser relativamente baixo, principalmente se comparado aos custos de outras hortaliças, essa espécie posiciona-se dentro da agricultura brasileira como sendo de grande valor socioeconômico (Costa e Henz, 2007).

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) desenvolve um programa de melhoramento de *Capiscum annuum* visando obter cultivares resistentes à mancha-bacteriana, uma doença que diminui, significativamente, a qualidade dos frutos e a rentabilidade da produção. Nesse programa, a partir do cruzamento entre os acessos UENF 1421 (pimentão suscetível) e UENF 1381 (pimenta resistente), foram obtidas 18 linhas recombinadas promissoras para a resistência e produção de frutos, utilizando-se o SSD (*Single Seed Descent*), como método de melhoramento (Riva et al., 2009). Em sequência, Moreira (2008) e Moreira et al. (2009; 2010a) identificaram as melhores linhas a serem cultivadas em condições de campo e em ambiente protegido, no estado de Rio de Janeiro.

A obtenção de cultivares que atendam aos agricultores e consumidores envolve muita dedicação dos melhoristas nos trabalhos de pesquisa na área de genética e melhoramento (Moreira et al., 2010b). Para que os direitos autorais dos obtentores dessas cultivares possam ser respeitados, legislações específicas têm sido criadas em diversos países (Schuster et al., 2006).

No Brasil, para a obtenção de certificado de proteção de cultivares junto ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é necessário seguir determinadas instruções estabelecidas pela Lei de Proteção de Cultivares (LPC) (Brasil, 1997). Assim, experimentos que possam comprovar a distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) de uma nova cultivar devem ser realizados mediante adoção de condições estabelecidas pela legislação, tais como número mínimo de dois ciclos de crescimento e parcelas experimentais de tamanho suficiente para garantir as observações necessárias (Brasil, 2006).

Tradicionalmente, as características avaliadas nos testes de DHE são caracteres morfológicos com relevância agrônômica (Bernet et al., 2003). Esse teste é baseado em descritores qualitativos, na maioria multicategóricos, que são avaliados nos diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Apesar de estas características serem pouco afetadas pelo ambiente em função do tipo de herança gênica, esses descritores apresentam limitações, como a subjetividade no momento da avaliação e tempo gasto para realizá-las, uma vez que muitos descritores são observados na planta adulta (Priolli et al., 2002; Monteiro et al., 2010).

Tão importante quanto as características morfológicas, a capacidade produtiva, como o número e o peso dos frutos, são de suma importância para que uma cultivar seja utilizada pelos agricultores. Assim, apesar de não estarem incluídas, de forma direta, nos testes de DHE, algumas características agrônômicas relacionadas à produtividade devem ser avaliadas. Entretanto, essas variáveis são governadas por vários genes e, desse modo, sua expressão é influenciada por fatores ambientais, o que pode implicar falhas nas observações. Além disso, essas variáveis podem não ser suficientes para diferenciar cultivares relacionadas ou que possuem a mesma genealogia, como no caso de linhas recombinadas (Priolli et al., 2002).

Já os marcadores moleculares mostram diferenças em nível de DNA, que não são afetadas pela fase de crescimento da planta, local e época de plantio ou

pelas práticas agronômicas utilizadas (Kwon et al., 2005). As técnicas moleculares, apesar de, ainda, não serem reconhecidas como metodologia oficial, vêm sendo utilizadas para caracterizar e identificar cultivares para fins de proteção (Schuster et al., 2006). Dentre os tipos de marcadores moleculares, os ISSR (*inter-simple sequence repeats*) estão sendo utilizados com sucesso na diferenciação de cultivares (Goulão e Oliveira, 2001; Reddy et al., 2002; Shen et al., 2006).

Independente da base de dados utilizada, a análise de divergência genética, associada à análise de agrupamentos, pode ser empregada para caracterizar a variabilidade tanto entre quanto dentro dos genótipos de interesse, e se constituem em excelentes alternativas para facilitar a interpretação de dados (Monteiro et al., 2010). Entretanto, a geração de um grande número de dados de diferentes categorias (quantitativos, qualitativos e moleculares) pode dificultar a interpretação dos resultados de caracterização e avaliação de acessos. Sendo assim, a análise conjunta das diferentes variáveis pode fornecer melhor distinção entre os genótipos (Gonçalves et al., 2009; Rocha et al., 2010).

Considerando-se a continuidade do programa de melhoramento de pimentas e pimentões no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, este trabalho tem como objetivos: i) realizar ensaios preliminares de distinguibilidade e homogeneidade, em plantio convencional, segundo as instruções do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares para *Capsicum annum* L. (contidas no Ato n.º 2 de 22 de março de 2006); ii) caracterizar oito linhas endogâmicas recombinadas obtidas no programa de melhoramento da UENF e diferenciá-las entre si e das cultivares comerciais, por meio de caracteres quantitativos, multicategóricos, marcadores moleculares (ISSR); e iii) avaliar as linhas recombinadas quanto à resistência à mancha-bacteriana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, domesticação e botânica de *Capsicum annum* L.

Pertencente à famílias das solanáceas, o gênero *Capsicum* possui 31 espécies confirmadas e cinco em vias de serem classificadas (Moscone et al., 2007). Os registros mais antigos do consumo do gênero *Capsicum* datam de 9.000 a.C., encontrados em explorações arqueológicas realizadas em Tehuacán, México (Rufino e Penteado, 2006). Há relatos da existência de um morfotipo de amido fóssil, oriundo de frutos de *Capsicum* spp., comumente encontrado em artefatos, ferramentas, vasilhas de cerâmica, entre outros. Esses microfósseis, exclusivos do gênero *Capsicum*, foram encontrados em sete sítios arqueológicos, entre o Arquipélago das Bahamas e na América do Sul Andina, datando de 6.000 anos atrás (Perry et al., 2007).

As espécies desse gênero podem ser divididas com base no processo de domesticação, sendo que as espécies domesticadas são: *Capsicum annum*, *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. chinense* e *C. baccatum*. (IBPGR, 1983; Mongkolporn e Taylor, 2011). Dentre as espécies desse gênero, *C. annum* é a de maior importância econômica, a mais cultivada e com diversas formas domesticadas. Nessa espécie, estão incluídos os pimentões, as pimentas doces para páprica, as pimentas ‘Jalapeño’, ‘Cayenne’, ‘Serrano’, ‘Cereja’, entre outras, além de algumas cultivares ornamentais (Moreira et al., 2006).

A taxonomia do gênero *Capsicum* é complexa, devido à grande variabilidade de formas existentes e à diversidade de critérios utilizados para sua classificação. Contudo, a espécie *C. annuum* é pertencente à divisão Spermatophyta (nova classificação proposta: Magnoliophyta), classe Dicotyledonea (nova classificação proposta: Magnoliopsida), ordem Solanales, família Solanaceae, subfamília Solanoideae e tribo Solaneae (Heiser e Pickersgill, 1969).

A planta é arbustiva, com caule semilenhoso, que pode ultrapassar um metro de altura. As plantas são cultivadas como plantas herbáceas anuais, embora sejam perenes. *C. annuum* possui flores isoladas, pequenas e hermafroditas, com cinco anteras e um único estigma; sua corola possui coloração branca leitosa. É uma planta de autofecundação, embora a taxa de cruzamento possa ser elevada, dependendo da ação de insetos polinizadores. Seus frutos são bagas ocas, pendentes, de tamanho e formato variados, geralmente cônico ou cúbico, de cores com diferentes gradações, passando, quando maduros, por verde, vermelho, amarelo, creme, roxo, dentre outras, (Viñals, 1996). A espécie *C. annuum* é diplóide, com $2n = 24$ cromossomos (Moscone et al., 2007).

Em *Capsicum annuum*, podem existir frutos pungentes ou não-pungentes. A pungência da pimenta deve-se à presença de alcalóides, entre eles, a capsaicina e diidrocapsaicina. Essas substâncias estão presentes na placenta, nas sementes e, em menor quantidade, no pericarpo. A quantidade desses alcaloides, nas pimentas, pode variar de 0 (pimentas doces) a 300.000 SHU (*Scoville Heat Unit*) ou mais (pimentas picantes). A pungência nos frutos é condicionada pelo *gene C* (Lippert et al., 1965). Blum et al. (2002) localizaram o *locus C* no cromossomo 2, na geração F_2 do cruzamento entre *C. frutescens* e *C. annuum*. Entretanto, para a espécie *C. chinense*, Stewart Jr et al. (2007) relataram que a presença de capsaicinóides é controlada pelo *locus Pun 1* e, no homocigoto recessivo *pun1/pun1*, não houve síntese desses compostos.

2.2. Usos e conteúdo nutricional

As pimentas e os pimentões foram, possivelmente, os primeiros aditivos alimentares utilizados pelas civilizações antigas do México e América do Sul,

sendo usado para dar aroma, cor, sabor e preservar os alimentos (Pickersgill, 1997). Esses frutos estão presentes na culinária da maioria dos países, sendo amplamente utilizados como condimento, corante e hortaliças. Os tipos pungentes são usados frescos, verdes ou maduros, curtidos, secos ou industrializados. Os tipos não-pungentes são amplamente utilizados, verdes ou maduros, como hortaliças, sendo, também, consumidos frescos, curtidos, assados, cozidos, secos, em pó ou em conserva (Viñals, 1996; Pickersgill, 1997; Filgueira, 2008; Moreira et al., 2006). Os frutos de *Capsicum* contêm as vitaminas A, B₁, B₂, E e, principalmente, vitamina C. Possuem, ainda, proteínas, glicídios, lipídios, minerais, água e fibras (Geleta e Labuschagne, 2006). Quando consumidos na dieta, em quantidades adequadas, podem assegurar a manutenção das funções vitais do organismo, suprimindo as necessidades de energia, de elaboração e manutenção dos tecidos e de equilíbrio biológico. Os frutos possuem pigmentos, como os carotenóides, responsáveis pela sua coloração e pelo corante vermelho da páprica (IBPGR, 1983; Carvalho et al., 2010).

Além de usos culinários, pimentas e pimentões estão sendo estudados por áreas relacionadas à medicina e à farmácia, por sua ação conservante, antimicrobiana, para fins terapêuticos e na prevenção de doenças. Carvalho et al. (2010) estudaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de pimentas e pimentões sobre quatro bactérias que infectam e intoxicam alimentos, onde quatro genótipos estudados apresentaram atividade de inibição e inativação seletiva sobre salmonelas, coliformes fecais, enterococos e estafilococos. Santos et al. (2011), utilizando os materiais advindos do Programa de Melhoramento de *Capsicum* da UENF, relataram que os extratos de capsaicina e diidrocapsaicina, na concentração de 1,25 µg/mL, inibiram o crescimento de *Streptococcus mutans*. E Ribeiro et al. (2007) observaram que proteínas extraídas das sementes de *C. annuum* inibiram o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia membranifaciens*, *Kluyveromyces marxianus* e *Candida guilliermondii*, bem como foram capazes de causar a desorganização da parede celular nas diferentes leveduras. Por serem fontes de três antioxidantes naturais (vitamina C, os carotenóides e a vitamina E), os frutos de *Capsicum* são utilizados na prevenção de doenças degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, mal de Parkinson e mal de Alzheimer.

2.3. Ocorrência de doenças: um fator limitante às culturas de pimentão e pimenta

Várias doenças são relatadas na literatura como sendo de grande importância nas culturas do pimentão e da pimenta (Carmo et al., 2006; Filgueira 2008; Glosier et al., 2008; Bnejdi et al., 2009; Maramé et al., 2010).

Entre as de etiologia fúngica, destacam-se a antracnose, a murcha-de-fitóftora e o oídio. A antracnose [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc] é relatada como uma das doenças mais comuns nos frutos de *C. annuum* e para várias outras espécies de importância agrônômica, como tomate, jiló e berinjela. É provocada por um fungo de solo que ataca plantas desde a sementeira até a fase adulta e se caracteriza pelas lesões que provoca nos frutos, no campo ou em pós-colheita (Carmo et al., 2006).

A murcha-de-fitóftora (*Phytophthora capsici* Leonian), também conhecida como requeima, está distribuída em quase todos os continentes, em regiões de clima temperado ou tropical. Os sintomas típicos da doença são a murcha repentina, necrose de coloração marrom-escura no colo e a morte da planta. Diversos métodos de controle têm sido adotados a fim de impedir que a doença se estabeleça, porém todos os métodos sugeridos têm limitações (Santos e Goto, 2004; Glosier et al., 2008). Já o oídio [*Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud] tem sido considerada a doença mais problemática sob cultivo protegido no Brasil e em outros países, causando desfolha de até 75 % e perdas de até 40 % da produção. Seu controle por meio de fungicidas sistêmicos tem se mostrado ineficaz, sendo a resistência genética a melhor alternativa (Blat et al., 2005).

Entre as doenças virais, há relatos de infecção natural por mais de 20 espécies de vírus, sendo os mais importantes no Brasil, o PVY (*Potato virus Y*), o PepYMV (*Pepper Yellow Mosaic Virus*), o TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) e os tospovírus (Inoue-Nagata et al., 2001; Inoue-Nagata et al., 2002; Carmo et al., 2006).

O PVY é considerado um dos mais importantes, que impede o plantio de pimentões suscetíveis no Centro-Sul do país (Kurozawa e Pavan, 1997). A série 'Agrônômico', desenvolvida por um programa de melhoramento de pimentão visando à incorporação de genes de resistência ao mosaico causado pelo PVY, foi bastante eficiente e impediu a disseminação das estirpes do vírus presentes no

Brasil (Carmo et al., 2006). Em pimenta, não há cultivares com os genes de resistência ao PVY (Inoue-Nagata et al., 2001; Inoue-Nagata et al., 2002; Maramba et al., 2010).

Entre as doenças de etiologia bacteriana, destacam-se a murcha-bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) e a mancha-bacteriana (*Xanthomonas euvesicatoria*) (Jones et al., 2004). A murcha-bacteriana ocorre, em maior frequência, em regiões quentes e úmidas. A bactéria sobrevive no solo por vários anos e tem uma ampla gama de hospedeiros. Seu sintoma é a murcha rápida das plantas, em princípio nas horas mais quentes do dia, até à murcha permanente e à morte da planta (Coelho Netto et al., 2004; Araújo et al., 2005).

2.3.1. Mancha-bacteriana

A mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas euvesicatoria*, é considerada a principal doença bacteriana da cultura da pimenta e do pimentão. Pode causar danos foliares enormes, tanto em ambiente protegido quanto no campo, acarretando perda da produção e qualidade dos frutos (Kimura 1984; Mello et al., 1996; Sahin e Miller, 1998; Jones et al., 2004, Macuzzo et al., 2009a; Macuzzo et al., 2009b; Riva-Souza et al., 2009; Hamza et al., 2010).

O primeiro relato da mancha-bacteriana ocorreu no sul da África, em 1914, na cultura do tomateiro e, em 1920, foi descrita por Ethel Doidge (Jones et al., 1998). No Brasil, na cultura do pimentão, foi observada, pela primeira vez em 1947, na região do nordeste brasileiro. Desde então, é uma das doenças bacterianas mais difundidas no Brasil, sendo encontrada em todas as regiões produtoras (Kimura, 1984; Macuzzo et al., 2009b).

Xanthomonas euvesicatoria é uma bactéria gram-negativa, baciliforme, móvel por meio de um flagelo polar, formadora de colônia amarela lisa em meio de nutriente-ágar (Kurozawa e Pavan, 1997; Jones et al., 1998; Jones et al., 2004).

A infecção ocorre por meio de ferimentos e aberturas naturais (estômatos e hidatódios) e a colonização dos espaços intercelulares é localizada, induzindo sintomas visíveis, como lesões encharcadas que, posteriormente, se tornam necroses, resultando em desfolha e frutos severamente manchados, levando a perdas economicamente importantes para a cultura. A doença se manifesta em

qualquer fase de desenvolvimento da planta e a severidade da doença e os danos causados são dependentes da umidade relativa e temperatura do ar. O processo infeccioso é favorecido por umidade relativa entre 95 e 100 % e temperaturas entre 22 e 32 °C (Kimura, 1984; Kurozawa e Pavan, 1997; Macuzzo et al., 2009b). Macuzzo et al. (2009b) notaram um acréscimo gradativo de doença à medida que a temperatura aumentou de 15 para 25 °C, para um período contínuo de molhamento foliar. No intervalo entre 25 e 30 °C ocorreu um aumento acentuado de severidade quando o período de molhamento foliar ultrapassou 20 horas. Por outro lado, à temperatura de 30°C houve um decréscimo da severidade, e a 15 °C, não houve aparecimento de sintomas mesmo após 40 horas de molhamento foliar.

A doença é disseminada pelo vento, pela água da chuva, por insetos, pelo uso de ferramentas e sementes contaminadas, sendo as sementes contaminadas a principal forma de disseminação a longas distâncias (Macuzzo et al., 2009a; Moretti et al., 2009). Carmo et al. (2001) relataram que sementes de pimentão com 0,01 % de contaminação podem resultar em 100 % de mudas contaminadas ao final de 30 dias, sob condições favoráveis.

A prevenção da doença deve incluir o uso de sementes e mudas saudáveis, obtidas a partir de lavouras livres da doença, e a rotação de culturas, evitando solanáceas (Cuppels et al., 2006). No campo, a mancha-bacteriana é de difícil controle, devido, principalmente, à baixa eficiência dos antibióticos e à predominância de estirpes resistentes ao sulfato de estreptomicina e aos produtos à base de cobre. Apesar de serem recomendados no início de ocorrência da doença, os antibióticos contribuem para a seleção de populações resistentes aos princípios ativos dos produtos, para o aumento do risco de contaminação ambiental e do consumidor, e do custo de produção (Kimura, 1984; Carmo et al., 2001; Carmo et al., 2006; Cuppels et al., 2006; Silva et al., 2006; Macuzzo et al., 2009a).

Vários autores citam o uso de cultivares resistentes como o processo mais eficaz no controle de doenças em plantas (Mello et al., 1996; Sahin e Miller, 1996; Sahin e Miller, 1998; Romero et al., 2001; Quezado-Duval e Camargo, 2004; Silva-Lobo et al., 2005a; Silva-Lobo et al., 2005b). A resistência genética é desejada, uma vez que reduz a contaminação do ambiente e dos alimentos pelo uso de agrotóxicos (Lopes e Ávila, 2002).

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes, é fundamental conhecer a variabilidade do agente etiológico (Mello et al., 1996; Silva-Lobo et al., 2005b; Cuppels et al., 2006; Moretti et al., 2009; Hamza et al., 2010). A taxonomia e a evolução das espécies do gênero *Xanthomonas*, associadas ao tomate e ao pimentão, têm sido objeto de discussão desde 1921, logo após a sua descoberta (Silva-Lobo et al., 2005b).

Um dos aspectos envolvidos nesses estudos é a interação dos genes de avirulência do patógeno com os genes de resistência do hospedeiro. Essa interação resulta em considerável variação nos isolados do gênero *Xanthomonas* patogênicos ao tomate, ao pimentão e à pimenta. Baseado nessa interação, três grupos de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), como era denominada à época, foram identificados: o grupo do tomate (XcvT), patogênico somente ao tomate; o grupo do pimentão (XcvP), somente patogênico ao pimentão, e o grupo tomate-pimentão (XcvTP), patogênico tanto para o tomate quanto para o pimentão (Sahin e Miller, 1996, Jones et al., 1998). Ainda de acordo com essa classificação, dentro de cada um desses grupos, existem raças fisiológicas. No grupo XcvP, nove raças fisiológicas associadas ao gênero *Capsicum* foram identificadas e denominadas como P0, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8 (Jones et al., 1998).

Pelo fato do patógeno ter se mostrado variável em suas características fenotípicas e genotípicas, foi possível distingui-los em grupos. Em 1995, Vaunterin et al. (1995) propuseram a separação da espécie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em dois grupos: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Grupo A) para isolados não aminolíticos; e *Xanthomonas vesicatoria* (Grupo B) para isolados fortemente aminolíticos.

Em estudos posteriores realizados por Jones et al. (2000), incluindo testes de patogenicidade, atividade enzimática, marcadores genéticos, hibridização DNA-DNA e comparação de sequências de RNA, concluiu-se que, dentro do grupo XcvTP, existiam quatro tipos fenotípicos distintos, os quais englobavam três espécies diferentes, a saber: *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C), *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. gardneri* (grupo D). O grupo C foi colocado com o subgrupo de A, pois apresentavam diferenças fenotípicas, mas alta homologia em experimentos de hibridização DNA-DNA. Já o grupo D mostrou-se pouco

relacionado com os grupos A e B, sendo classificado como uma terceira espécie associada à doença.

Entretanto, Jones et al. (2004) mostraram que a espécie *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* possuíam menos de 70% de similaridade, em nível de DNA, com a *X. axonopodis*. Observaram, ainda, que os isolados do grupo C eram diferentes dos isolados do grupo A, por serem fortemente aminolíticos e pectolíticos e, também, por diferenças na utilização do carbono. Por isso, propuseram a reclassificação dos grupos A e C para *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas perforans*, respectivamente (Jones et al., 2004; Cuppels et al., 2006; Robbins et al., 2009).

Três genes dominantes de resistência à mancha-bacteriana (*Bs1*, *Bs2* e *Bs3*) foram identificados nos acessos PI 163192 (*C. annuum*), PI 260435 (*C. chacoense*) e PI 271322 (*C. annuum*), respectivamente (Jones et al., 1998; Sahin e Miller, 1998). Esses genes foram introduzidos em três linhas quase-isogênicas de pimentão, derivadas da cultivar *Early California Wonder*, denominadas ECW-10R, ECW-20R e ECW-30R, cada uma contendo um gene de resistência acima citado (Jones et al., 1998).

Várias pesquisas, objetivando a identificação de fontes de resistência à mancha-bacteriana e obtenção de cultivares resistentes em *Capsicum*, já foram realizadas por diferentes autores. Sahin e Miller (1998) avaliaram 170 genótipos de *Capsicum* de oito espécies diferentes e identificaram somente um genótipo de *C. pubescens* resistente a Xcv raça 6. Noda et al. (2003), realizando seleção em pimentão, sob condições naturais de infecção, observaram que a seleção de genótipos mais resistentes ao patógeno conduzia à seleção de genótipos mais produtivos.

2.4. Melhoramento de *Capsicum annuum* na UENF

A UENF, desde o ano 2000, vem mantendo um programa de melhoramento, objetivando o desenvolvimento de cultivares de *C. annuum* resistentes à mancha-bacteriana.

Entre os resultados obtidos, cita-se a 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). Posteriormente, foram identificados pelo menos de três genes recessivos, controlando a resistência no cruzamento UENF 1421 x UENF 1381 (Riva et al., 2004). E ainda, observou-se que, utilizando-se o 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).

O avanço de gerações do cruzamento UENF 1421 x UENF 1381 foi realizado pelo método SSD (*Single Seed Descent*), e foram identificadas 18 linhas endogâmicas recombinadas promissoras para resistência à mancha-bacteriana (Riva, 2006; Riva-Souza et al., 2009). Moreira (2008) e Moreira et al. (2009; 2010a) estudaram a interação dessas linhas com o ambiente e identificaram as melhores para o plantio convencional e para o cultivo em ambiente protegido com manejo orgânico, no estado do Rio de Janeiro. Após esse estudo, foi possível identificar um menor número de linhas, com resistência à mancha-bacteriana e características agronômicas desejáveis. Tais linhas estão sendo utilizadas na continuação do programa de melhoramento, que visam à execução de ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) para requerer o pedido de proteção de cultivar junto ao Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.5. Proteção de cultivares

A obtenção de cultivares que atendam aos agricultores e consumidores envolve muita dedicação dos melhoristas nos trabalhos de pesquisa na área de genética e melhoramento de plantas (Moreira et al., 2010b). Além disso, o desenvolvimento de novas cultivares de plantas é demorado e caro e, no caso de plantas autógamas, como a pimenta, estas podem ser facilmente reproduzidas sem controle. Por essa razão, para que haja estímulo na continuidade das pesquisas, foi desenvolvido um mecanismo legal de proteção para essas inovações (Carraro, 2005).

A proteção de cultivares garante os direitos intelectuais aos obtentores, possibilitando que empresas públicas e privadas possam ser beneficiadas com o ingresso de recursos decorrente dos direitos sobre as cultivares que

desenvolvem, dando sustentabilidade à continuidade de programas de melhoramento e o subsequente lançamento de cultivares de interesse para o agronegócio (Kumar et al., 2001; Carvalho et al., 2009).

Com o objetivo de fornecer e promover um sistema efetivo de proteção de variedade vegetais, encorajando o desenvolvimento de novas cultivares para o benefício da sociedade, foi criada, em 1961, a União Internacional para a Proteção de Cultivares (UPOV). Trata-se de um acordo multilateral que determina as normas comuns para o reconhecimento e a proteção da propriedade intelectual dos obtentores de novas variedades vegetais. Esse marco regulatório deve ser seguido pelos países signatários ao estabelecerem os certificados de Proteção de Variedade de Plantas (PVP) nas legislações locais (Kumar et al., 2001; Aviani et al., 2008; UPOV, 2009; Brasil, 2011).

O acordo inicial de 1961 foi revisado pela UPOV em 1972, em 1978 e em 1991. Atualmente todos os 66 estados membros são signatários das Atas de 1978 e 1991. A Ata de 1978 previa, dentre outros aspectos, que as variedades protegidas deveriam ser distintas, homogêneas e estáveis e proibia a dupla proteção (simultaneamente por direito de melhorista e patente). A Ata de 1991 agregou a exigência de a variedade ser nova (não ter sido colocada à venda por um período determinado de tempo), ampliou o prazo de proteção e introduziu a noção de variedade essencialmente derivada (Carraro, 2005; Carvalho et al., 2007; Aviane et al., 2008). Qualquer nova adesão à UPOV deve subscrever os termos da Ata de 1991 (Aviani et al., 2008).

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. No entanto, existem diversas características na legislação brasileira que são plenamente compatíveis com a convenção de 1991, das quais as mais marcantes são o conceito de cultivar essencialmente derivada, o prazo do certificado de proteção e a manutenção dos direitos dos pequenos produtores (Carraro, 2005; Carvalho et al., 2007).

A Lei de Proteção de Cultivares (LPC), ou Lei 9.456, foi regulamentada no dia de 7 de novembro de 1997, através do Decreto n.º 2.366 do Presidente da República (Brasil, 1997). Na denominação da lei, cultivar é "(...) a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível das 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, bem como a linhagem componente de híbridos (...)” (Brasil, 1997).

A LPC tem como objetivos a proteção de novas cultivares, ou cultivares essencialmente derivadas, produzidas nos programas de melhoramento genético conduzidos por instituições de pesquisa públicas e privadas, como também a garantia dos direitos do criador (Casali, 1997; Vieira, 2004). A cultivar é considerada essencialmente derivada de outra (cultivar inicial) quando: é predominantemente derivada de uma inicial e retém a expressão do genótipo ou combinação de genótipos da cultivar inicial; é claramente distinguível da cultivar inicial; e, exceto pelas diferenças que resultam do processo de derivação, é análoga à cultivar inicial na expressão de características essenciais que resultam do genótipo inicial (UPOV, 1991).

A proteção recai sobre o material de reprodução das plantas (semente, tubérculos, estacas, etc.) e seu período de proteção é de 15 anos, exceto para videiras e árvores frutíferas, florestais e ornamentais, para as quais a duração é de 18 anos. Findo o período de proteção, a cultivar entra em domínio público e nenhum direito poderá impedir sua livre utilização (Castro, 2006). Também há possibilidades de cancelamento da proteção quando ocorrer, dentre outras situações, a perda de homogeneidade ou estabilidade, quando for comprovado que a cultivar tenha causado impacto desfavorável ao ambiente e à saúde humana (Casali, 1997; Aviani et al., 2008).

Os requisitos necessários para a proteção de cultivares são: ser produto de melhoramento genético; ser uma espécie passível de proteção; não ter sido comercializada no exterior há mais de quatro anos (ou há mais de seis anos, nos casos de videira ou árvores); não ter sido comercializada no Brasil há mais de um ano; e ser distinta, homogênea e estável (Aviani et al., 2008; Carvalho et al., 2009).

Outro ponto que merece destaque são as restrições impostas pelo Artigo 9º da LPC. Nesse artigo, fica assegurado o direito do obtentor de explorar comercialmente sua criação, ficando vedado a terceiros sem expressa autorização. A lei não fala em valores de *royalties*, deixando livre a negociação entre obtentor e licenciado (pessoa física ou jurídica responsável pela

multiplicação e comercialização das sementes), devendo o próprio mercado regular esse valor (Carraro, 2005). A obtenção do certificado de proteção, todavia, não habilita o titular a produzir e comercializar a cultivar. Para isso, é necessário efetuar inscrições no Registro Nacional de Cultivares (RNC) e no Registro Nacional de Sementes e Mudanças (RENASSEM) (Brasil, 2011).

Segundo Casali (1997), a proibição da comercialização por terceiros pode influenciar diretamente a olericultura, uma vez que as cultivares protegidas poderão ser monopolizadas à medida que as pequenas empresas – principais produtoras de sementes de olerícolas - forem desaparecendo. Marinho et al. (2011) relatam que empresas multinacionais têm capacidade de desenvolver rapidamente suas pesquisas e criar novas tecnologias e, assim, tais empresas vão ter proporções maiores do mercado brasileiro, reduzindo o espaço ocupado por empresas locais. Sobre este aspecto, porém, Carvalho et al. (2007) relatam que o quadro é favorável à produção de sementes por empresas nacionais de porte regional e que é possível organizar parcerias voltadas para o desenvolvimento e comercialização de novas cultivares, estabelecendo complementaridade entre todos os agentes que participam do processo de inovação.

Cabe ressaltar que o Artigo 10 da LPC determina que não fere o direito de propriedade sobre a cultivar protegida aquele que: reserva e planta sementes para uso próprio; usa ou vende como alimento ou matéria-prima o produto obtido do seu plantio, exceto para fins reprodutivos; utiliza a cultivar como fonte de variação no melhoramento genético ou na pesquisa científica; ou que, sendo pequeno produtor rural, multiplica sementes, para doação ou troca, exclusivamente para outros pequenos produtores rurais, no âmbito de programas de financiamento ou de apoio a pequenos produtores rurais, conduzidos por órgãos públicos ou organizações não-governamentais, autorizados pelo Poder Público (Brasil, 1997). Com isso, ficou preservado o direito do pequeno produtor, permitindo a ele reservar para uso próprio, trocar ou doar material de plantio sem que tenha que pagar *royalties* ao titular da proteção. Preserva, também, os direitos do melhorista, já que qualquer empresa ou indivíduos podem fazer uso de material protegido para desenvolver pesquisas científicas ou como fonte de variação no melhoramento genético, sem que, com isso, tenham necessidade de pedir autorização (Aviani et al., 2008; Brasil, 2011).

A LPC também tem a intenção de facilitar o intercâmbio de material genético e, assim, promover o enriquecimento genético da agricultura brasileira, bem como permitir a importação de sementes comerciais e assegurar, em contrapartida, que o Brasil também possa exportar esse tipo de material. Entretanto, Marinho et al. (2011) enfatizam que tem havido restrições (veladas ou ostensivas) no intercâmbio de germoplasma entre instituições locais, o que não é uma situação positiva para o progresso dos programas de melhoramento de plantas no Brasil. Pelo contrário, os programas devem ter facilidades para a obtenção de acesso ao material em bancos de germoplasma nacionais, a fim de favorecer o contínuo avanço do agronegócio brasileiro.

2.5.1. Proteção de cultivares em plantas autógamas

Existem duas formas de se estabelecer o controle sobre sementes: a biológica, em que é possível controlar a polinização das culturas; e a legal, feita pela proteção da propriedade intelectual de plantas (Carraro, 2005).

O controle da polinização feito pelo melhorista, no sentido de manter a homogeneidade da cultivar, somente é efetivo para cultivares híbridas. Para os híbridos, o controle de sua obtenção é mantido quando se tem a posse das linhagens que os originaram, permitindo um "patenteamento natural" de sementes (Marinho et al., 2011). Aliado a isso, a constituição genética de um híbrido não permite a sua multiplicação sem que haja perda de homogeneidade e produtividade, causada pela segregação genética ocorrida em geração F_2 (Allard, 1971). Assim, as empresas produtoras de sementes de híbridos se utilizavam de mecanismos não-jurídicos para a apropriação dos direitos e retorno dos investimentos em tecnologia, que é o chamado "segredo de linhagem" (Carraro, 2005).

Para plantas autógamas, a constituição do material genético permanecerá inalterada com as sucessivas gerações, podendo os agricultores produzir as sementes da sua própria lavoura (Allard, 1971; Moreira et al., 2010b). Assim, a proteção de cultivares pode influenciar mais diretamente para as cultivares que se constituem linhas puras (Carvalho et al., 2009)

A produção de sementes de plantas autógamas, no aspecto da origem de cultivares, pode ser classificada, no Brasil, em dois períodos distintos: antes e

depois da aprovação da LPC. O primeiro caracterizou-se pelo domínio público das cultivares, ou seja, os produtores de sementes tinham livre acesso às mesmas para a alimentação de seus programas de multiplicação e comércio de sementes. No segundo período, após a aprovação da lei, as novas cultivares que foram sendo liberadas passaram a ter a possibilidade de receber o Certificado de Proteção, aumentando gradativamente o número de variedades e o volume de sementes com proteção. Essas cultivares, a partir de então, necessitam de autorização dos respectivos obtentores para uso comercial. Essa alteração mudou o comportamento das empresas e do mercado de sementes de plantas autógamas no país (Carraro, 2005; Brasil, 2011).

Diante das diferenças nas estruturas genéticas das cultivares, Villas Bôas (2008) relata que o fato de a hibridação assegurar os direitos do obtentor sobre novas variedades de espécies cultivadas em larga escala, estimulou a consolidação de empresas especializadas na produção de sementes, principalmente de milho, na Europa, nos Estados Unidos e no Brasil. Em outras espécies, nas quais a hibridação não tinha aplicação, o setor público atuou mais intensamente, e desenvolveram-se grandes programas internacionais de melhoramento (Wilkinson e Castelli, 2000).

2.5.2. Participação pública e privada na proteção de cultivares

Como consequência da LPC, houve um aumento nos investimentos em programas de melhoramento genético, resultando no desenvolvimento de novas cultivares, mais produtivas e adaptadas às exigências dos agricultores (Vieira, 2004; Castro, 2006). Villas Bôas (2008) relata que, após dez anos da implantação da Lei de Proteção de Cultivares, foi constatado que esta proporcionou estímulo à pesquisa agropecuária brasileira no campo da genética e do melhoramento e resultou em benefícios aos agricultores e consumidores brasileiros que adotaram as novas cultivares. Esse estímulo pode ser percebido pelo número crescente de cultivares protegidas. Em 2008, havia 1.047 certificados de proteção concedidos (Aviani et al., 2008). Marinho et al. (2011) relatam a existência de 1.405 certificados de proteção emitidos até o ano de 2010. No início de 2012, esse número já havia subido para 1.568 certificados emitidos (Brasil, 2012). São 163

certificados emitidos em pouco mais de um ano, representando um incremento de 10,39 %. Entre 2008 e 2012, o incremento foi de quase 50 %.

A participação pública na obtenção de cultivares protegidas vem caindo nos últimos anos. Em pesquisa feita por Carvalho et al., (2007), com dados levantados até 2003, as instituições públicas de pesquisa nacionais detinham, à época, praticamente 40 % do total de cultivares protegidas no Brasil. Juntamente com cultivares protegidas de cooperativas e associações nacionais, chegava-se a 60 % do total. As empresas privadas representavam quase 40 %. Em 2008, Aviani et al. (2008) relataram que empresas públicas continuavam com cerca de 40 % do total de cultivares protegidas, porém o número de cultivares protegidas por empresas estrangeiras já era maior que 35 %, tendo empresas nacionais perdido espaço. Em 2010, os números já indicavam que as empresas privadas dominavam o mercado de cultivares protegidas, com participação de 53,56 %. Entre as proteções solicitadas pelo setor privado, 61,35 % foram feitas por empresas estrangeiras. As instituições públicas detinham 42,83 %. Outras cultivares foram obtidas por parceria público/privada (3,61 %) (Marinho et al., 2011).

Marinho et al. (2011) observaram ainda que 26 instituições públicas possuíam certificados de proteções emitidos, dos quais somente oito são de universidades. Institutos de pesquisa foram responsáveis por 78,7 % das proteções, enquanto as universidades representaram 11,1 %, e a restante (10,2 %), foi desenvolvido por meio de parcerias entre as instituições. A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) tinha 289 proteções exclusivas e 34 em parceria, totalizando 323, o que correspondia a 71,6 % das proteções mantidas por instituições públicas.

A pequena participação de universidade deve-se ao fato de que, em geral, as universidades têm como principal objetivo a formação de pesquisadores, além de terem dificuldades operacionais e financeiras, de manter experimentos relativamente grandes por muitos anos, fator essencial para o desenvolvimento de uma cultivar (Moreira et al., 2010b). Segundo Carraro (2005), no Brasil, as universidades dão ênfase à pesquisa básica, enquanto a pesquisa aplicada era mais presente nos centros regionais de pesquisa e nos institutos estaduais. Especificamente para o feijoeiro, Matos et al. (2007) citaram que, entre os programas do setor público, a Embrapa e outras empresas estaduais continuarão

a ter a responsabilidade de obter novas linhagens que substituam, com vantagens, as pré-existentes.

A legislação de proteção de cultivares, nos Estados Unidos, provocou o deslocamento da pesquisa pública para atividades mais básicas, passando a executar o melhoramento genético de populações, enquanto a liberação de cultivares tornou-se atividade quase exclusiva do setor privado. Na Inglaterra, a instituição pública, que tinha uma história de sucesso no melhoramento genético vegetal foi desmembrada, separando-se a pesquisa básica do lançamento de cultivares, para, posteriormente, ser privatizada. No Brasil, a legislação de proteção de cultivares, ao assegurar os direitos de propriedade intelectual sobre cultivares de espécies autógamas, estimulou a iniciativa privada a atuar mais intensamente no melhoramento genético (Villas Bôas, 2008).

Parcerias entre instituições públicas de pesquisa com indústrias de sementes de determinados gêneros e espécies vegetais - como soja, trigo, algodão e forrageiras - foram articuladas com a vigência da LPC. Nessas parcerias, o setor privado apóia determinado programa de melhoramento, cujas cultivares são protegidas em nome da entidade obtentora. E a produção de sementes dessas cultivares é licenciada com exclusividade, mediante pagamento de *royalties*, por determinado período, às empresas de sementes que financiaram o programa de melhoramento. Em 2008, a Embrapa arrecadou cerca de 15 milhões de reais com os *royalties* provenientes das parcerias publico/privadas (1,2 % do orçamento total da instituição) (Brasil, 2011).

Especificamente para hortaliças, Marinho et al. (2011) perceberam que, mesmo com a possibilidade de retorno financeiro, dada pela LPC, as instituições públicas não estão contrabalançando o mercado nesse segmento, deixando essas culturas para o controle de empresas privadas. Portanto, é necessário estabelecer políticas que impulsionem o setor público para se tornar mais competitivo na proteção destas espécies, que têm um papel importante na segurança alimentar da nação. Isso também ajudaria a agricultura familiar, que tem um forte impacto social sobre o emprego de mão-de-obra ociosa. Esses autores observaram que a batata tem 67 certificados de proteção (95,52 % do setor privado); a alface, 31 certificados (96,8 % pelo setor privado); e a cenoura, três proteções (100 % pelo setor privado). Para o tomate e para a beterraba, não há nenhuma cultivar protegida (Marinho et al., 2011). Para *Capsicum* spp,

atualmente, há duas cultivares protegidas 'BRS Sarakura' e 'BRS Garça', ambas desenvolvidas pela Embrapa (Carvalho et al., 2009; Brasil, 2012).

2.5.3. Teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade

O teste de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) é uma das exigências legais para concessão do título de propriedade intelectual às novas cultivares candidatas à proteção. Para tanto, devem ser conduzidos a partir de metodologias que assegurem a harmonização das avaliações, e, por conseguinte, a confiabilidade dos dados coletados, garantindo a eficácia da proteção concedida (Brasil, 2011).

Em alguns países, os testes DHE são realizados de forma centralizada, por uma instituição oficial, proporcionando um maior controle sobre as variáveis envolvidas nos exames. No Brasil, o sistema de proteção de cultivares 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 (Brasil, 2011). Os testes de DHE só podem ser realizados para as espécies que possuem descritores morfológicos publicados no Diário Oficial (Aviani et al., 2008; Carvalho et al., 2009). Quando a espécie (ou gênero) não possuir os descritores publicados, os responsáveis pela execução dos testes de DHE devem entrar em contato com o MAPA/SNPC para que as diretrizes possam ser elaboradas e publicadas (Brasil, 2011).

Para a organização de testes de DHE, é necessário estudar criteriosamente as diretrizes oficiais para a cultivar candidata e observar fatores como: número de ciclos de crescimento; delineamento experimental do ensaio; número total de plantas e número de plantas a serem avaliadas; número de repetições e parcelas; métodos e épocas adequadas para observação das características (Brasil, 2011).

O Ato n.º2, de 22 de março de 2006, define as instruções para a execução dos ensaios de DHE de cultivares de pimenta e pimentão (*Capsicum* spp.). Essas instruções visam a estabelecer diretrizes para a avaliação dos testes de DHE, uniformizando o procedimento técnico de comprovação de que a cultivar apresentada é distinta de outra(s), cujos descritores sejam conhecidos, e que seja

homogênea quanto às suas características ao longo dos ciclos reprodutivos e estável quanto à repetição das mesmas características ao longo das gerações (Brasil, 2006).

Esses testes baseiam-se, principalmente, em características morfológicas de sementes, plântulas e plantas adultas e, em alguns casos, na resistência a determinadas doenças (Schuster et al., 2006). 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 testes de DHE não englobam características agrônômicas (quantitativas), sendo essas variáveis importantes nos ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) requerido no pedido de registro da cultivar.

A caracterização morfoagronômica dos testes de DHE baseia-se na tomada de dados botânicos de alta herdabilidade, facilmente detectáveis ou mensuráveis. Esses aspectos morfológicos e fenológicos devem ser observados de forma sistemática nas cultivares a serem testadas, utilizando-se lista de descritores. Entretanto, a identificação de um acesso, com base, apenas, em características fenotípicas, não oferece total segurança devido à insuficiência ou escassez de polimorfismo, plasticidade ambiental, dependência do estágio de desenvolvimento da planta e do tipo de herança dos caracteres (Costa et al., 2009).

Deve-se considerar, também, que os programas de melhoramento têm objetivos semelhantes. Para as cultivares de pimenta e pimentão, o foco desses programas são a produtividade, resistência a doenças e teor de capsaicina nos frutos. Entretanto, algumas destas características são quantitativas, e a caracterização baseada somente no fenótipo pode não ser efetiva (Minamiyama et al., 2006).

Assim, apesar da grande importância das características morfológicas para observação da diversidade entre os genótipos, esses descritores possuem limitações, podendo não ser suficientes para diferenciar cultivares relacionadas ou que possuem a mesma genealogia, como no caso de linhas recombinadas (Becher et al., 2000; Priolli et al., 2002). Uma maneira alternativa de avaliar a

diversidade genética entre linhagens é por meio das informações obtidas em estudos moleculares.

2.5.4. Uso de marcadores moleculares nos testes de DHE

Os marcadores moleculares podem auxiliar na proteção de cultivares, pois podem acelerar os testes de DHE, diminuindo o tempo entre a obtenção e a comercialização das cultivares e facilitam a identificação de propagação fraudulenta de sementes e plântulas. Os marcadores moleculares têm, ainda, potencial para diferenciar duas cultivares que possuem a mesma genealogia, mas são adaptados a regiões de cultivo diferentes (Becher et al., 2000). Portanto, a identificação e a diferenciação das cultivares devem, também, serem realizadas por meio dos marcadores moleculares (Kwon et al., 2005).

O comitê de variedades da Associação Internacional para Testes em Sementes (ISTA), responsável pela padronização dos testes e técnicas para a caracterização de cultivares, e cujas normas são adotadas pela UPOV, já considera o uso dos marcadores SSR (*Single Sequence Repeat*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) para a caracterização de cultivares (ISTA, 2009).

No Brasil, as técnicas moleculares vêm sendo utilizadas no âmbito da proteção de cultivares somente como ferramenta auxiliar na análise de processos, como, por exemplo, na comprovação da origem genética da cultivar, na identificação de cultivares em caso de uso indevido e em atividades de fiscalização. Caso as diferenças em nível de DNA não sejam relacionadas a uma expressão fenotípica, a técnica molecular é empregada, complementarmente, às análises convencionais, como perfis genéticos da cultivar (*fingerprinting*). Assim, a candidata à proteção será considerada distinta quando os descritores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, usualmente empregados, forem suficientes para diferenciá-las das demais cultivares conhecidas (Brasil, 2011).

Alguns trabalhos, nos quais os marcadores moleculares foram utilizados para complementarem os testes de DHE, já foram publicados. Entre eles, Bernet et al. (2003) utilizaram os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em novas cultivares de abóboras, para fins de proteção. Já Riek et al. (2001) estudaram o uso de AFLP como método alternativo para o teste de DHE

em beterraba açucareira. No caso do eucalipto, devido à clonagem para propagação comercial, há a indicação de 25 microssatélites internacionalmente referendados para informar o perfil genético das cultivares (Brasil, 2011).

Dentro dos diferentes tipos de marcadores, os microssatélites possuem propriedades que os tornam extremamente úteis na caracterização de cultivares. Variações nas regiões dos microssatélites resultam em grande número de alelos detectados por loco, garantindo a completa diferenciação dos genótipos de interesse (Schuster et al., 2006). Um estudo realizado por Goulão e Oliveira (2001) em cultivares de maçã mostrou que esses marcadores foram mais eficientes na diferenciação de cultivares do que os marcadores RAPD e AFLP. Microssatélites são pequenas regiões de DNA, contendo de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* em todo o genoma eucariótico. Duas diferentes estratégias podem ser usadas com os microssatélites: SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) (Goulão e Oliveira, 2001).

A vantagem do ISSR, frente ao SSR, é que ele não necessita de conhecimentos prévios do genoma a ser estudado para o desenho de seus iniciadores. No ISSR, as sequências de DNA são amplificadas entre dois microssatélites idênticos, porém orientados em direções opostas. Os iniciadores podem ser ancorados nas extremidades 5' ou 3', com um a quatro nucleotídeos degenerados, ou, ainda, não ser ancorados (Bornet e Branchard, 2001). Quando comparado a outros marcadores com base em PCR não-específico, como RAPD, o ISSR produz fragmentos com grande reprodutibilidade e requer pouca infraestrutura em termos de equipamentos de laboratório para execução dos experimentos. A desvantagem desse método é o fato dele ser dominante, não sendo tão informativo quanto o SSR (Bornet e Branchard, 2001; Goulão e Oliveira, 2001; Reddy et al., 2002; Ruanet et al., 2005; Caixeta et al., 2006).

Com intuito de diferenciar cultivares de *Dendrobium officinale*, Shen et al. (2006) citam que 10 iniciadores ISSR produziram 115 bandas polimórficas, diferenciando oito populações dessa espécie. Kumar et al. (2001) distinguiram, com quatro iniciadores ISSR, quatro cultivares de pimenta, sobre as quais havia suspeita de produção e propagação fraudulenta. Segundo Reddy et al. (2002), com o aumento da necessidade de proteção de cultivares, os marcadores ISSR

terão um papel importante, por sua eficiência na distinção de genótipos, mesmo sendo estes estreitamente relacionados.

2.6. Divergência genética

A divergência genética, simplificada, pode ser definida como a distância genética entre as populações, indivíduos ou organismos, avaliada por meio de caracteres morfoagronômicos, fisiológicos, polimorfismos de DNA, dentre outros, conforme o interesse do pesquisador (Amaral Júnior e Thiébaud, 1999).

Ao longo dos anos, houve um aprimoramento das técnicas multivariadas para quantificação da divergência genética, permitindo considerar, simultaneamente, inúmeras características (Sudré et al., 2007; 2010). A divergência genética tem sido determinada a partir das informações múltiplas de cada genótipo, que são expressas em medidas de dissimilaridade, obtidas por meio das variáveis quantitativas, multicategóricas e binárias (Cruz e Carneiro, 2003). No Brasil, dentre os diferentes descritores, os quantitativos estão entre os mais estudados em hortaliças (Rocha et al., 2009).

Quando são utilizados descritores quantitativos, o cálculo das medidas de dissimilaridade pode ser obtido pelo método da Distância Euclidiana, Distância Euclidiana Média, Distância de Mahalanobis ou Distância de Manhattan. A distância generalizada de Mahalanobis (D^2) é a medida de dissimilaridade preferida pelos pesquisadores, por serem estimados a partir de ensaios experimentais com repetições, permitindo a obtenção da matriz de variâncias e covariâncias residuais (Sudré et al., 2005; Rocha et al., 2009; Gonçalves et al., 2009; Neitzke et al., 2010). A Distância de Manhattan, também denominada por quarteirão ou *city block*, ainda é pouco utilizada para o cálculo da distância genética. Considerando esse aspecto, Cargnelutti Filho e Guadagnin (2011), realizaram um estudo comparado à Distância de Manhattan com a Distância Euclidiana e concluíram que, independentemente das medidas de dissimilaridade (euclidiana e Manhattan), o decréscimo da consistência do agrupamento foi mais afetado pelo acréscimo do número de genótipos e de variáveis.

Quando os descritores são qualitativos, a análise da divergência é feita por meio da moda de cada genótipo para cada descritor, sendo calculado um índice de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2003). Já para dados binários, obtidos via

marcadores moleculares, as medidas de similaridade podem ser obtidas por meio de diferentes índices. Na prática, os índices de uso mais rotineiro são o coeficiente de coincidência simples, o de Jaccard e o de Nei e Li. O coeficiente de coincidência simples é muito utilizado por ser idêntico ao quadrado da Distância Euclidiana Média (muito utilizados para descritores quantitativos), e os índices de Jaccard e de Nei e Li são interessantes por excluírem a coincidência de ausência de bandas para um par de genótipos (tipo 0 – 0) (Cruz e Carneiro, 2003).

A geração de um grande número de dados de diferentes categorias (qualitativos e quantitativos) pode ser um fato que dificulta a análise e a interpretação dos resultados de caracterização e avaliação de germoplasma, muitas vezes resultando na incompleta distinção entre os acessos (Rocha et al., 2010). A análise conjunta dessas variáveis, no entanto, torna-se uma alternativa interessante, para uma melhor quantificação da variabilidade genética dos genótipos (Gonçalves et al., 2009).

2.6.1. Algoritmo de Gower

Uma técnica que permite a análise simultânea de variáveis contínuas e categóricas foi proposta por Gower (1971). Apesar dessa análise simultânea ter sido proposta há mais de 40 anos, somente nos últimos anos essa análise tem sido utilizada com maior frequência para quantificar a dissimilaridade genética (Vieira et al., 2007; Gonçalves et al., 2008; 2009; Cabral et al., 2010; Moura et al., 2010; Rocha et al., 2010; Sudré et al., 2010). Isso pode ter ocorrido pela falta de conhecimento das técnicas estatísticas que permitem essa abordagem e pela falta de programas computacionais livres que possam analisar tal procedimento (Rocha et al., 2010).

O Algoritmo de Gower foi utilizado para análise conjunta de dados qualitativos e moleculares em tomateiro (Gonçalves et al., 2008; 2009); quantitativos e moleculares em trigo (Vieira et al., 2007); quantitativos e qualitativos, também em tomateiro (Rocha et al., 2010) e em pimenteiros (Moura et al., 2010; Sudré et al., 2010); e quantitativos, qualitativos e moleculares em feijoeiro (Cabral et al., 2010).

A técnica proposta por Gower (1971) permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1, sendo necessária a padronização

das variáveis (Rocha et al., 2010). De posse da matriz de distância, realiza-se uma análise de agrupamento única para as diferentes variáveis. Este agrupamento tem por princípio juntar os acessos em grupos, de forma que haja uniformidade dentro e heterogeneidade entre grupos (Gonçalves et al., 2009).

2.6.2. Métodos de agrupamento

As estimativas de dissimilaridade atendem aos objetivos do melhorista por quantificarem e informarem o grau de semelhança ou de diferença apresentado entre dois quaisquer genótipos. Entretanto, quando o número de genótipos é relativamente alto, torna-se praticamente inviável o reconhecimento dos grupos que apresentam semelhanças a partir da matriz de dissimilaridade. Contudo, com o uso de técnicas de agrupamento, pode-se classificar os genótipos em vários grupos de forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos, seguindo o critério de similaridade ou de dissimilaridade (Cruz e Carneiro, 2003; Cargnelutti Filho e Guadagnin, 2011).

O processo de agrupamento é baseado em medidas de dissimilaridade (Distâncias Euclidianas, Mahalanobis, Manhattan, Coincidência Simples, Complemento do Coeficiente de Jaccard, dentre outras). Entre os vários métodos de agrupamento, os mais usuais no melhoramento de plantas, são os hierárquicos e os de otimização (Cruz et al., 2004).

Os métodos de agrupamento hierárquicos e de otimização se distinguem pelo tipo de resultado a ser fornecido e pelas formas de se definir a proximidade entre um indivíduo e um grupo já formado, ou entre dois grupos quaisquer. O método hierárquico tem como objetivo agrupar os genótipos por um processo que se repete em vários níveis até que se estabeleça um dendrograma. Dentre os métodos hierárquicos, o método da ligação média entre grupo (*unweighted pair-group average* - UPGMA) é o mais utilizado em diversidade, tendo vantagem sobre os demais métodos por considerar médias aritméticas das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os genótipos (Cruz e Carneiro, 2003). Segundo Cargnelutti Filho e Guadagnin (2011) e Cargnelutti Filho et al. (2010), que compararam diferentes técnicas de agrupamento em trigo e em feijoeiro, respectivamente, os agrupamentos mais consistentes, revelados por maior coeficiente de correlação

cofenética, foram aqueles formados pelo método da ligação média entre grupo – UPGMA.

Um importante fator a ser considerado na definição de qual método de agrupamento hierárquico utilizar é sua consistência e adequação aos dados. Alguns métodos estatísticos de análises, como, por exemplo, a análise de correlação cofenética associada à análise de agrupamento, podem ser empregados para aumentar a confiabilidade das conclusões frente à interpretação dos dendrogramas (Sokal e Rohlf, 1962). A correlação cofenética é uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade, ou de dissimilaridade, com o dendrograma gerado através desta, ou seja, compara as reais distâncias obtidas entre os acessos com as distâncias representadas graficamente, sujeitas ao acúmulo de erro (Kopp et al., 2007; Cargnelutti Filho e Guadagnin, 2011).

Nos métodos de agrupamento de otimização, os genótipos são incluídos no mesmo grupo com o objetivo de estabelecer máxima, ou mínima, participação que aperfeiçoe alguma medida predefinida (Cruz et al., 2004). Entre os métodos de agrupamento de otimização, o mais utilizado no melhoramento genético é o método de Tocher. Esse método consiste na identificação do par dos indivíduos mais similares, a partir da matriz de dissimilaridade, que formarão o grupo inicial. Posteriormente, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que a distância média entre quaisquer grupos (Cruz e Carneiro, 2003). Esse método tem como vantagem principal a fácil interpretação dos grupos formados. Sudré et al. (2007), ao revisar os trabalhos publicados sobre a pesquisa com recursos genéticos de hortaliças, observaram que esse foi o método mais utilizado.

Alguns trabalhos de divergência genética para *Capsicum* spp. estão disponíveis na literatura, empregando diferentes tipos de descritores, bem como associando-os. Utilizando descritores quantitativos, Sudré et al. (2005) caracterizaram 56 acessos do Banco de Germoplasma de *Capsicum* da UENF e observaram que houve concordância entre as diferentes técnicas multivariadas de análises da divergência genética. Bento et al. (2007) quantificaram a divergência fenotípica entre 29 acessos de *Capsicum* spp., com base em caracterização

morfológica e agrônômica usando 37 descritores e a análise de variáveis multicategóricas foi eficiente na quantificação da divergência fenotípica.

Neitzke et al. (2010) caracterizaram 17 acessos de *Capsicum* com potencial ornamental por meio de oito descritores quantitativos e 22 qualitativos multicategóricos e observaram que a análise qualitativa distinguiu melhor os acessos. Estes autores concluíram, ainda, que a utilização de ambos os descritores, analisados separadamente, possibilita uma análise mais fidedigna da dissimilaridade genética. Em contraponto, Costa et al. (2009) concluíram que a caracterização morfoagronômica e os marcadores moleculares foram complementares na avaliação da diversidade genética da coleção de *Capsicum* por eles estudada. Nesse estudo, a associação dos dados foi fundamental para uma completa distinção dos acessos e, também, demonstraram a importância do uso de diferentes técnicas de caracterização para o conhecimento e uso dos acessos.

Moura et al. (2010) observaram que, nos grupos de *Capsicum* spp. formados pelo agrupamento UPGMA, houve uma maior eficiência na separação dos genótipos quando foram utilizadas as variáveis qualitativas em comparação com as quantitativas, indicando uma maior contribuição das variáveis qualitativas na explicação dos agrupamentos formados com base nos caracteres estudados. Entretanto, esses autores afirmam que o fato das variáveis qualitativas terem sido mais discriminantes, não invalida a necessidade de utilizar descritores quantitativos nos estudos de divergência genética, pois estes são caracteres de grande relevância para programas de melhoramento.

Métodos alternativos para o estudo da divergência genética são aqueles baseados na dispersão gráfica dos genótipos, assim, a dispersão dos acessos em sistemas de eixos cartesianos nos quais a variabilidade disponível é aproveitada (Cruz et al., 2004). A utilização conjugada de métodos dispersão gráfica e de agrupamentos tem sido a alternativa mais adequada em estudos de diversidade genética (Cruz e Carnerio, 2003).

Existem várias técnicas que possibilitam a análise por meio de dispersão gráfica. As técnicas de componentes principais e variáveis canônicas são utilizadas quando se dispõe de dados originais. Essas técnicas guardam correspondência com o agrupamento baseado nas dissimilaridades expressas

pela distância euclidiana e de Mahalanobis, respectivamente (Cruz e Carneiro, 2003).

A técnica dos componentes principais tem sido de grande utilidade no melhoramento genético, por permitir simplificar um conjunto de dados, resumindo informações, originalmente de várias variáveis, em poucos componentes, que apresentam as propriedades de reterem o máximo da variação originalmente disponível (Cruz e Carneiro, 2003).

Já a técnica das variáveis canônicas, apesar de similar à metodologia dos componentes principais, esta se baseia nas informações entre e dentro dos acessos (ou de indivíduos de cada acesso), havendo, portanto, necessidade de dados com repetições. Assim, considera-se que a análise de variáveis canônicas constitui-se um procedimento alternativo à análise de componentes principais, nas situações em que se têm dados experimentais com repetição, de modo que seja possível obter médias e a matriz de dispersão (matriz de variâncias e covariâncias) residual entre os dados.

Segundo Cruz et al (2004), para um estudo da diversidade por meio dos componentes principais e das variáveis canônicas ser satisfatório, as primeiras variáveis devem reter grande parte da variação total, em geral, acima de 80 %. Sudré et al (2005) estudaram a divergência genética de 56 acessos de *Capsicum* por meio das variáveis canônicas, onde encontraram as estimativas dos autovalores associados às variáveis canônicas de 11 variáveis, e as duas primeiras características avaliadas explicaram 83,72 % da variação total. Assim, foi possível analisar a dispersão gráfica bidimensional dos dois primeiros escores. Para Bento et al (2007), a análise dos três primeiros componentes principais, em 29 acessos de *Capsicum*, explicaram cerca de 80% da variância total, adequando-se a uma representação gráfica tridimensional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos

Foram avaliadas as linhas recombinadas (LR) 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11 e 13. Essas linhas foram selecionadas por serem resistentes à mancha-bacteriana ou por terem melhores resultados em condição de campo ou em cultivo protegido e orgânico, em estudos preliminares realizados por Moreira (2008) e Moreira et al. (2009, 2010a). As linhas recombinadas correspondem à geração F₇ do cruzamento entre os acessos UENF 1421 e UENF 1381. O acesso UENF 1421 é suscetível à mancha-bacteriana, apresentando características de produção e qualidade do fruto que atendem ao mercado de pimentão. O acesso UENF 1381 é uma pimenta que vem sendo utilizada como fonte de resistência à mancha-bacteriana no programa de melhoramento desenvolvido pela UENF. As linhas foram obtidas pelo método do SSD (*Single Seed Descent*) e selecionadas para a resistência à mancha-bacteriana e outros atributos agronômicos por Riva-Souza et al. (2009).

Segundo a LPC, para a cultivar ser protegida, esta deve se distinguir claramente de qualquer outra cuja existência seja reconhecida na data do pedido de proteção (Brasil, 1997). No momento da instalação do experimento, não havia cultivares de *Capsicum annuum* L. protegidas. As cultivares 'BRS Garça' e 'BRS Sarakura' só obtiveram seus certificados de proteção publicados após a instalação do experimento (Brasil, 2012). Dentre as cultivares registradas, as que

apresentavam características próximas às das linhas recombinadas em teste, principalmente ligadas aos frutos, não eram da espécie *C. annuum*, o que impede a análise comparativa. As cultivares de *C.annuum* registradas eram pimentões, com padrões de frutos e arquitetura de planta também muito diferentes das linhas. Nos testes de DHE das cultivares 'BRS Garça' e 'BRS Sarakura', estas foram comparadas entre si, com uma mistura varietal de pimenta jalapeño (CNPH 1287-S; material original das cultivares) e com cultivar comercial de Jalapeño (Brasil, 2012).

As linhas recombinadas foram comparadas com as cultivares protegidas cultivares BRS Garça e BRS Sarakura por meio das características descritas no certificado de proteção. Além das linhas recombinadas, também foram avaliadas o genitor UENF 1381 e uma cultivar comercial de pimentão denominada Casca Dura Ikeda, desenvolvida pela Isla Semente LTDA (Isla, 2012), respectivamente padrão de resistência e suscetibilidade à mancha-bacteriana.

3.2. Condições experimentais

O experimento de campo foi conduzido na área de convênio da Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO – RIO) com a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, localizada em Campos dos Goytacazes, RJ, latitude 21°19'23"S e longitude de 41°19'40"W, a 13 m de altitude, no período de abril a dezembro de 2010.

As mudas foram produzidas em bandeja de isopor com 128 células em substrato comercial e mantidas em casa de vegetação. Foram semeadas três sementes por célula e, após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma plântula por célula. Trinta dias após a semeadura, quando as mudas estavam com quatro a cinco folhas definitivas, foi feito o transplântio para a área experimental, que foi previamente preparada e adubada. A adubação química foi realizada de acordo com a análise de solo e com o Manual de Adubação para o Estado do Rio de Janeiro (De Polli et al., 1988). Para a correção de deficiências nutricionais, foram realizadas duas aplicações de cloreto de cálcio (6 %) e uma aplicação de sulfato de magnésio (20 %) via pulverização foliar (Pinto et al., 2006). Os demais tratamentos culturais como capinas, tutoramento e controle de pragas

foram realizados segundo a recomendação para a cultura (Filgueira, 2008; Pinto et al., 2006). Para irrigação, utilizou-se o sistema de aspersão.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com três repetições, sendo cada parcela constituída por 18 plantas, totalizando 540 plantas. O espaçamento foi de 1,0 x 0,5 m, sendo 1,0 m entre fileiras e 0,5 m entre plantas, totalizando 9,0 m² por parcela. O Ato N^o 2, de 2006, determina que, em avaliações em campo, cada teste inclua um total mínimo de 35 plantas, divididas em duas ou mais repetições (Brasil, 2006). Assim, exceto para a reação à mancha-bacteriana, a observação de cada variável foi realizada em 12 plantas de cada parcela por bloco, totalizando 36 plantas. Foram realizadas sete colheitas entre agosto e dezembro de 2010.

3.3. Características avaliadas

3.3.1. Descritores quantitativos

As seguintes características foram avaliadas: número total de frutos (NTF); peso total de frutos (PTF), em gramas; peso médio dos frutos (PMF), em g/fruto, obtido pela divisão do PTF pelo NTF; comprimento dos frutos (CF), em mm; diâmetro dos frutos (DF), em mm, ambos medidos em uma amostra aleatória de cinco frutos de cada planta avaliada, totalizando 180 frutos por genótipo; e, relação comprimento/diâmetro do fruto (CF/DF) obtido pela divisão do CF pelo DF. As análises foram feitas com base na média das parcelas.

Foi realizada uma análise de variância individual, segundo a descrição feita por Cruz et al. (2004), considerando um delineamento de blocos ao acaso envolvendo g genótipos e b blocos, em que as observações feitas nas parcelas são dadas pelo modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} : observação obtida na parcela com i -ésimo genótipo no j -ésimo bloco;

μ : constante geral;

G_i : efeito fixo do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, g$);

B_j : efeito do j -ésimo bloco ($j = 1, 2, \dots, b$), considerado aleatório com NID $(0, \hat{\sigma}^2)$;

ε_{ij} : erro aleatório com NID (0, $\hat{\sigma}^2$).

As médias foram agrupadas pelo algoritmo proposto por Scott-Knott (1974).

3.3.2. Descritores multicategóricos

Foram avaliados 46 descritores multicategóricos que estão entre os sugeridos pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, para a execução dos ensaios de Distinguilidade, Homogeneidade e Estabilidade de cultivares de pimenta e pimentão, contidos no Ato n.º 2 de 22 de março de 2006 (Brasil, 2006) (Quadro 1). Além desses descritores, foi incluída a resistência à Mancha-Bacteriana, avaliada pela escala de nota (descriptor 47).

Para avaliação desses descritores, foi utilizada a comparação lado a lado, na qual a distinguibilidade é baseada na observação direta das cultivares nos testes de campo. Nessa situação, não há mensuração. As características são observadas visualmente, concedendo, apenas, 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 autógamias, nas quais, existe relativamente pouca variação entre as plantas da cultivar (Brasil, 2011).

Quando a avaliação foi realizada nos frutos, estes estavam maduros, advindos do segundo ou terceiro nó, com flor. Quando foi observada em folhas, elas estavam completamente desenvolvidas e se encontravam nos brotos secundários laterais, depois da primeira ramificação, no momento em que estes estavam florescendo.

Quadro 1. Descritores multicategóricos avaliados em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum*. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	ausente	1
	presente	2
2. Planta: posição das hastes	ereta	1
	semiereta	3
	horizontal	5
	prostrada	7
3. Planta: comprimento da haste	curto	3
	médio	5
	longo	7
4. Planta: entrenós curtos (na parte mais alta)	ausente	1
	presente	2
<u>5. Apenas cultivares com entrenós curtos:</u> Planta: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (teste a ser feito em plantas sem desbrota)	nenhum	1
	um a três	2
	mais de três	3
6. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó	curto	3
	médio	5
	longo	7
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	ausente ou muito fraca	1
	fraca	3
	média	5
	forte	7
	muito forte	9

Quadro 1, Cont.

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
8. Folha: comprimento da lâmina	curto	3
	médio	5
	longo	7
9. Folha: largura	estreita	3
	média	5
	larga	7
10. Folha: coloração verde	clara	3
	média	5
	escura	7
11. Folha: variegação	ausente	1
	presente	2
12. Folha: pigmentação antociânica	ausente	1
	fraca	3
	média	5
	forte	7
13. Folha: pilosidade	ausente	1
	esparsa	3
	média	5
	densa	7
14. Folha: rugosidade	ausente	1
	fraca	3
	média	5
	forte	7
15. Flor: número de flores por axila	uma	1
	duas	2
	três ou mais	3
16. Flor: posição do pedúnculo	ereta	1
	intermediária	3
	pendente	5

Quadro 1, Cont.

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
17. Flor: coloração da corola	branca	1
	branca c/ base violeta	2
	branca com margem violeta	3
	branca esverdeada	4
	branca esverdeada com margem violeta	5
	amarela clara	6
	amarela	7
	amarela esverdeada	8
	violeta c/ base branca	9
	violeta	10
18. Flor: mancha na corola	ausente	1
	presente	2
19. Flor: coloração da mancha na corola	branca	1
	amarela	2
	verde amarelada	3
	verde	4
	violeta	5
20. Flor: coloração da antera	branca	1
	amarela	2
	amarela com mancha azul	3
	azul pálido	4
	azul	5
	violeta	6
21. Flor: coloração do filamento	branca	1
	amarela	2
	amarela com mancha azul	3
	azul pálido	4
	azul	5
	violeta	6

Quadro 1, Cont

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
22. Flor: posição do estigma	inserto	3
	mesmo nível	5
	excerto	7
23. Fruto: coloração antes da maturação	branco-esverdeada	1
	amarelada	2
	verde	3
	roxa	4
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	clara	3
	média	5
	escura	7
25. Fruto: posição	ereta	3
	intermediária	5
	pendente	7
26. Fruto: comprimento	muito curto	1
	curto	3
	médio	5
	longo	7
	muito longo	9
27. Fruto: diâmetro	muito pequeno	1
	pequeno	3
	médio	5
	grande	7
	muito grande	9

Quadro 1, Cont

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal	achatada	1
	arredondada	2
	cordiforme	3
	quadrangular	4
	retangular	5
	trapezoidal	6
	triangular	7
	estreito-triangular	8
	forma de chifre	9
	ovalada	10
	elíptica	11
29. Fruto: forma predominante da seção transversal	elíptica	1
	angulada	2
	arredondada	3
30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal	ausente ou muito fraca	1
	fraca	3
	média	5
	forte	7
	muito forte	9
31. Fruto: textura da superfície	lisa	1
	levemente enrugada	2
	fortemente enrugada	3
32. Fruto: coloração na maturidade	amarela	1
	alaranjada	2
	vermelha	3
	marrom	4
	roxa	5

Quadro 1, Cont

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade	clara	3
	média	5
	escura	7
34. Fruto: brilho	fraco	3
	médio	5
	forte	7
35. Fruto: profundidade da depressão peduncular	ausente ou muito rasa	1
	rasa	3
	média	5
	profunda	7
	muito profunda	9
36. Fruto: forma do ápice	aguda	3
	arredondada	5
	deprimida	7
37. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares	ausente ou muito rasa	1
	rasa	3
	média	5
	profunda	7
	muito profunda	9
38. Fruto: número predominante de lóculos	dois	1
	dois e três	2
	três e quatro	3
	quatro e mais de quatro	4
39. Fruto: espessura do pericarpo	fina	3
	média	5
	grossa	7
40. Placenta: tamanho	pequeno	3
	médio	5
	grande	7

Quadro 1, Cont

Característica	Avaliação da característica	Nota de cada avaliação
41. Pedúnculo: comprimento	curto	3
	médio	5
	longo	7
42. Pedúnculo: espessura	fino	3
	médio	5
	grosso	7
43. Cálice: margem	inteira	1
	intermediária	2
	dentada	3
44. Cálice: constrição anelar	ausente	1
	presente	2
45. Cálice: aspecto	não envolvente	1
	envolvente	2
46. Fruto: capsaicina na placenta	ausente	1
	presente	2
47. Reação à Mancha-Bacteriana (sintomas na área inoculada)	Ausência de sintoma visível	1
	Clorose	2
	Clorose com pontos necrosados	3
	Mancha necrosada	4
	Totalmente necrosada	5

A presença ou ausência de capsaicina (descritor nº 46), foi avaliada através da imersão de uma porção da placenta, de aproximadamente 1,0 cm, retirada de frutos em uma solução de 3 mL de vanadato de amônio de acordo com as modificações feitas no método de Derera (2000) por Riva (2006). Foi avaliado um fruto por planta.

A recomendação do SNPC para o teste de DHE, apesar das variáveis serem discretas, é dividir os descritores em qualitativos, pseudoqualitativos e quantitativos. As *características qualitativas (QL)* são os descritores que se

enquadrem em dois níveis e não devem ser consideradas distintas, caso tenham o mesmo nível de expressão. As *características pseudoqualitativas (PQ)* são os descritores em que a amplitude da variação é, ao menos, parcialmente contínua e se dividem em um maior número de níveis de expressão. Por fim, as *características quantitativas (QN)* são aquelas cuja expressão cobre toda a amplitude de variação de um extremo a outro. A expressão pode ser registrada por meio de uma escala linear unidimensional, e a divisão fornece uma distribuição homogênea da escala (Brasil, 2011). No entanto, neste trabalho foi considerada a divisão clássica das variáveis, separadas em variáveis binárias, com dois níveis de expressão, e variáveis multicategóricas, com vários níveis de expressão.

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 (Brasil, 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. Assim, para os genótipos em estudo, que foram analisadas em cultivo convencional, serem considerados homogêneos, o número máximo de plantas com características fora do tipo foi de duas plantas. (Brasil, 2006). Para ser considerada atípica, a planta foi claramente distinta das outras que compõem a linhagem.

3.3.2.1. Reação à mancha-bacteriana

Para a reação à mancha-bacteriana (RMB), foi instalado um experimento, sob condições controladas, em casa de vegetação na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP) da UENF, em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições e uma planta por parcela. O experimento foi conduzido entre julho e setembro de 2011.

As mudas foram produzidas em bandeja de isopor com 128 células em substrato comercial e mantidas em casa de vegetação. Foram semeadas três sementes por célula e, após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma plântula por célula. As mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 500 mL aos 30 dias após a semeadura.

A inoculação foi realizada 15 dias após o transplante, por meio da infiltração de suspensão bacteriana (inóculo) na superfície abaxial da folha previamente identificada (Costa et al., 2002; Quezado-Duval e Camargo, 2004; Riva et al., 2004a). Foi inoculado 1 cm² de área foliar (Riva, 2006). Para o preparo do inóculo, foi utilizado o isolado ENA 4135, caracterizado como raça T1P3 em testes realizados anteriormente por Riva et al. (2004b) com base em genótipos diferenciadores propostos por Jones et al. (1998) e resistentes ao cobre (Aguar et al., 2000). O isolado preservado em água foi recuperado, transferindo a suspensão bacteriana para placas de Petri, contendo meio DYGS, com auxílio de alça de platina (Rodrigues Neto et al., 1986). Após a permanência em estufa por 48 h 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 a absorbância de 0,300 ($A_{600} = 0,3$) (Quezado-Duval e Camargo, 2004). Em seguida, foi realizada uma diluição em série até a concentração de 10⁵ ufc/mL, segundo Riva (2006).

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 foi conferida quando não havia nenhum sintoma visível; a nota 2, quando o local de inoculação apresentava cor amarelada; a nota 3, foi aplicada quando as folhas estavam amareladas e com alguns pontos de necrose; para a nota 4, quando apresentaram manchas necrosadas e a nota 5, quando a área inoculada estava totalmente necrosada (Figura 1). Ao final das avaliações, as plantas que receberam média das notas iguais ou inferiores a 2 foram consideradas como resistentes e as que receberam notas superiores a esta, suscetíveis (Riva, 2006).

Posteriormente, os valores das notas foram utilizados para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), por meio do programa AVACPD (Torres e Ventura, 1991). Os dados foram submetidos à análise de variância univariada, considerando o delineamento inteiramente casualizado, em que as observações feitas nas parcelas são dadas pelo modelo estatístico:

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

Onde:

Y_{ij} : observação obtida pelo i -ésimo genótipo na j -ésima parcela;

μ : constante geral;

G_i : efeito fixo do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, g$);

ε_{ij} : erro aleatório com NID $(0, \hat{\sigma}^2)$.

As médias foram agrupadas pelo algoritmo proposto por Scott-Knott (1974).

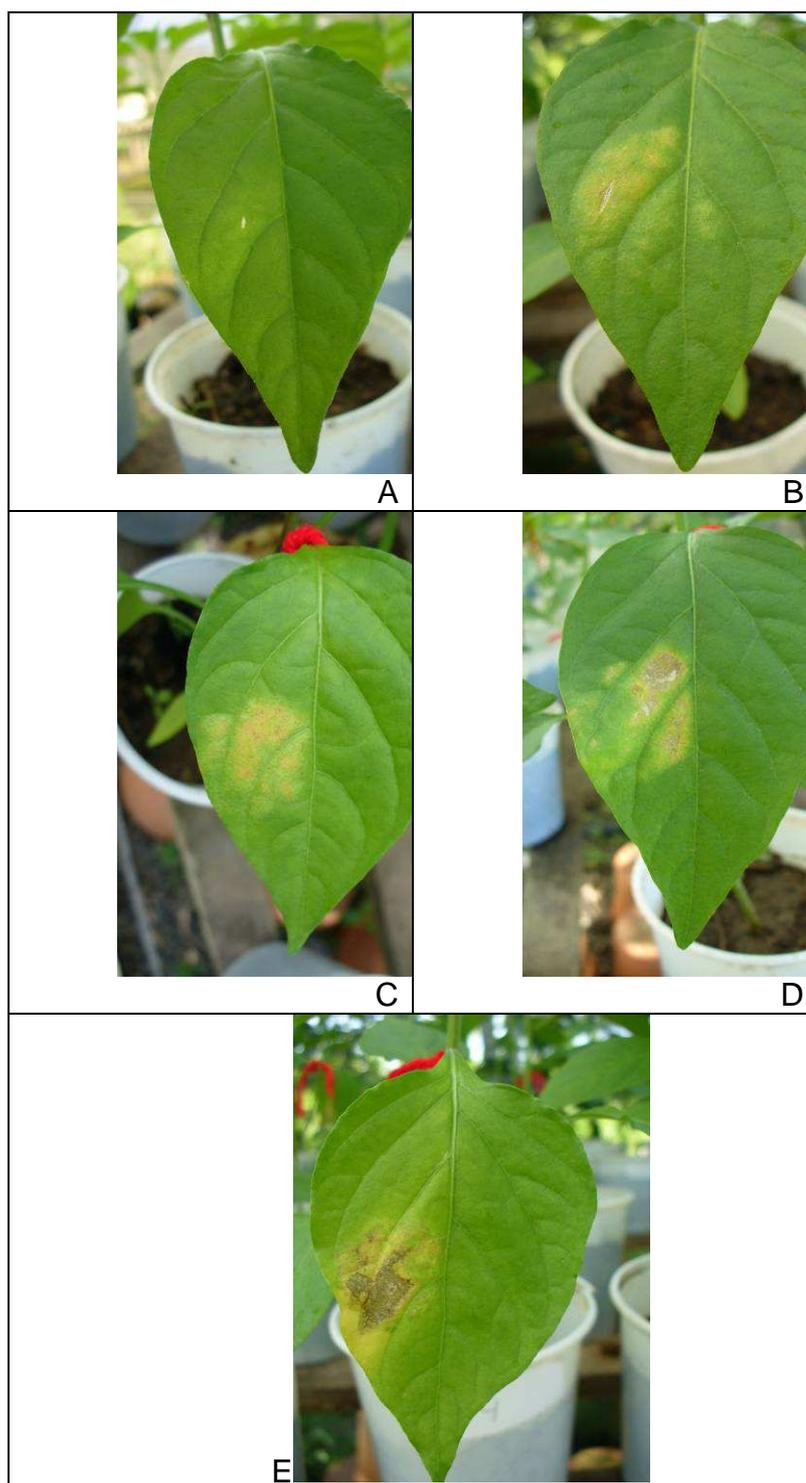


Figura 1. Escala de nota utilizada na avaliação da reação à Mancha-Bacteriana . A = nota 1 (sem sintoma visível); B = nota 2 (área inoculada amarelada); C = nota 3 (área inoculada amarelada e com pontos de necrose); D = nota 4 (área inoculada com manchas necrosadas); E = nota 5 (área inoculada totalmente necrosada). Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

3.3.3. Análise molecular

As análises moleculares, utilizando marcadores ISSR, foram conduzidas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), setor de Genética Aplicada, no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Para a análise molecular, a extração do DNA foi feita em tecido foliar jovem, retirado das plantas obtidas para a avaliação da resistência à mancha bacteriana, previamente à inoculação. Foram retiradas amostras foliares de dez plantas em *bulk*.

Cerca de 50 mg de tecido macerado foi transferido para tubos de 1,5 mL e imersos em N₂ líquido para a extração de DNA, que foi realizado de acordo com o protocolo PLANT GENOMIC DNA MINI KIT (Kit YGP100), com algumas modificações.

Foram adicionados, aos tubos que continham as amostras, 400 µL de tampão de extração 1 (GP1 “Buffer”) e 5 µL RNase (10 mg/mL) e agitados com o uso do vórtex. Esse material foi incubado a 65 °C por dez minutos. Durante a incubação, o tubo foi invertido a cada cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de tampão 2 (GP2 “Buffer”), e os tubos foram agitados por vórtex para a obtenção de uma mistura homogênea. Logo após, os microtubos foram incubados em freezer, por três minutos. Essa mistura (cerca de 500 µL) foi transferida para um novo tubo, com uma coluna de filtro posicionada em um tubo coletor de 2 mL. Esse material foi centrifugado, por três minutos, a 13.000 g. A coluna de filtro foi descartada e, cuidadosamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foram adicionados 750 µL de tampão 3 (GP3 “Buffer” com isopropanol) ao filtrado (produto da lise celular) e agitado imediatamente utilizando o vórtex por cinco segundos. Logo em seguida, toda a solução foi transferida para uma coluna matriz posicionada em um tubo coletor. Foi feita uma nova centrifugação, a 13.000 g, por dois minutos. O material filtrado que continuou no tubo coletor foi descartado.

Foram adicionados 400 µL de tampão de lavagem (“Wash Buffer” W1), contendo etanol na coluna, e centrifugados novamente, a 13.000 g, por 30 segundos. Foi feito o descarte do filtrado, repetindo-se a etapa, adicionando-se 600 µL de “Wash Buffer” W1. A coluna matriz foi transferida para um tubo limpo

de 1,5 mL, adicionando-se 100 µL do tampão de eluição pré-aquecido no centro da coluna matriz. O material ficou em descanso por cinco minutos, até o tampão de eluição ser absorvido pela matriz. Foi feita uma última centrifugação a 13000 g, por 30 segundos, para eluir o DNA purificado.

A determinação da concentração de DNA foi feita com auxílio de espectrofotômetro modelo Pico100 (*Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer for use with Disposable UVpette Tips*), quando foi medida a absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros, bem como, analisada a sua pureza de acordo com a razão A260/A280. A determinação da concentração foi feita com amostras de 2 µL, preservando-as. Paralelamente, as amostras foram avaliadas em gel de agarose a 1,0 % e coradas com a mistura de *Blue Juice 6X* com *Gel Red 0,002X*, na proporção de 1:1. A visualização do gel foi feita por meio de luz ultravioleta (*Fotodocumentador MiniBis Pro – Bio-imaging Systems*).

Para melhorar a pureza, o DNA foi novamente centrifugado a 13.000 g, por cinco minutos, sendo o sobrenadante cuidadosamente transferido para novos tubos, e as impurezas sedimentadas foram eliminadas. Após essa etapa o DNA purificado foi diluído em dez vezes. Foi realizada, ainda, mais uma lavagem com RNase, quando foram adicionados 10 µL de RNase (10 mg/µL) e mantidos em banho-maria por 30 minutos, sendo o resultado final a solução de trabalho. Posteriormente, para as reações de polimerase em cadeia (PCR), o DNA foi diluído e padronizado na concentração de 5 ng.µL⁻¹. Quando não estavam em análise, o DNA foi mantido a -20°C.

3.3.3.1. Condições de amplificação

As reações de amplificação foram completadas para um volume final de 13 µL, contendo os seguintes reagentes: 6,1 µL de água ultrapura; 1,5 µL de Tampão 10X; 0,78 µL de MgCl₂ na concentração de 25mM; 1,5 µL de dNTP 2mM; 1,0 µL de oligonucleotídeos iniciadores a 5µM e 0,12 unidade de Taq DNA polimerase. Foram aplicadas 2 µL de DNA na concentração de 0,5 ng.µL⁻¹, e, posteriormente adicionado o mix descrito anteriormente.

As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp (*GeneAmp PCR System 9700 Thermal cycler Applied Biosystems*) e conduzidas com a seguinte

programação: quatro minutos a 94 °C para desnaturação inicial, seguindo-se os 42 ciclos, cada um consistiu de 94 °C por um minuto, 40-55 °C por um minuto (dependendo do iniciador utilizado), 72 °C por três minutos e uma extensão final a 72 °C por sete minutos. Os fragmentos amplificados foram, então, separados em gel de agarose 2,0 %, coradas com a mistura de *Blue Juice* 6X com *Gel Red* 0,002X, na proporção de 1:1, e submetidos à luz UV para visualização dos resultados (Fotodocumentador *Minibis Pro – Bio-imaging System*). As imagens dos géis foram capturadas para posterior análise.

Foram testados, numa amostra de três génotipos, 47 iniciadores, sendo 16 deles obtidos para *Capsicum annuum* por Kumar et al. (2001). Os demais iniciadores pertencem ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), setor de Genética Aplicada e foram, anteriormente, utilizados em diferentes espécies (cana-de-açúcar, mamão e milho). Foram selecionados os 15 iniciadores de maior polimorfismo nos génotipos testados. As condições de amplificação foram otimizadas para cada iniciador testado, detectando-se a temperatura mais adequada para amplificação (Tabela 1).

O levantamento dos dados binários, advindos dos marcadores moleculares, foi obtido analisando visualmente as bandas mais consistentes e evidentes nos dez acessos estudados. As marcas (bandas) foram codificadas com zeros (ausência de banda) e uns (presença de banda), estabelecendo a matriz binária.

Tabela 1. Iniciadores ISSR selecionados para diferenciação de oito linhas recombinadas, o genitor UENF 1381 e uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. e a respectiva temperatura de anelamento. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Iniciador	Sequência	Temperatura (°C)
3	(CAC)3GC	50
5	(AG)8YT	51,5
14	(GA)8C	52
15	(CT)8G	52,5
17	(AC)8T	50
18	(AG)8YC	50
19	(AG)8YA	50
20	(GA)8YT	51,5
21	(CA)8RG	52,5
22	(GT)8YC	52,5
25	(ATG)6	51,5
30	VHV(GT)7	48
51	(ATC)6T	52,5
56	(G(CTA)6	52,5
71	(AG)7C	50

* Número de identificação utilizado no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), setor de Genética Aplicada.

3.4. Divergência genética

3.4.1. Obtenção das matrizes de dissimilaridade

Para os dados quantitativos, a matriz de dissimilaridade foi calculada de três formas: pela Distância Euclidiana e pela Distância de Mahalanobis (D^2), com o objetivo de se estudar a divergência genética por meio dos componentes principais e pelas variáveis canônicas, respectivamente; e pela Distância de Manhattan, a fim de se obter uma matriz de distância com dimensões entre 0 e 1, para, posteriormente, poder correlacionar com os dados moleculares e qualitativos.

A distância Euclidiana, sendo X_{ij} a observação do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, p$), em referência ao j -ésimo caráter ($j = 1, 2, \dots, n$) estudado, definiu-se a distância euclidiana entre dois genótipos por meio da expressão:

$$d_{ii'} = \sqrt{\sum_j (X_{ij} - X_{i'j})^2}$$

A distância de Mahalanobis (D^2), de posse da matriz de variâncias e covariâncias residuais obtida na análise de variância, foi dada por:

$$D_{ii'}^2 = \delta' \psi^{-1} \delta$$

Em que:

ψ : matriz de variâncias e covariâncias residuais;

δ' : [$d_1 \ d_2 \ \dots \ d_v$], sendo $d_j = Y_{ij} - Y_{i'j}$;

Y_{ij} : média do i -ésimo genótipo em relação à j -ésima variável.

A distância de Manhattan ($d_{ii'}$) entre o par de genótipos i e i' , considerando que Y_{ij} é a observação do i -ésimo genótipo para a j -ésima característica, foi dada por:

$$d_{ii'} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^p |Y_{ij} - Y_{i'j}|$$

Para a análise dos dados multicategóricos, foi calculado o índice de similaridade, que expressa a porcentagem de coincidência de similaridade, considerando as várias características analisadas de acordo com o modelo proposto por Cruz e Carneiro (2003).

$$s_{ii'} = \frac{C}{C + D}$$

Em que:

C : concordância de categoria

D : discordância de categoria

Foi empregado o complemento ($1 - s_{ii'}$) na construção da matriz de dissimilaridade entre os acessos.

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 e Carneiro (2003), índice de Jaccard é dado por:

$$s_{ii'} = \frac{a}{a+b+c}$$

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 os dados multicategóricos, foi empregado o complemento ($1 - s_{ii'}$) na construção da matriz de dissimilaridade para dos dados binários entre os acessos.

O poder de resolução de cada iniciador foi calculado utilizando a metodologia de Prevost e Wilkinson (1999), onde o valor de uma determinada banda pode ser medido por sua semelhança com a condição ideal (50 % dos genótipos contendo a banda). Essa informação da banda (I_b) pode ser representada em uma escala de 0 a 1, pela fórmula:

$$I_b = 1 - (2 \times |0,5 - p|)$$

Onde p é a proporção de genótipos de contém a banda.

Consequentemente, o poder de resolução de cada iniciador (R_p), pode ser representado pela soma desses valores ajustados. Assim:

$$R_p = \sum I_b.$$

3.4.2. Algoritmo de Gower

A matriz de dissimilaridade com a análise conjunta dos dados quantitativos, multicategóricos e binários foi obtida pelo algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$$

Em que:

K : é o número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$); sendo p o número total de variáveis;

i e j : par de genótipos, para os quais é calculada a distância genética;

W_{ijk} : é um peso dado à comparação ijk , atribuindo 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou nos dois genótipos)

S_{ij} : é a contribuição da variável k na similaridade entre os indivíduos i e j , possuindo valores entre 0 e 1, sendo que:

i) Para uma variável nominal, se o valor da variável k é o mesmo para ambos os indivíduos (i e j), então $S_{ij} = 1$, caso contrário, é igual a zero;

ii) Para uma variável contínua $S_{ij} = \frac{1 - |x_{ik} - x_{jk}|}{R_k}$, em que x_{ik} e x_{jk} são os valores da variável k para os genótipos i e j , respectivamente, e R_k é a amplitude da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre as escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo $[0, 1]$ e pesos iguais (Rocha et al., 2010).

3.4.3. Agrupamentos

Os agrupamentos foram realizados para cada matriz de dissimilaridade obtida. Para essa análise, foi utilizado o método hierárquico da ligação média entre grupo (*Unweighted Pair-Group Average* - UPGMA). Esse método foi preferido por ter maior coeficiente de correlação cofenético dentre os métodos hierárquicos de agrupamento (Sokal e Rohlf, 1962).

No método UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto desse método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são

agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. O dendrograma prioriza os genótipos com maior similaridade, e as distâncias entre um indivíduo e um grupo formado pelos indivíduos i e j são calculadas por:

$$d_{(ij)k} = \text{média}\{d_{ik} + d_{jk}\} = \left(\frac{d_{ik} + d_{jk}}{2} \right)$$

Onde:

$d_{(ij)k}$: distância média entre o grupo ij e o indivíduo k ;

d_{ik} = distância entre os indivíduos i e k ;

d_{jk} = distância entre os indivíduos j e k .

A validação dos agrupamentos foi determinada pelo Coeficiente de Correlação Cofenético (CCC) (Sokal e Rohlf, 1962). A significância da correlação cofenética foi calculada pelo Teste de Mantel (1967) (1.000 permutações).

Também utilizou-se o método de Tocher, por permitir a fácil interpretação dos grupos formados. Nesse método, o par de indivíduos mais similares é identificado na matriz de dissimilaridade. Esses indivíduos formarão o grupo inicial e, a partir daí, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos, adotando-se o critério de que a distância média intragrupo deve ser menor que a distância média intergrupo. De acordo com Cruz e Carneiro (2003), a entrada de um indivíduo em um grupo sempre aumenta o valor médio da distância dentro do grupo. Assim, pode-se tomar a decisão de incluir o indivíduo em um grupo por meio da comparação entre o acréscimo no valor médio da distância dentro de um grupo e um máximo permitido (θ). A inclusão, ou não, do indivíduo k no grupo é, então, feita considerando:

Se $\frac{d_{(grupo)k}}{n} \leq \theta$, inclui-se o indivíduo k no grupo;

Se $\frac{d_{(grupo)k}}{n} > \theta$, o indivíduo k não é incluído no grupo.

Sendo n o número de indivíduos que constitui o grupo original.

Nesse caso, a distância entre o indivíduo k e o grupo formado pelos indivíduos i e j é dada por:

$$d_{(ij)k} = d_{ik} + d_{jk}$$

Para análise dos componentes principais, considerou-se que X_{ij} é a média padronizada do j -ésimo descritor avaliado no i -ésimo genótipo e R a matriz de covariâncias ou de correlação entres esses caracteres. A técnica dos componentes principais consiste em transformar o conjunto de v variáveis ($x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{iv}$) em um novo conjunto ($y_{i1}, y_{i2}, \dots, y_{iv}$), que são funções lineares dos x_{i1} e independentes entre si (Cruz e Carneiro, 2003). As seguintes propriedades foram verificadas:

- 1) Se y_{i1} é um componente principal, então y_{i1} é uma combinação linear das variáveis $x_{i's}$, como descrito:

$$y_{i1} = a_1x_{i1} + a_2x_{i2} + \dots + a_vx_{iv}$$

- 2) Se y_{i2} é outro componente principal, então y_{i2} é uma combinação linear das variáveis $x_{i's}$, como descrito:

$$y_{i2} = b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + \dots + b_vx_{iv}$$

- 3) Entre todos os componentes, y_{i1} apresenta maior variância, y_{i2} a segunda maior, e, assim, sucessivamente.

A variância de cada componente foi obtida por meio das raízes das características (autovetores) da matriz R , considerando que:

$$\det(R - \lambda I)\alpha$$

Os coeficientes de ponderação dos componentes foram obtidos por meio dos vetores característicos (autovetores) associados a cada raiz característica de R . Cada vetor característico, ou autovetor (α), foi calculado a partir da equação:

$$(R - \lambda I)\alpha = \phi$$

Para a análise das variáveis canônicas, as médias originais das variáveis são transformadas por um processo de condensação pivotal, originando novas variáveis, que se caracterizam por apresentarem covariâncias residuais nulas e variâncias residuais iguais a 1. Uma vez feita a transformação, os parâmetros são estimados da mesma maneira descrita para componentes principais. As estimativas dos autovalores, que medem a variância de cada variável canônica, foram dada por:

$$\det(T^* - \lambda I) = 0$$

As estimativas dos autovetores associada às variáveis transformadas por condensação pivotal foram obtidas por meio de:

$$(T - \lambda I)\alpha = \phi$$

em que:

T = matriz de variâncias e covariâncias fenotípicas;

E = matriz de variâncias e covariâncias residuais

λ = raízes características (autovalores) da matriz $E^{-1}T$.

Se as duas primeiras variáveis canônicas determinarem um mínimo de 80% da variação, representa-se por meio de um gráfico bidimensional. No caso das três primeiras explicarem essa variação, utiliza-se um gráfico tridimensional, possibilitando o exame visual das divergências entre os acessos.

As análises de variância, o algoritmo de Scott-Knott, o cálculo dos componentes principais e variáveis canônicas (inclusive as matrizes utilizadas) e o agrupamento de Tocher foram feitos com o uso do Programa Genes (Cruz, 2006). Para as demais análises de distância genética, agrupamentos hierárquicos e determinação da correlação cofenética, utilizou-se o Programa R (*R Development Core Team, 2006*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a condução do experimento, a precipitação mensal variou de 7,2 mm em agosto e de 127,4 mm em novembro, sendo o aumento da precipitação coincidente com o início da estação chuvosa. Apesar de ter sido utilizada a irrigação complementar, a evapotranspiração variou bastante nesse período, sendo o menor valor registrado em agosto (3,45 mm) e o maior em dezembro (7,58 mm). As temperaturas máximas e mínimas (média mensal) foram de 32,7 °C em dezembro e de 16,6 °C em junho. Essa temperatura é favorável ao desenvolvimento da mancha-bacteriana (Macuzzo et al., 2009a; Macuzzo et al., 2009b). No entanto, não foi observada a presença dessa doença nesse experimento mesmo essa mesma área sendo utilizada para experimento de *Capsicum* spp. por anos consecutivos.

4.1. Variáveis quantitativas

Todas as variáveis analisadas tiveram diferenças significativas, em nível de 5 % de probabilidade pelo Teste F, entre os tratamentos (genótipos) (Tabela 2). As médias obtidas nesse experimento permitiram inferir que, de modo geral, as linhas caracterizaram-se por plantas com frutos leves, com média de 19,32 g, em grande número (180,06 frutos/planta), e de formato retangular, segundo a classificação proposta por Moreira et al. (2006).

Tabela 2. Valores e significâncias dos quadrados médios (QM), médias e coeficientes de variação (CV) das análises de variância das características: número total de frutos (NTF), peso total de frutos (PTF), peso médio dos frutos (PMF), comprimento dos frutos (CF), diâmetro dos frutos (DF), relação comprimento/diâmetro do fruto (CF/DF) avaliadas em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

FV	GL	Quadrados Médios					
		NTF	PTF	PMF	CF	DF	CF/DF
Blocos	2	11548,63	178920,63	48,01	44,98	6,12	0,01
Genótipos	9	37066,1*	3570005,3*	2820,0*	1219,0*	468,9*	1,3*
Resíduo	18	3193,30	315719,11	40,51	44,95	3,60	0,04
Média		180,06	1871,47	19,32	68,68	25,89	2,83
CV (%)		31,38	30,02	32,93	9,76	7,33	7,29

* significativo em nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Os coeficientes de variação (CV) do CF, do DF e da relação CF/DF foram inferiores a 10 %, considerados baixos (Gomes e Garcia, 2002). Silva et al. (2011) classificaram os CV para caracteres de frutos de pimenteira, propondo que, para CF, o valor de 9,76 % seja considerado baixo, concordando com Gomes e Garcia (2002). Esses valores de CV supõem uma pequena influência do ambiente nessas características. Os CV atingiram valores de 33,15 % para NTF e 22,99 % para PTF, refletindo a natureza complexa dessas características, que são governadas por maior número de genes e mais influenciadas pelas condições ambientais. Apesar de valores altos de CV evidenciarem alta contribuição de fatores não controláveis sobre a variância total, foi possível verificar diferenças significativas em nível de 5 % de probabilidade pelo teste F para todas as características, demonstrando que as linhas são potencialmente diferentes.

O agrupamento das médias permitiu inferir que a cultivar de pimentão diferiu significativamente dos demais genótipos para as variáveis estudadas, exceto para NTF e CF/DF (Tabela 3). Esse resultado evidencia as diferenças morfológicas entre a 'Casca Dura Ikeda' e as linhas recombinadas.

Para NTF, o agrupamento das médias dividiu os genótipos avaliados em dois grupos. O primeiro grupo foi formado pelas LR 6, LR 8, LR 13 e pelo genitor

UENF 1381, com o número de frutos variando de 288,00 a 335,33. No segundo, formado pelos demais genótipos, o número de frutos variou de 43,33 ('Casca Dura Ikeda') a 154,00 (LR 11). O número de frutos, para todos os genótipos estudados, foi superior aos obtidos por Geleta e Labuschagne (2004) para híbridos simples, duplos e triplos de pimenta.

Tabela 3. Agrupamento das médias de seis características agronômicas avaliadas em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Genótipos	Características					
	NTF	PTF	PMF	CF	DF	CF/DF
LR 1 ^a	109,33B	1613,33B	14,74B	88,27B	24,37C	3,63A
LR 2	122,67B	994,00C	8,13B	70,87C	18,91D	3,75A
LR 3	98,00B	1046,67C	10,80B	67,47C	23,48C	2,88C
LR 5	59,67B	988,33C	16,78B	82,38C	27,18B	3,03B
LR 6	299,67A	2325,00B	7,58B	46,65D	21,36D	2,19D
LR 8	290,67A	2186,67B	7,55B	53,94D	20,38D	2,67C
LR 11	154,00B	1629,00B	10,57B	55,61D	28,28B	1,97D
LR 13	288,00A	2135,00B	7,40B	66,04C	20,29D	3,27B
UENF1381	335,33A	1185,00C	3,59B	45,91D	15,01E	3,07B
'Casca Dura Ikeda'	43,33B	4611,67A	105,90A	109,67A	59,68A	1,83D

^a NTF: número total de frutos; PTF: peso total de frutos (g/planta); PMF: peso médio dos frutos (g/fruto); CF: comprimento dos frutos (mm); DF: diâmetro dos frutos (mm); CF/DF: relação comprimento/diâmetro do fruto.

^b LR: Linha recombinada.

O maior PTF foi obtido pela 'Casca Dura Ikeda', com 4.611,67 g. As linhas 1, 6, 8, 11 e 13 formaram o grupo intermediário para PTF, com pesos variando entre 1.613,33 g (LR 1) e 2.325,00 g (LR 6). O menor PTF foi obtido pela LR 5 (988,33 g), não diferindo significativamente das LR 2 e 3 e do acesso UENF 1381. Em híbridos de pimenta (*Capsicum chinense*), Sousa e Maluf (2003) obtiveram uma produção média por planta que variou entre 76,8 g e 591,1 g para os genitores, utilizados em esquema, de dialelo e entre 75,8 e 705,5 g para os híbridos obtidos desses cruzamentos. Os valores obtidos para PTF nas linhas 1,

6, 8, 11, 13 e a cultivar comercial se assemelham aos com os obtidos por Sousa e Maluf (2003).

Houve grande discrepância entre os genótipos estudados para o PMF, sendo o maior obtido pela cultivar Casca Dura Ikeda (105,90 g/fruto) e o menor valor pelo acesso UENF 1381 (3,59 g) um dos genitores das linhas recombinadas. Entretanto, somente a 'Casca Dura Ikeda' foi significativamente diferente dos demais genótipos testados, constituindo um grupo separado pelo teste Scott-Knott. Essa discrepância entre cultivares e linhas recombinadas de *Capsicum* foi anteriormente observada por Moreira (2008).

A cultivar Casca Dura Ikeda teve o maior CF (109,67 mm), diferindo significativamente dos demais genótipos. O acesso UENF 1381 teve CF de 45,91 mm, não diferindo significativamente das LR 6, 8 e 11. Dentre as linhas, o maior CF foi obtido pela LR 1 (88,27 mm), e o menor, pela LR 6 (46,65 mm). Esses valores estão entre os obtidos por Thul et al. (2009), que avaliaram 24 acessos de *Capsicum*, sendo 15 da espécie *C. annuum*.

Assim com para PMF e CF, a 'Casca Dura Ikeda' teve o maior DF (59,68 mm) e o genitor UENF 1381, o menor DF (15,01 mm), ambos diferindo significativamente das linhas recombinadas. Dentre as linhas, o maior DF foi obtido pela linha 11 (28,28 mm) e o menor DF, pela linha 2 (18,91 mm). Pela classificação utilizada por Carvalho et al. (2009), para pimentas do grupo *jalapeño* da espécie *C. annuum*, os frutos de todas as linhas recombinadas podem ser considerados de diâmetro médio. Os valores de DF obtidos nesse experimento foram superiores a nove entre dez genótipos de *C. annuum* testados por De Masi et al. (2007).

Para a relação CF/DF, notou-se que o formato retangular ou cônico prevaleceu entre as linhas avaliadas, exceto para as linhas 1 e 2, que tiveram frutos alongados ou piramidais de acordo com a classificação para frutos de *Capsicum* spp. usada por diferentes autores (Peixoto et al. 1999; Scivittaro et al. 1999; Moreira et al. 2006).

Neste trabalho, pode-se observar a diferença no número de frutos e no peso total e médio desses frutos, entre as linhas recombinadas e a cultivar comercial de pimentão. Além disso, para PTF, PMF, CF e DF, os maiores valores foram obtidos pela 'Casca Dura Ikeda', diferindo significativamente dos demais genótipos testados. Cabe ressaltar que as linhas recombinadas têm

características de pimenteiras e que não havia disponível no mercado cultivares de pimenteira da espécie *C. annuum*, o que dificulta a realização de uma comparação mais acurada entre os genótipos comerciais e as linhas recombinadas em teste. As cultivares de pimenta da espécie *C. annuum* protegidas receberam os certificados de proteção em 2010, depois da realização do experimento (Brasil, 2012). Dentre as registradas da espécie *C. annuum* havia somente cultivares de pimentão.

4.2 Resistência à mancha-bacteriana

Os dois componentes de resistência à mancha-bacteriana, ou seja, a escala de notas (NOTA) e a área abaixo da curva de progresso da doença (AVACPD), tiveram diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os genótipos testados (Tabela 4). Os CVs verificados para NOTA e AACPD (33,17 e 34,03 %, respectivamente), foram considerados altos pelos padrões propostos por Gomes e Garcia (2002). A abscisão foliar provocada pelo rápido avanço da doença, observada em algumas plantas suscetíveis, impossibilitando as avaliações subsequentes, pode ser umas das causas do alto CV, porém, o CV de AACPD está de acordo com os valores apresentados por Silva et al. (2006), que observaram CV entre 12,23 e 36,63 %, e com os dados de Carmo et al. (2001), que encontraram CV entre 32,71 e 38,80 %, ambos para avaliação da mancha-bacteriana em pimentão.

O agrupamento das médias obtidas pela NOTA revelou que as linhas consideradas resistentes (LR 1, 2, 6 e 8) tiveram média inferior ao genitor resistente (UENF 1381). Esse fato se repetiu para o agrupamento da variável AACPD (Tabela 5). Riva-Souza et al. (2009), avaliando essa mesma variável para a geração F_6 das linhas avaliadas neste trabalho, observou que 28 linhas F_6 foram mais resistentes do que UENF 1381. Cabe ressaltar que a média obtida pelo genitor UENF 1381 foi acima do esperado (1,68) e do já anteriormente observado por Costa et al. (2002) e Moreira (2008), que obtiveram NOTA de 1,0 e 1,40, respectivamente. Foram observadas plantas do acesso UENF 1381 fora do padrão para essa variável, tendo sido avaliadas com nota 3 e 4, aumentando a média desse acesso para a resistência à mancha-bacteriana.

Tabela 4. Valor e significância do quadrado médio (QM), média e coeficientes de variação (CV) da análise de variância da reação à Mancha-Bacteriana pelo método da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e pela escala de notas (NOTA), avaliadas em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

FV	GL	QM (NOTA)	QM (AACPD)
Tratamento	9	9,49**	2588,90**
Resíduo	90	0,59	164,48
Média		2,32	37,69
CV (%)			33,17 34,03

** significativo, ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F;

Tabela 5. Agrupamento das médias da avaliação da resistência pelo método da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e pela da escala de notas (NOTA), e avaliação da reação à mancha bacteriana (RMB) dos frutos de oito linhas recombinadas, do genitor UENF 1381 e de uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Genótipos	Características		
	NOTA	AACPD	RMB ^a
LR 1^b	1,24C	20,0C	R
LR 2	1,61C	26,0C	R
LR 3	3,27B	53,2B	S
LR 5	3,93A	64,8A	S
LR 6	1,22C	19,7C	R
LR 8	1,51C	24,4C	R
LR 11	2,83B	46,2B	S
LR 13	3,13B	51,0B	S
UENF 1381	1,68C	27,2C	R
Comercial	2,77B	44,4B	S

^a RMB: Reação à mancha bacteriana (R = resistente; S = suscetível);

^b LR = linha recombinada

Não houve diferenças entre o agrupamento das médias nos dois métodos utilizados para avaliar a RMB. Em ambos os métodos de avaliação, foram formados três grupos: o primeiro, formado apenas pela linha 5, foi considerado a linha mais suscetível à mancha-bacteriana; o grupo intermediário foi formado pelas LR 3, 11 e 13 e pela cultivar comercial; e, o terceiro grupo, com as menores médias e, conseqüentemente, com maior resistência à mancha-bacteriana foi formado pelas linhas 1, 2, 6, 8 e pelo genitor resistente UENF 1381.

Para NOTA, considera-se que genótipo com notas inferiores a 2,00 são resistentes à mancha-bacteriana, como sugerido por Riva (2006). Esse ponto de corte foi baseado nas notas dos genitores das linhas que estavam sendo avaliadas, as plantas do genitor suscetível obtiveram notas superiores a 2,00, e o do genitor resistente teve somente plantas com notas inferiores a 2,00. Nesse experimento, o genitor UENF 1381 confirmou sua resistência (média de 1,68) e a cultivar comercial confirmou a suscetibilidade, com média de 2,77 (Costa et al. 2002). Além disso, as linhas 1, 6, 8 confirmaram a sua resistência (Moreira, 2008).

Assim, pode-se concluir que as linhas LR 1, 2, 6 e 8 mantiveram a resistência, pelos dois métodos de avaliação, já verificada em trabalhos anteriores. Aliado a isso, as LRs tiveram ampla variabilidade quanto à produção e ao formato de frutos, o que permite, no processo seletivo, associar alta produção, resistência à mancha-bacteriana e o tipo de mercado. Destacaram-se as linhas 6 e 8, por apresentarem alto NTF, PMF de, aproximadamente, 7,5 g, frutos de formato cônico, características desejadas para o consumo *in natura* ou para conservas. As linha 1 e 2, entretanto, por serem resistentes à mancha-bacteriana, merecem destaque e deverão ser mantidas na continuidade do programa de melhoramento da UENF.

4.3. Teste de distinguibilidade e homogeneidade

Foram analisados 46 descritores dentre os 48 solicitados pelo MAPA/SNPC para os testes de Distinguibilidade, Homogeneidade e Estabilidade (DHE) para *Capsicum* spp. contidos no Ato n.º 2/2006 (Brasil, 2006), além da reação à mancha-bacteriana. Dezoito desses descritores, 38,30 % do total, foram idênticos para todos os genótipos analisados, representando ausência de distinguibilidade entre os genótipos para tais caracteres (Tabela 6).

Dois descritores foram considerados homogêneos, sem ser necessária a observação: o número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (descritor 5), só analisado se as plantas tivessem entrenós curtos (descritor 4), o que não foi identificado entre os genótipos avaliados; e a coloração da mancha da corola (descritor 19), que não foi avaliada devido à ausência de mancha na corola entre os genótipos (descritor 18).

Algumas das características consideradas homogêneas são utilizadas para a identificação taxonômica da espécie *C. annuum*, como a corola branca leitosa, sem manchas difusas nas pétalas e flores isoladas em cada nó, justificando a ausência de diferenças entre os genótipos estudados (IBPGR, 1983; Viñals et al., 1996; Mongkolporn e Taylor, 2011). Outros descritores, como a coloração verde dos frutos imaturos e vermelha dos frutos maduros são características das pimentas *jalapeño*, apesar de não serem exclusivas dessas cultivares (Moreira et al., 2006). Cabe ressaltar que os descritores são para todas as espécies do gênero *Capsicum*.

Para uma cultivar ser considerada distinta, as diferenças entre ela e as demais devem ser *consistentes e claras*. Diferenças são consideradas *consistentes* quando examinadas em, pelo menos, duas ocasiões independentes, como em dois ciclos diferentes de produção no mesmo local de cultivo. Para determinar uma diferença *clara* entre duas cultivares, depende-se de diversos fatores, devendo ser considerado, em particular, o tipo de expressão da característica. O SNPC divide os descritores em características qualitativas, pseudoqualitativas e quantitativas, apesar da avaliação dos caracteres ser discreta (Brasil, 2011). Nesse trabalho, os descritores foram classificados apenas em binários e multicategóricos, considerando, para diferenciá-los, o número de classes de cada descritor.

Tabela 6. Moda obtida em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. para 47 descritores multicategóricos. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2. Planta: posição das hastes	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3. Planta: comprimento da haste	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4. Planta: entrenós curtos (na parte mais alta)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<u>5. Apenas cultivares com entrenós curtos:</u> Planta: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (teste a ser feito em plantas sem desbrota)	Não se aplica, pois todas as LR não possuem entrenós curtos na parte mais alta da planta									
6. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó	5	5	5	5	3	5	5	5	5	5
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	5	7	7	5	5	7	1	3	5	7

Tabela 6, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
8. Folha: comprimento da lâmina	7	5	5	5	5	5	5	5	3	7
9. Folha: largura	5	3	3	3	3	3	5	3	3	5
10. Folha: coloração verde	7	5	7	7	5	5	5	5	5	7
11. Folha: variegação	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12. Folha: pigmentação antociânica	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13. Folha: pilosidade	5	3	3	1	3	1	3	1	3	1
14. Folha: rugosidade	3	1	1	1	3	1	3	3	1	1
15. Flor: número de flores por axila	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16. Flor: posição do pedúnculo	3	3	5	3	3	3	3	3	3	3
17. Flor: coloração da corola	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18. Flor: mancha na corola	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19. Flor: coloração da mancha na corola	Não se aplica devido à ausência de mancha da corola em todas as LR.									
20. Flor: coloração da antera	5	3	3	3	4	5	4	3	6	3
21. Flor: coloração do filamento	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
22. Flor: posição do estigma	3	7	5	3	7	3	7	5	3	5

Tabela 6, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
23. Fruto: coloração antes da maturação	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	5	5	5	5	7	5	5	3	5	7
25. Fruto: posição	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
26. Fruto: comprimento	5	3	3	5	3	3	3	3	3	5
27. Fruto: diâmetro	3	3	3	3	3	3	3	3	3	7
28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal	9	11	11	9	7	10	8	11	11	7
29. Fruto: forma predominante da seção transversal	2	1	2	2	3	2	2	2	3	2
30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31. Fruto: textura da superfície	2	1	2	2	2	1	2	2	1	1
32. Fruto: coloração na maturidade	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade	5	5	5	5	5	5	7	5	5	5

Tabela 6, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
34. Fruto: brilho	7	5	5	7	7	7	7	7	7	5
35. Fruto: profundidade da depressão peduncular	5	3	1	3	5	1	3	3	1	9
36. Fruto: forma do ápice	3	3	3	3	5	5	5	3	5	7
37. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares	3	1	3	3	1	1	5	1	1	5
38. Fruto: número predominante de lóculos	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39. Fruto: espessura do pericarpo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	7
40. Placenta: tamanho	7	7	7	7	7	7	7	5	7	7
41. Pedúnculo: comprimento	7	5	5	7	5	5	5	5	5	7
42. Pedúnculo: espessura	7	7	7	7	7	5	7	5	5	7
43. Cálice: margem	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44. Cálice: constrição anelar	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabela 6, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
45. Cálice: aspecto	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1
46. Fruto: capsaicina na placenta	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1
47. Reação à Mancha-Bacteriana (sintomas na área inoculada)	2	2	5	5	1	1	5	5	2	5

* LR: Linha recombinada

As características binárias que são aqueles descritores que se enquadram em dois níveis e não devem ser consideradas distintas, caso apresentem o mesmo nível de expressão. Enquadram-se, nessas características, os descritores: 1. Plântula - pigmentação antociânica no hipocótilo; 4. Planta - entrenós curtos (na parte mais alta); 11. Folha - variegação; 18. Flor - mancha na corola; 44. Cálice - constrição anelar; 45. Cálice - aspecto; e, 46. Fruto - capsaicina na placenta. Destes, somente os descritores nº 45 e 46 foram distintos entre os genótipos avaliados.

Para o aspecto do cálice (descritor nº 45), as linhas 1, 5, 6, 11 e a cultivar Casca Dura Ikeda possuem cálice não envolvente, distinguindo-se das LR 2, 3, 8, 13 e do genitor UENF 1381, com cálice envolvente.

A presença de capsaicina na placenta foi observada nas linhas 3, 5, 8, 11, 13 e UENF 1381. As linhas 1, 2, 6 e a cultivar comercial não apresentaram capsaicina. Estes dados concordam com os obtidos por Moreira (2008). A capsaicina, um dos alcalóides que conferem o ardor dos frutos de *C. annuum*, é produzida na placenta dos frutos e liberada quando o fruto sofre qualquer dano físico (Moreira et al. 2006). As variedades de pimenta empregadas na culinária diferem na presença e na quantidade de capsaicina, há, entretanto, espaço para pimentas com diferentes níveis de ardor. Segundo Lee et al. (2005), essa é uma das principais características a ser avaliada pelos melhoristas de *C. annuum*.

As características multicategóricas são os descritores que têm mais de dois níveis de expressão. Quando um descritor multicategórico estiver distribuído em uma escala, um único nível de expressão pode não ser suficiente para estabelecer a distinguibilidade, principalmente se o método de propagação das plantas permite uma maior variabilidade entre as plantas. Assim, para esses descritores, as linhas foram consideradas diferentes quando existia mais de dois níveis de intervalo entre elas. Quando se tratar de uma característica sem escala definida, não é possível utilizar como parâmetro de distinguibilidade clara entre as cultivares apenas com os valores do nível de expressão, assim, nem sempre, a diferença entre cultivares com níveis de expressão 1 e 2 é menor que entre as cultivares com níveis de expressão 1 e 4. Nesses casos, a distinguibilidade foi baseada na descrição que determina a nota da característica e na experiência da equipe avaliadora (Brasil, 2011).

Dentre os descritores multicategóricos, não houve distinção entre os genótipos estudados para: 3. Planta: comprimento da haste; 12. Folha: pigmentação antociânica; 15. Flor - número de flores por axila; 17. Flor: coloração da corola; 21. Flor: coloração do filamento; 23. Fruto - coloração antes da maturação; 25. Fruto - posição; 30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal; 32. Fruto: coloração na maturidade; 38. Fruto: número predominante de lóculos; e, 43. Cálice - margem. Os descritores PQ n° 5 e 19 foram homogêneos, porém não avaliados diretamente, como descrito anteriormente.

Para os descritores n° 2 (posição da haste) e n° 16 (Flor: posição do pedúnculo), os genótipos avaliados tiveram dois níveis de expressão em sequência. Entretanto, como tais descritores seguem uma escala, um único nível de expressão pode não ser suficiente para estabelecer a distinção clara entre as linhas para esses descritores, assim, optou-se por não estabelecer tais descritores como tendo capacidade de diferenciar as linhas estudadas.

Para 14 descritores multicategóricos, foi possível diferenciar cultivares (Tabela 7). A pigmentação antociânica na altura dos nós (descritor n° 7), permitiu a distinguibilidade da LR 11 e LR 13, com ausência ou muito fraca pigmentação das demais linhas, que tiveram pigmentação média a forte. Para o descritor n° 8 (Folha: comprimento da lâmina), o genitor UENF 1381 se distingue da LR 1 e da 'Casca Dura Ikeda'. Para o n° 13 (Folha: pilosidade), a LR 1 que tem pilosidade densa, distinguiu-se das LR 5, 8, 13 e a cultivar Casca Dura Ikeda, com ausência de pilosidade. Os diferentes tons de azul da coloração das anteras (descritor 20) permitiram separar as LR 1, 6, 8 e o genitor UENF 1381 dos demais genótipos avaliados que têm antera amarela com mancha azul. A posição do estigma (descritor 22) diferiu as LR 2, 6 e 11 das LR 1, 5, 8, UENF 1381. A LR 3 pode ser considerada diferente da linha 6 e da cultivar comercial pela intensidade da coloração dos frutos antes da maturação (descritor 24). A cultivar Casca Dura Ikeda foi a única com diâmetro dos frutos de tamanho grande (descritor 27). Frutos de seção longitudinal triangular e estreito-triangular diferiram as LR 6, 11 e 'Casca Dura Ikeda' (descritor 28). A LR 2 foi a única cultivar a ter a seção transversal do fruto de forma elíptica (descritor 29).

Tabela 7. Características com capacidade de distinção clara entre oito linhas recombinadas, o genitor UENF 1381 e uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. baseados em descritores multicategóricos. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Descritor	Característica / Genótipos		
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	Ausente ou muito fraca (1)* e fraca (3)	Média (5) e forte (7)	
	LR 11, LR 13	LR 1, 2, 3, 5, 6, 8, UENF 1381 e 'Casca Dura Ikeda'	
8. Folha: comprimento da lâmina	Curto (3)	Longo (7)	
	UENF 1381	LR 1 e 'Casca Dura Ikeda'	
13. Folha: pilosidade	Ausente (1)	Densa (7)	
	LR 5, 8, 13 e 'Casca Dura Ikeda'	LR 1	
20. Flor: coloração da antera	Amarela com mancha azul (3)*	Azul pálido (4), azul (5) e azul violeta (6)	
	LR 2, 3, 5, 11, 13 e 'Casca Dura Ikeda'	LR 1, 6, 8 e UENF 1381	
22. Flor: posição do estigma	Inserto (3)	Mesmo Nível (5)	Excerto (7)
	LR 1, 5, 8, UENF 1381	LR 3, 13, 'Casca Dura Ikeda'	LR 2, 6 e 11
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	Clara (3)	Escura (7)	
	LR 13	LR 6 e 'Casca Dura Ikeda'	
27. Fruto: diâmetro	Pequeno (3)	Grande (7)	
	LR 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 13 e UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'	

Tabela 7, Cont.

Descritor	Característica / Genótipos		
28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal	Triangular (7) e estreito-triangular (8) LR 6, 11 e 'Casca Dura Ikeda'	Forma de chifre (9), ovalada (10) e elíptica (11) LR 1, 2, 3, 5, 8, 11 e UENF 1381	
29. Fruto: forma predominante da seção transversal	Elíptica (1) LR 2	Angulada (2) LR 1, 3, 5, 8, 11, 13 e 'Casca Dura Ikeda'	Arredondada (3) LR 6 e UENF 1381
31. Fruto: textura da superfície	Lisa (1) LR 2, 8, UENF 1381 e 'Casca Dura Ikeda'	Levemente enrugada (2) LR 1, 3, 5, 6, 11 e 13	
35. Fruto: profundidade da depressão peduncular	Ausente ou muito rasa (1) e rasa (3) LR 2, 3, 5, 8, 11 e 13	Média (5) LR 1, 8 e UENF 1381	Muito profunda (9) 'Casca Dura Ikeda'
36. Fruto: forma do ápice	Aguda (3) LR 1, 2, 3, 5, 13	Arredondada (5) LR 6, 8, 11 e UENF 1381	Deprimida (7) 'Casca Dura Ikeda'
37. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares	Ausente ou muito rasa (1) e rasa (3) LR 1, 2, 3, 5, 6, 8, 13 e UENF 1381	Média (5) LR 11 e 'Casca Dura Ikeda'	
47. Reação à mancha-bacteriana	Ausência de sintoma visível (1) e clorose (2) LR 1, 2, 6, 8 e UENF 1381	Clorose com pontos necrosados (3), mancha necrosada (4) e totalmente necrosada (5) LR 3, 5, 11, 13 e 'Casca Dura Ikeda'	

* Característica e nota de cada descritor avaliado.

A superfície lisa dos frutos fez com que as LR 2 e 8, bem como, o genitor UENF 1381 e a cultivar comercial se distinguíssem dos demais genótipos estudados. O ‘Casca Dura Ikeda’ se distinguiu das demais por ter depressão peduncular profunda (descritor 35) e forma deprimida do ápice (descritor 36).

Para a reação à mancha-bacteriana, a distinção entre as linhas foi feita como sugerido por Riva (2006). Optou-se por usar essa classificação devido a todo conhecimento adquirido pela equipe de melhoramento de *Capsicum* da UENF ao longo dos anos, permitindo uma decisão consciente. Assim, as linhas 1, 2, 6, 8 e genitor UENF 1381 foram considerados distintos e classificados como resistentes, concordando com as avaliações para NOTA e AACPD descritas acima. Os valores obtidos para NOTA se referem às médias das plantas de cada genótipo; na análise de distinguibilidade, são apresentadas as modas.

Para o programa de melhoramento da UENF, esse descritor é o de maior interesse na diferenciação das linhas, pois se sabe que, até o momento, não há cultivares de pimenta protegidas ou registradas para a resistência à mancha-bacteriana. Assim, sendo as linhas recombinadas resistentes distinguíveis das demais testadas e de outras cultivares protegidas e registradas, somente esse descritor já é capaz de dar a característica distinguibilidade, exigidas para proteção. Obviamente que a homogeneidade e a estabilidade também devem ser analisadas criteriosamente para solicitar a proteção das cultivares, bem como os ensaios de valor de cultivo e uso, necessários para requerer o registro das futuras cultivares.

A associação dos descritores nº 23 e 24 foram utilizados na proteção das cultivares ‘BRS Sarakura’ e ‘BRS Garça’. A ‘BRS Sarakura’ foi identificada como tendo o fruto de coloração verde médio antes da maturação; para a ‘BRS Garça’ a coloração foi verde escura (Carvalho et al., 2009). Neste trabalho, o descritor 23 foi homogêneo para todas as linhas recombinadas e o descritor 24 diferiu a LR 13. Assim, utilizando-se a associação desses descritores, denotando ao fenótipo coloração verde clara dos frutos antes da maturação, diferencia-se a LR 13 dos demais genótipos estudados, que tiveram coloração verde média e escura, e das cultivares ‘BRS Sarakura’ e ‘BRS Garça’.

Para a variável comprimento do fruto (descritor 26), as linhas foram divididas em dois grupos: as LR 1, 5 e a cultivar Casca Dura Ikeda com comprimento médio de frutos e as LR 2, 3, 6, 8, 11, 13 e UENF 1381 com

comprimento curto. Tais cultivares não podem ser consideradas distintas, pois para tal, elas deveriam apresentar, pelo menos, dois níveis diferentes de expressão entre elas. Porém, quando os comprimentos dos frutos foram medidos, a comparação entre médias mostrou que a cultivar Casca Dura Ikeda teve o maior CF, diferindo significativamente dos demais genótipos. Contudo, as duas análises coincidem pelo fato dos três maiores comprimentos serem da LR 1, 5 e a 'Casca Dura Ikeda', avaliados com a mesma nota.

Para o diâmetro do fruto (descriptor 27), a cultivar Casca Dura Ikeda, com diâmetro classificado como grande, diferiu dos demais genótipos estudados, que tiveram diâmetro pequeno, concordando com o resultado do teste de média.

Segundo Carvalho et al. (2009), além dos descritores 23 e 24, também foram utilizados o comprimento, o diâmetro e as espessuras do pericarpo e do pedúnculo para distinguir as cultivares 'BRS Sarakura' e 'BRS Garça' das demais avaliadas. Entretanto, foram apresentados como dados medidos e não apenas observados. A altura e a largura das plantas também foram utilizadas, mesmo esses descritores não estando na lista proposta pelo SNPCC. Porém, sabe-se que, a qualquer tempo, durante a tramitação do processo de proteção, o SNPCC pode solicitar informações adicionais, assim como o melhorista que conduz os testes de DHE pode incluir informações não solicitadas no Ato que define os descritores a serem analisados (Brasil, 2011). Assim, os descritores 26 e 27, comprimento e diâmetro de fruto, respectivamente, que foram mensurados e avaliados pelo teste de média, poderão ser utilizados como características distintas das linhas recombinadas, observando-se a homogeneidade para esses caracteres.

Todas as linhas avaliadas neste trabalho são oriundas do cruzamento entre os acessos UENF 1381 e UENF 1421, e, até o momento, a seleção praticada na progênie deste cruzamento foi realizada para a resistência à mancha-bacteriana e alguns poucos atributos agrônômicos (Riva-Souza et al., 2009; Moreira, 2008; Moreira et al., 2009; Moreira et al., 2010a). Com isso, a presença de diferentes expressões fenotípicas encontrada para 61,70 % dos descritores mostra a variabilidade das linhas, mesmo praticando a seleção para caracteres específicos, bem como, a eficiência desses descritores na diferenciação de linhagens.

A homogeneidade é dada pela variação na expressão de características relevantes nas plantas que compõem a cultivar. Quando as plantas que compõem a cultivar são muito similares, as plantas atípicas são percebidas visualmente. A

variação na expressão da característica pode, também, ocorrer em apenas uma parte da planta, cabendo ao avaliador decidir se a planta está destoando do padrão da cultivar (Brasil, 2011). Para este trabalho, esse ponto não foi considerado, ou seja, qualquer variação verificada foi quantificada. Decidiu-se por essa metodologia por entender que esse ensaio é prévio ao DHE formal, devendo, portanto, qualquer pequena variação ser eliminada. As sementes das plantas consideradas atípicas foram colhidas separadamente.

Em 20 dos 47 descritores avaliados (42,55 %), não foram observadas plantas fora do tipo para nenhum dos genótipos estudados. Quando somados aos caracteres cujos genótipos, apesar de ter plantas fora do tipo, esse número ficou abaixo do determinado pelo MAPA/SNPC (duas plantas), o número de descritores homogêneos sobe para 28 (59,57 %) (Tabela 8). A exceção para esse número de plantas fora do padrão é para a reação à mancha-bacteriana, que, por ser analisada em condições controladas, com menor número de observações, apenas uma planta fora do tipo pode ser observada para que a linha seja considerada homogênea.

As linhas recombinadas com menor número de descritores heterogêneos foram a LR 1 (cinco descritores) e a LR 3 (oito descritores). As linhas 2, 5 e 6 e a 'Casca Dura Ikeda' tiveram nove descritores heterogêneos. Nesse sentido, o genótipo comercial, com registro no MAPA para a comercialização, não teria um certificado de proteção concedido, baseado no teste realizado neste trabalho. A LR 1, sendo heterogênea para cinco descritores, deve ser trabalhada no sentido de obter a homogeneidade das plantas para tais descritores. Para as demais linhas, isso também deverá ocorrer, no entanto, como o número de caracteres heterogêneos é maior, provavelmente, o nível de homogeneidade desejado necessitará de um maior esforço e dedicação.

Tabela 8. Número de plantas fora do padrão obtidas por oito linhas recombinadas, o genitor UENF 1381 e uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. para 46 descritores multicategóricos. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
1. Plântula: pigmentação antociânica no hipocótilo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2. Planta: posição das hastes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3. Planta: comprimento da haste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. Planta: entrenós curtos (na parte mais alta)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>5. Apenas cultivares com entrenós curtos:</u>										
Planta: número de entrenós entre a primeira flor e os entrenós curtos (teste a ser feito em plantas sem desbrota)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó	0	2	5	0	0	5	0	0	0	0
7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós	17	7	0	0	0	0	0	0	9	0

Tabela 8, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
8. Folha: comprimento da lâmina	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0
9. Folha: largura	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10. Folha: coloração verde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11. Folha: variegação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Folha: pigmentação antociânica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13. Folha: pilosidade	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
14. Folha: rugosidade	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Flor: número de flores por axila	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Flor: posição do pedúnculo	2	0	4	2	0	1	0	0	0	0
17. Flor: coloração da corola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Flor: mancha na corola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. Flor: coloração da mancha na corola	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20. Flor: coloração da antera	2	15	1	0	0	18	4	14	13	1
21. Flor: coloração do filamento	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22. Flor: posição do estigma	2	4	7	13	4	3	0	15	5	17

Tabela 8, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
23. Fruto: coloração antes da maturação	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24. Fruto: intensidade da coloração antes da maturação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25. Fruto: posição	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26. Fruto: comprimento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27. Fruto: diâmetro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal	1	0	0	11	23	13	26	0	15	18
29. Fruto: forma predominante da seção transversal	1	11	5	17	13	9	11	0	15	6
30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal	1	0	0	0	4	4	19	1	2	2
31. Fruto: textura da superfície	0	0	12	11	16	9	7	10	14	12
32. Fruto: coloração na maturidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade	3	11	4	4	12	13	12	18	9	5

Tabela 8, Cont.

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
34. Fruto: brilho	15	5	1	0	1	10	17	15	6	2
35. Fruto: profundidade da depressão peduncular	20	9	19	10	23	17	15	13	13	18
36. Fruto: forma do ápice	0	0	0	0	0	17	16	13	6	6
37. Fruto: profundidade dos sulcos interloculares	20	14	16	12	13	12	21	4	7	19
38. Fruto: número predominante de lóculos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39. Fruto: espessura do pericarpo	1	4	1	9	1	2	0	4	9	2
40. Placenta: tamanho	0	0	0	0	0	0	0	9	0	7
41. Pedúnculo: comprimento	0	2	0	0	1	0	0	0	0	2
42. Pedúnculo: espessura	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
43. Cálice: margem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44. Cálice: constrição anelar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45. Cálice: aspecto	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Tabela 8, Cont

Descritor	LR 1*	LR 2	LR3	LR5	LR 6	LR 8	LR 11	LR 13	UENF 1381	'Casca Dura Ikeda'
46. Fruto: capsaicina na placenta	1	2	1	2	7	0	1	1	0	1
47. Reação à Mancha-Bacteriana (sintomas na área inoculada)	1	0	1	0	1	1	1	2	4	0
N° de descritores heterogêneos	5	9	8	9	9	12	10	10	13	9

* LR: Linha recombinada

Houve ausência de homogeneidade para os seguintes descritores: 6. Apenas cultivares sem entrenó curto (em brotações laterais primárias): Planta: comprimento do entrenó; 7. Planta: pigmentação antociânica na altura dos nós; 8. Folha: comprimento da lâmina; 16. Flor: posição do pedúnculo; 20. Flor: coloração da antera; 22. Flor: posição do estigma; 28. Fruto: forma predominante da seção longitudinal; 29. Fruto: forma predominante da seção transversal; 30. Fruto: sinuosidade do pericarpo na porção basal; 31. Fruto: textura da superfície; 32. Fruto: coloração na maturidade; 33. Fruto: intensidade da coloração na maturidade; 34. Fruto: brilho; 35. Fruto: profundidade da depressão; 36. Fruto: forma do ápice; 37. Fruto: profundidade dos sulcos interlocares; 39. Fruto: espessura do pericarpo; 40. Placenta: tamanho; 46. Fruto: capsaicina na placenta; e, 47. Reação à Mancha-Bacteriana (sintomas na área inoculada).

A variação em qualquer cultivar a ser testada é resultado da combinação dos componentes genéticos e ambientais. O componente genético é influenciado pelo modo de propagação da cultivar: para plantas autógamas ou propagadas vegetativamente, é esperada baixa ou nenhuma variação entre as plantas; para plantas autógamas com certo grau de fecundação cruzada, tolera-se uma variação um pouco maior (Brasil, 2011).

Mesmo a pimenta sendo uma espécie com flores hermafroditas, autocompatíveis e, normalmente, autopolinizadas, a taxa de polinização cruzada natural pode chegar a 75 % (Todorov e Csilléry, 1990). Aliado a isso, Faria Júnior et al. (2008) concluíram que, pelo menos, dez espécies de insetos visitaram as flores de pimentão e que a polinização entomófila teve um impacto positivo na massa, no diâmetro, na espessura de pericarpo e no número de sementes dos frutos produzidos. Assim, além de dificultar a homogeneidade das linhas, a ação de insetos polinizadores faz com que as linhas que não tiveram seus cruzamentos controlados formem maior número de sementes.

Cabe ressaltar que, durante o avanço de gerações e experimentos de avaliação de interação genótipo x ambiente, as linhas testadas são cultivadas muito próximas, favorecendo a fecundação cruzada e reforçando a necessidade de se avaliar a homogeneidade dos genótipos nas diferentes fases do programa de melhoramento. Para contornar tal situação, a cada experimento, as flores devem ser ensacadas, e as sementes, para serem utilizadas nas próximas etapas do programa, devem ser retiradas somente dos frutos oriundos destas flores. No

entanto, o ensacamento das flores é um trabalho demorado e que exige muito cuidado para que a flor não caia antes da fecundação.

Os descritores que tiveram plantas fora do tipo para todos os genótipos analisados foram: intensidade da coloração dos frutos maduros (descritor n° 33); profundidade da depressão peduncular dos frutos (descritor n° 35); e a profundidade dos sulcos interloculares (descritor n° 37). Os descritores n° 22 (Flor: posição do estigma), 29 (Fruto: forma predominante da seção transversal), 34 (Fruto: brilho) e 39 (Fruto: espessura do pericarpo) tiveram plantas atípicas para nove dos dez genótipos analisados. E os descritores n° 20 (Flor: coloração da antera), 28 (Fruto: forma predominante da seção longitudinal) e 31 (Fruto: textura da superfície) tiveram plantas atípicas para oito genótipos testados. Assim, os descritores com maior grau de heterozigosidade são multicategóricos. O grau de variação, devido ao ambiente, é influenciado pelo tipo de expressão da característica, sendo que, para os caracteres multicategóricos, os níveis de variação devido ao ambiente são mais elevados do que para os binários. Dentre os descritores binários, somente a presença de capsaicina apresentou plantas com diferentes padrões dentro da mesma LR.

A linha 6, teve segregação para a presença de capsaicina no trabalho desenvolvido por Moreira (2006). Neste trabalho, essa linha é a com maior número de plantas fora do padrão. Para a espécie *C. annuum*, a pungência nos frutos é condicionada pelo *gene C*, localizado no cromossomo 2 (Lippert et al. 1965; Blum et al. 2002). Porém, a quantidade de capsaicina é uma característica quantitativa, influenciada por condições ambientais, manejo da cultura e idade do fruto (Wagner, 2003).

Após a análise do teste preliminar de distinguibilidade e homogeneidade, pode-se concluir que há características binárias e multicategóricas capazes de distinguir as cultivares estudadas. Dentre os descritores com capacidade de distinção, estão: a pigmentação antociânica na altura dos nós; o comprimento da lâmina foliar; a pilosidade da folha; a profundidade da depressão peduncular do fruto; a intensidade da coloração dos frutos antes da maturação; a forma do ápice; o comprimento de fruto; o diâmetro do fruto; e a reação à mancha-bacteriana.

Alguns descritores foram heterogêneos dentro de todos os genótipos estudados, entretanto as linhas recombinadas 1 e 3 foram mais homogêneas, e

as linhas 2, 5 e 6 foram heterogêneas para o mesmo número de descritores que a cultivar Casca Dura Ikeda.

Considerando os resultados observados neste trabalho e também os custos e a infraestrutura necessária para realizar experimentos de campo com *Capsicum annum*, pode-se recomendar que os ensaios para análise de estabilidade dos genótipos, conduzidos em vários locais e anos, seja feito em duas etapas: numa primeira etapa, as LR 1, 2, 3, 5 e 6 devem ser submetidas a novas etapas de autofecundação por uma ou duas gerações, para eliminação de plantas fora do tipo da linhagem; na segunda etapa, as linhas seriam submetidas ao teste de DHE. Durante as novas etapas de autofecundação, o *roguing* deverá ser feito durante os experimentos de análise de estabilidade, eliminando-se do campo, as plantas heterogêneas. Deve-se proceder, também, o ensacamento das flores, evitando a polinização cruzada.

Ainda assim, uma relação mais estreita com a equipe do SNPC, orientando a condução dos testes de DHE, faz-se necessária, para que os trabalhos sejam conduzidos com a maior expertise possível, dando confiabilidade e certeza do cumprimento das exigências burocráticas para a efetivação da proteção das cultivares.

4.4. Divergência genética

4.4.1. Variáveis quantitativas

No dendrograma, baseado no método da ligação média entre grupo (UPGMA), formaram-se dois grupos, sendo o Grupo I formado pela cultivar comercial, e o Grupo II formado por todos os outros genótipos (Figura 2). O ponto de corte foi baseado na ocorrência de mudanças abruptas no dendrograma e o conhecimento prévio das linhagens. Esse dendrograma era esperado, uma vez que a 'Casca Dura Ikeda' foi significativamente diferente dos demais genótipos testados para PTF, PMF, CF e DF, como visto no teste de média (Tabela 3), caracteres usados nesta análise.

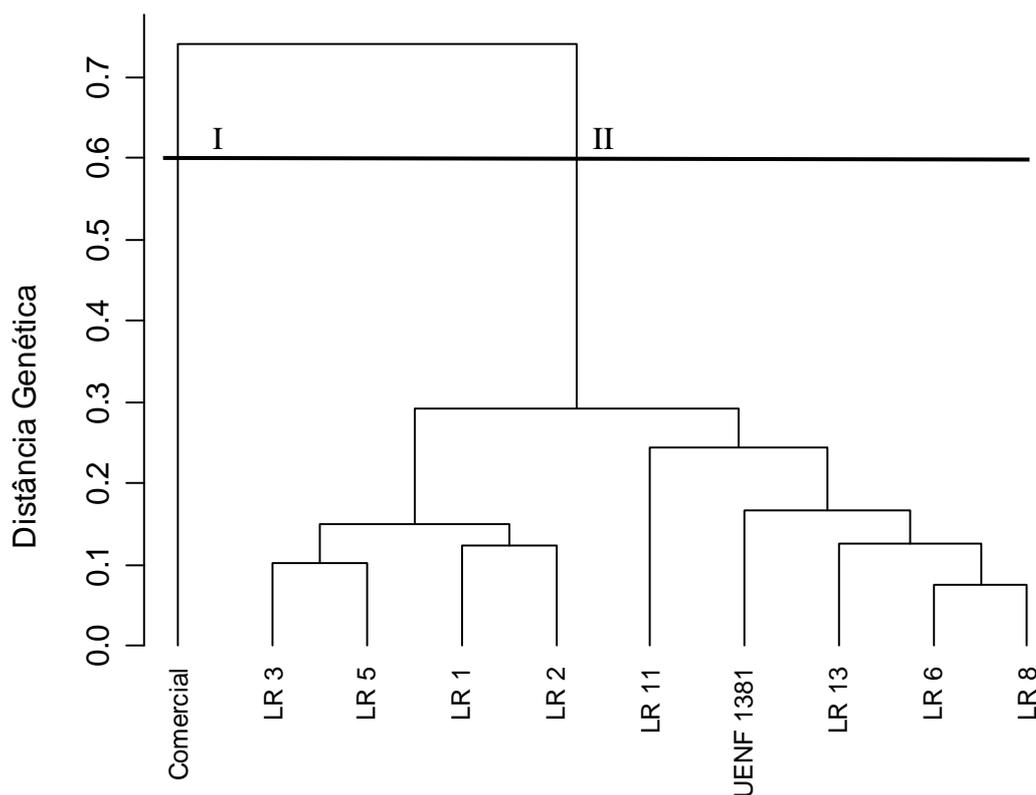


Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base em seis descritores quantitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Coeficiente de correlação cofenética (CCC): 0,96. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

O coeficiente de correlação cofenético foi de 96 %. Considerando que a correlação cofenética é uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado através desta, observou-se que o dendrograma foi altamente consistente na representação gráfica das reais distâncias obtidas entre as linhagens (Sokal e Rohlf, 1962, Kopp et al., 2007).

O agrupamento realizado pelo método de otimização de Tocher foi semelhante ao agrupamento pelo UPGMA, no qual o Grupo I foi formado pelas linhas 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11 e 13 e pelo acesso UENF 1381; e o Grupo II por 'Casca Dura Ikeda'. Sudré et al. (2005), ao aplicar o método de Otimização de Tocher para o agrupar 56 acesso de *Capsicum* spp., observaram a formação de grupos muito semelhantes aos formados pelo método do vizinho mais próximo. Já Monteiro et al. (2010), em um trabalho de avaliação de divergência genética entre 23 acessos de pimentas do gênero *Capsicum*, observaram que o método

hierárquico UPGMA e o método de agrupamento de otimização Tocher, baseados nos descritores quantitativos, foram discrepantes em três dos cinco grupos formados, fato não ocorrido neste trabalho.

Os componentes principais foram estimados de modo a dispor as cultivares em um gráfico de dispersão, utilizando a dispersão dos valores das referidas cultivares, em relação aos eixos representativos dos componentes principais. Esta análise mostrou que os dois primeiros componentes foram responsáveis por 91,07 % da variação total (Tabela 9), adequando-se, assim, a uma representação bidimensional (Figura 3). Para Bento et al (2007), a análise dos três primeiros componentes principais, em 29 acessos de *Capsicum*, explicou cerca de 80% da variância total, adequando-se a uma representação gráfica tridimensional. Em feijão-caupi, os dois primeiros componentes principais referentes aos caracteres de rendimento agrônômico viabilizaram a construção de uma dispersão bidimensional, devido aos dois primeiros componentes terem explicado 82,24 % da variação total para acessos de porte prostrado e 83,49 % para os acessos de porte semi-ereto, explicando a diversidade entre os genótipos estudados (Passos et al., 2007).

Tabela 9. Estimativas das variâncias (autovalores) associadas aos componentes principais relativos aos seis descritores quantitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Componentes Principais (CP)	Estimativas dos Autovalores		
	Raiz	Raiz (%)	% Acumulada
CP 1	3,996	66,60	66,60
CP 2	1,468	24,47	91,07
CP 3	0,473	7,89	98,96
CP 4	0,045	0,74	99,70
CP 5	0,016	0,26	99,96
CP 6	0,019	0,04	100,00

Na dispersão gráfica, formando pelos dois primeiros componentes principais, foi possível constatar a semelhança desta com o agrupamento formado pelos métodos UPGMA e Tocher, onde o genótipo comercial ficou isolado dos demais genótipos estudados.

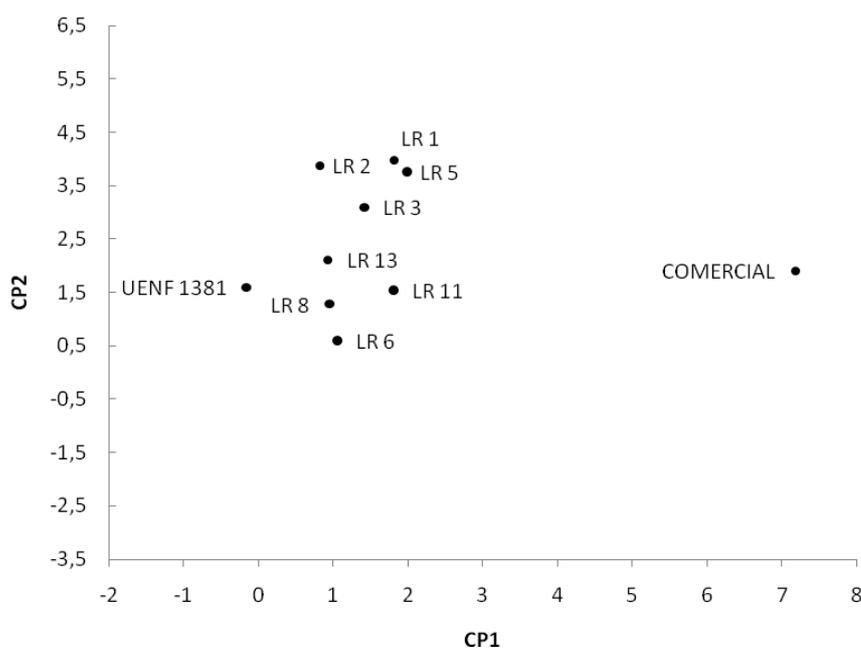


Figura 3. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos dos dois primeiros componentes principais (CP 1 e CP 2), de seis descritores quantitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

Segundo Rocha et al. (2010), a análise de variáveis canônicas permite avaliar o grau de similaridade genética entre genitores, considerando-se a matriz de covariância residual e a matriz de covariância fenotípica entre os caracteres avaliados. Os autovalores associados às variáveis canônicas (VC) foram estimados para as seis variáveis quantitativas avaliadas nos genótipos de *Capsicum* spp. (Tabela 10), onde foi possível observar que as duas primeiras variáveis explicaram 96,81 % da variação total. Segundo Cruz et al. (2004), quando as duas primeiras variáveis canônicas explicam acima de 80% da variação total, sua utilização é satisfatória no estudo da divergência genética por

meio de avaliação da dispersão gráfica dos escores em relação às variáveis canônicas (VC 1 e VC 2). Com base nesse conceito, fez-se a dispersão gráfica bidimensional dos dois primeiros escores (Tabela 11e Figura 4).

Tabela 10. Estimativas das variâncias (autovalores) associadas às variáveis canônicas relativas aos seis descritores quantitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Variáveis Canônicas	Estimativas dos Autovalores		
	Raiz	Raiz (%)	% Acumulada
VC 1	225,093	85,53	85,53
VC 2	29,684	11,28	96,81
VC 3	5,348	2,03	98,84
VC 4	2,243	0,85	99,69
VC 5	0,522	0,20	99,89
VC 6	0,288	0,11	100,00

Tabela 11. Escores das variáveis canônicas (VC 1 e VC 2) obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Genótipos	VC 1	VC 2
LR 1	46,15	38,06
LR 2	44,08	33,59
LR 3	47,17	32,14
LR 5	50,82	36,19
LR 6	40,99	22,93
LR 8	40,94	25,50
LR 11	51,62	29,18
LR 13	41,73	29,90
UENF 1381	40,29	21,84
Comercial	90,61	26,78

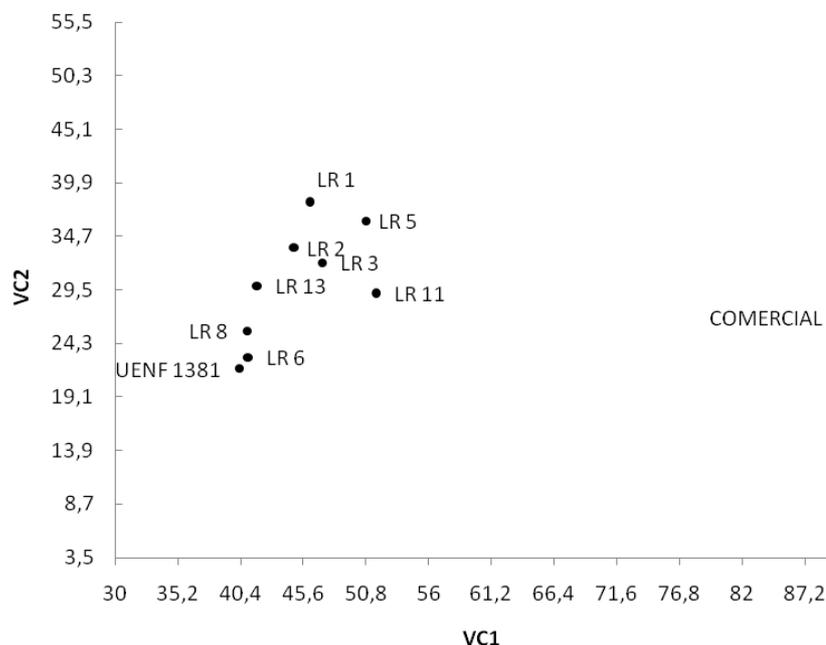


Figura 4. Dispersão gráfica dos escores em relação aos eixos representativos das duas primeiras variáveis canônicas (VC 1 e VC 2), de seis descritores quantitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

Neitzke et al. (2010), trabalhando com cultivares ornamentais de pimenteiras, observaram que as duas primeiras variáveis canônicas explicaram cerca de 96,85 % da variação total, permitindo a construção de um gráfico de dispersão bidimensional, utilizando os escores da primeira e da segunda variável canônica. A dispersão gráfica permitiu a separação dos acessos em grupos, podendo ser utilizada como uma estratégia para selecionar genótipos divergentes a serem utilizados em cruzamentos artificiais. Para tomateiro do grupo cereja, Rocha et al. (2009) verificaram, na análise baseada nas variáveis canônicas (VC), que cerca de 78,58% explicaram a variância total, sendo o VC1 responsável por 41,13%, o VC2 por 27,14% e o VC3 por 10,31%, adequando-se, nesse caso, a uma representação gráfica tridimensional. Sudré et al. (2005), avaliando em 56 acessos de *Capsicum* spp., as duas primeiras variáveis explicaram 83,72 % da

variação total, assim, fizeram a dispersão gráfica bidimensional dos dois primeiros escores.

A dispersão gráfica obtida pelas variáveis canônicas foi similar à obtida pelos componentes principais e pelos agrupamentos formados pelo método hierárquico (UPGMA) e de otimização (Tocher) utilizados, onde o genótipo comercial ficou separado dos demais genótipos. Para Sudré et al. (2005), os grupos formados por meio da dispersão gráfica dos escores diferiram dos grupos formados pela projeção das distâncias no plano, apenas para um acesso, sendo concordantes com os agrupamentos pelo método hierárquico do vizinho mais próximo e pela otimização de Tocher. Rocha et al. (2009) concluíram que houve concordância parcial entre a análise de agrupamento pelo UPGMA e as variáveis canônicas, quando é observada a distribuição dos acessos em cada grupo, já que alguns acessos foram alocados juntos, independente da técnica de agrupamento utilizada.

4.4.2. Variáveis qualitativas

O agrupamento pelo método hierárquico UPGMA formou quatro grupos (Figura 5). O valor do coeficiente de correlação cofenética foi de 0,8243, valor próximo ao obtido por Monteiro et al. (2010), que obtiveram um coeficiente de correlação cofenética de 0,86, trabalhando com 19 qualitativos multicategóricos para análise da divergência genética em *Capsicum*.

O Grupo I foi formado, apenas, pela cultivar Casca Dura Ikeda. Assim como nos descritores quantitativos e no teste de média, esse agrupamento permitiu a separação da cultivar comercial, que, dentre as características qualitativas, teve maior comprimento e largura da folha, grande comprimento e diâmetro médio do fruto, depressão peduncular muito profunda, ápice muito deprimido e maior espessura do pericarpo.

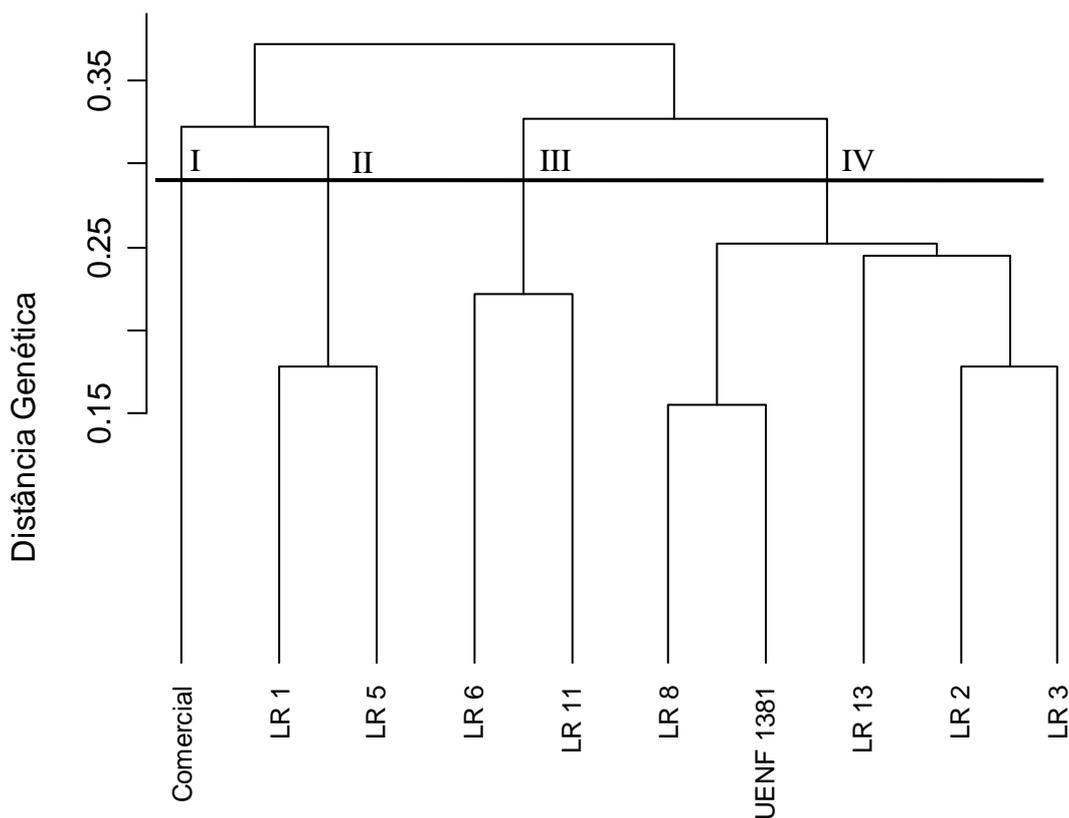


Figura 5. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base em 47 descritores qualitativos, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annum* L. Coeficiente de correlação cofenética (CCC): 0,81. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

O Grupo II foi formado pelas LR 1 e LR 5. Essas linhas foram as únicas a apresentarem frutos em forma de chifre. Além disso, apesar de não serem características exclusivas dessas linhas, elas eram concordantes na coloração verde escura das folhas, na posição inserta do estigma nas flores, no comprimento médio dos frutos e no pedúnculo de comprimento longo. O Grupo III foi constituído pelas linhas recombinadas 6 e 11. Essas linhas possuem a antera azul pálido e forma do ápice dos frutos arredondada. No Grupo IV, ficaram as LR 2, 3, 8, 13 o genitor UENF 1381, que possuem, exclusivamente, cálice envolvente e fruto ovalado ou elíptico.

Foi observado que os descritores qualitativos multicategóricos permitiram uma melhor diferenciação entre as linhas estudadas em relação aos descritores quantitativos. Esses dados concordam com Neitzke et al., (2010); Sudré et al.

(2010) e Monteiro et al. (2010), que relatam, ainda, que isto se dá, provavelmente, em função do tipo de herança gênica, pois descritores qualitativos são controlados por poucos genes e, portanto, menos afetados pelo ambiente. Bento et al. (2007) ressaltam que as variáveis multicategóricas têm a vantagem de serem características de fácil observação e que requerem menos tempo e mão-de-obra, sendo ideal a sua utilização quando não se dispõe de muitos recursos humanos e financeiros. Moura et al. (2010) observaram uma maior eficiência na distinção dos genótipos quando foram utilizadas as variáveis qualitativas em comparação às quantitativas. No entanto, isso não invalida a necessidade de utilizar descritores quantitativos nos estudos de divergência genética. Neitzke et al., (2010) também concluíram que os dados qualitativos separam mais os acessos e formam maior número de grupos se comparados com os dados quantitativos, porém a análise ideal é a quali-quantitativa, por possibilitar uma caracterização mais fidedigna dos genótipos.

A formação dos grupos pelo método Tocher foi idêntico ao UPGMA. Como o agrupamento dos genótipos é considerado subjetivo, resalta-se a importância de aplicar-se mais de um método de agrupamento, visando à coerência dos resultados apresentados (Sudré et al., 2005; Cruz et al., 2004). Entretanto, para os dados quantitativos e qualitativos, os dois agrupamentos analisados foram idênticos. Esse fato concorda com Monteiro et al. (2010), que comparando-se os agrupamentos obtidos pelo método hierárquico UPGMA e pelo método de agrupamento de otimização via Tocher, com base nos descritores qualitativos em *Capsicum*, observou-se uma concordância, destacando-se a coincidência dos acessos constantes nas mesmas formações de grupos.

4.4.3. Variáveis moleculares

A partir da análise dos géis, foram observadas 82 bandas polimórficas e oito bandas monomórficas (Tabela 12). O poder de resolução variou de 1,0 (iniciador VHV(GT)7 - número 30) a 3,8 (iniciadores (AG)8YT (número 5); (AG)8YC (número 18) e (AG)7C (número 71), sendo considerados baixos quando comparados aos dados obtidos por Prevost e Wilkinson (1999), que obtiveram poder de resolução de dois iniciadores ISSR de 10,6 e 12,5, sendo capazes de distinguir as 34 cultivares de batata avaliadas.

Tabela 12. Iniciadores utilizados na análise de divergência genética de oito linhas recombinadas, do genitor UENF 1381 e de uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L., número de bandas formadas e poder de resolução baseado na metodologia de Prevost e Wilkinson (1999). Campos dos Goytacazes, RJ, 2011

Iniciadores	Sequência	Bandas		Poder de Resolução
		Monomórficas	Polimórficas	
3	(CAC)3GC	1	6	2,2
5	(AG)8YT	0	7	3,8
14	(GA)8C	0	5	3,6
15	(CT)8G	2	2	1,4
17	(AC)8T	0	6	2,8
18	(AG)8YC	0	8	3,8
19	(AG)8YA	1	8	3,0
20	(GA)8YT	1	5	2,0
21	(CA)8RG	0	6	3,6
22	(GT)8YC	0	6	3,0
25	(ATG)6	0	6	2,8
30	VHV(GT)7	2	2	1,0
51	(ATC)6T	0	5	3,0
56	(G(CTA)6	1	5	3,4
71	(AG)7C	0	5	3,8
Total		8	82	

A baixa capacidade de diferenciação dos genótipos dos iniciadores utilizados pode ter sido acarretada pelo parentesco entre as linhas estudadas, entretanto Reddy et al. (2002) relatam que os marcadores ISSR têm grande eficiência na distinção de genótipos, mesmo sendo estes estreitamente relacionados. Um estudo realizado por Goulão e Oliveira (2001), em cultivares de maçã, mostrou que estes marcadores foram mais eficientes na diferenciação de cultivares do que os marcadores RAPD e AFLP. Assim, uma melhor definição das condições de extração de DNA, de preparo das amostras e condições de amplificação deve ser estudadas para obtenção de melhores resultados.

A análise do agrupamento pelo método UPGMA, com um corte a 50 % levou à formação de cinco grupos (Figura 6). O Grupo I foi formado, somente, pela LR1. O Grupo II englobou as LR 6, 8, 11, 13, a 'Casca Dura Ikeda' e o UENF 1381. Os demais grupos foram formados por uma única linha recombinada, sendo o Grupo III pela LR 3; o Grupo IV pela LR 2; e, por fim, o Grupo 5, pela LR 5.

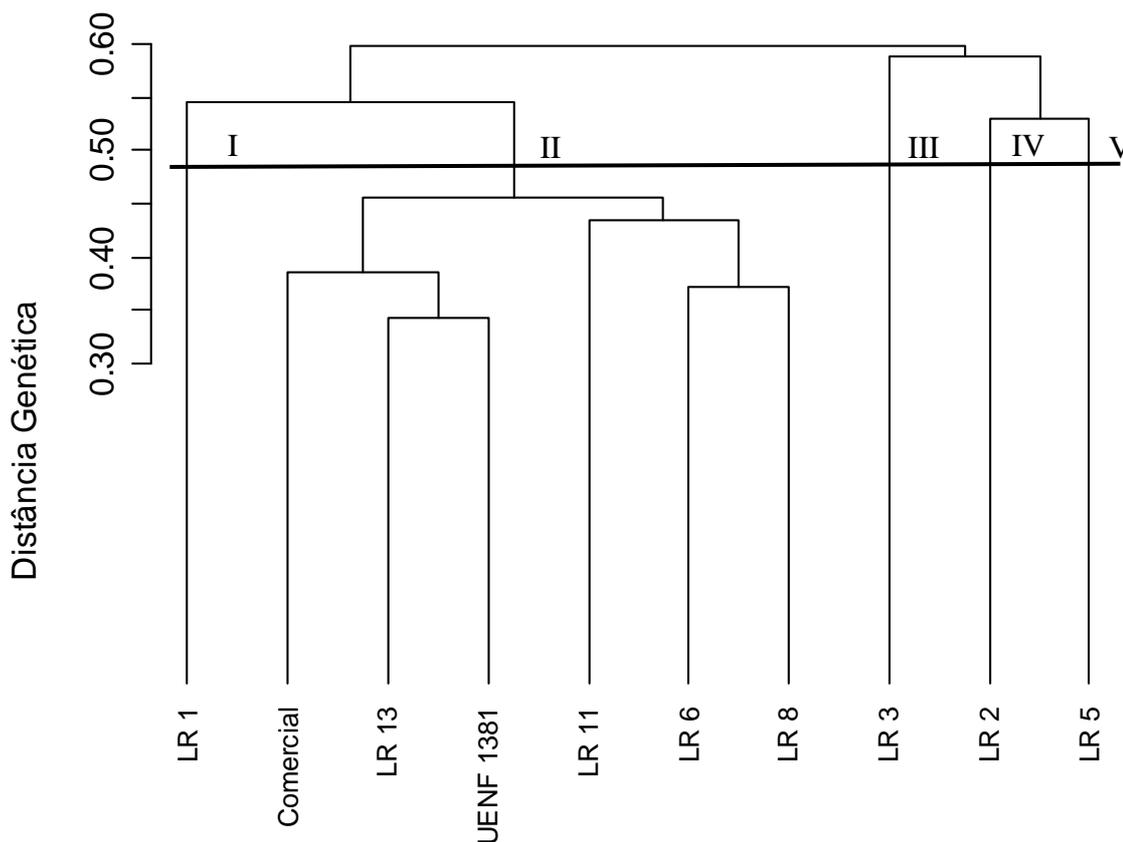


Figura 6. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base nos dados moleculares, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Coeficiente de correlação cofenética (CCC): 0,85. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

Esperava-se, com a análise molecular, diferenciar todas as linhas recombinadas, porém tal diferenciação não foi possível apenas com os iniciadores utilizados. Entretanto, a análise molecular permitiu a diferenciação das linhas 1, 2, 3 e 5, que formaram grupos independentes pelo agrupamento feito pelo método UPGMA. Na avaliação da diversidade genética da coleção de *Capsicum* feita por

Costa et al. (2009), somente com a associação dos dados morfoagronômicos e marcadores moleculares foi possível a completa distinção dos acessos avaliados, bem como para a exclusão da existência de duplicatas na coleção estudada. Giancola et al. (2001) observaram que a melhor técnica para diferenciar os genótipos de soja por eles estudados foi a combinação de marcadores SSR e descritores morfológicos. Os dados obtidos neste trabalho remetem à mesma conclusão, onde a análise molecular deve ser analisada de forma conjunta com outros descritores, de forma a garantir a adequada identificação da diversidade genética dos genótipos estudados.

O coeficiente de correlação cofenética foi alto (0,85), mostrando que o dendrograma reflete a matriz de dissimilaridade obtida pelo complemento aritmético de Jaccard, refletindo a consistência do agrupamento (Sokal e Rohlf, 1962).

No agrupamento pelo método de Tocher, também houve a formação de cinco grupos, entretanto, com algumas alterações. As diferenças estão no Grupo I, que foi formado pelas LR 1, 8 e 13, além da cultivar Casca Dura Ikeda e do genitor UENF 1381 e no Grupo II, que foi formado pelas LR 6 e 11. As demais linhas (LR 2, 3 e 5) ficaram individualizadas. Assim, pode ser observada concordância no número de grupos, sendo três grupos idênticos.

4.4.4. Algoritmo de Gower

Com o algoritmo de Gower, foi possível fazer uma análise conjunta dos dados, alocando os acessos em um único dendrograma, utilizando-se diferentes tipos de variáveis. Com essa estratégia, foi observada a formação de três grupos distintos: o Grupo I foi formado pelas LR 2 e 3; o Grupo II pelas LR 1, 5 e pela cultivar Casca Dura Ikeda; e, o Grupo III pelas LR 6, 8, 11, 13 e o genitor UENF 1381 (Figura 7). Assim, a análise conjunta dos dados foi menos eficiente na distinção dos genótipos, quando comparado ao dendrograma formado por dados qualitativos ou moleculares, que formaram maior número de grupos, em alguns casos, dispondo linhagens em grupos isolados.

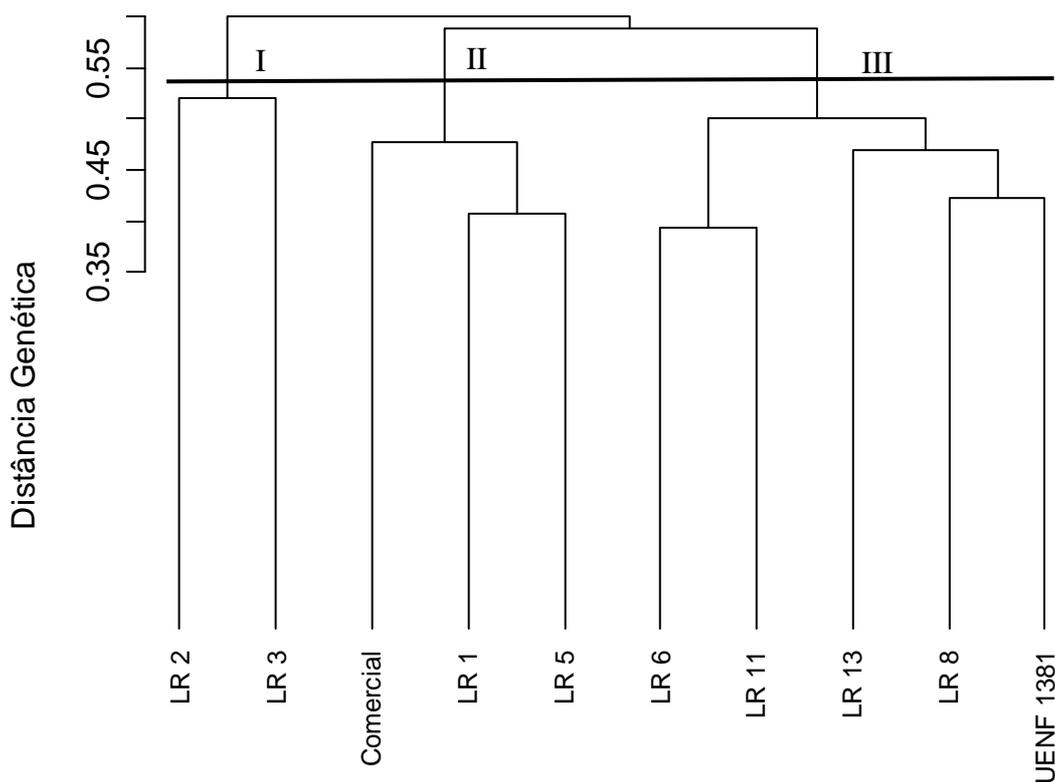


Figura 7. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido pelo método hierárquico de médias ponderadas (UPGMA), com base no algoritmo de Gower, a partir de caracteres quantitativos, qualitativos e moleculares, obtidos em oito linhas recombinadas, no genitor UENF 1381 e em uma cultivar comercial de *Capsicum annuum* L. Coeficiente de correlação cofenética (CCC): 0,8300. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011.

Segundo Rocha et al. (2010), o método de Gower foi eficiente na discriminação dos grupos de tomateiro, demonstrando que a análise simultânea de dados é viável e pode permitir maior eficiência no conhecimento da divergência entre acessos de bancos de germoplasma. Mohammadi e Prassana (2003) relatam que cada tipo de dado (morfológico, bioquímico ou molecular) tem suas próprias potencialidades e limitações, e não há uma estratégia única para tratar diferentes questões que envolvem a análise conjunta dos dados, como a escolha da medida de distância de dissimilaridade, do método de agrupamento e a determinação do número ideal de grupos. Segundo Gonçalves et al. (2009), a escolha das variáveis e o número de variáveis a serem usadas podem comprometer a eficiência da análise simultânea, principalmente no caso de se

utilizar um grande número de variáveis binárias, na quantificação da diversidade genética. Neste trabalho, foram utilizados dados provenientes de marcadores moleculares e qualitativos binários, o que pode ter contribuído para pouca diferenciação entre os genótipos.

Apesar de não ter a maior capacidade de distinção, o agrupamento obtido pela análise conjunta dos dados foi concordante com os demais dendrogramas. As LR 1 e 5 estão no mesmo grupo, nos dendrogramas formados pelos dados quantitativos e qualitativos, próximas à cultivar Casca Dura Ikeda. Usando o algoritmo de Gower, esses genótipos foram agrupados no Grupo II. Esses genótipos têm os três maiores comprimentos de frutos, como observado no teste de média (Tabela 3) e tiveram a mesma moda na avaliação qualitativa (Tabela 6). As LR 6 e 8 estão no mesmo grupo para os agrupamentos formados pelas variáveis quantitativas, moleculares e pela análise conjunta dos dados. Moura et al. (2010) relatam que, ao se fazer uso da análise simultânea, gera-se mais um dendrograma que, muitas vezes, não tem concordância com os outros agrupamentos gerados, causando equívocos nas interpretações e dificultando o trabalho dos melhoristas.

O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,83. Na concepção de Sokal & Rohlf (1962), valores de correlação cofenética superiores a 0,80 indicam bom ajuste entre as matrizes originais de distância e as derivadas das distâncias gráficas, o que ratifica a maior confiabilidade do agrupamento do método UPGMA.

As correlações entre a matriz de dissimilaridade obtida pelo algoritmo de Gower (conjunta) e as obtidas a partir de dados qualitativos e moleculares foram significativas a 1 % de probabilidade pelo teste de Mantel (1967) (Tabela 13). Assim, pode-se inferir que essas variáveis, principalmente por ser maior número quando comparadas às variáveis quantitativas, tiveram maior influência no agrupamento formado pela análise conjunta. As demais correlações não foram significativas, indicando que diferentes técnicas podem amostrar regiões diferentes do genoma e reforçando a necessidade da análise de divergência genética ser estimada por diferentes tipos de caracteres.

Tabela 13. Correlações entre as matrizes de dissimilaridade genética obtida por descritores quantitativos, qualitativos, molecular e pela análise conjunta dos dados pelo algoritmo de Gower. Campos dos Goytacazes, UENF, 2011

Matrizes	Quantitativo	Qualitativo	Molecular	Conjunta
Quantitativo	1			
Qualitativo	0.02	1		
Molecular	-0.25	-0.22	1	
Conjunta	0.20	0.55**	0,46**	1

**Significativo a 1% pelo teste de Mantel (1000 permutações).

Diferentemente deste trabalho, Gonçalves et al. (2008) obtiveram altos valores da correlação de Mantel entre as matrizes de variáveis discretas (qualitativa e moleculares) e contínuas (quantitativa). O mesmo foi verificado por Vieira et al. (2007), que em um estudo de 19 genótipos de trigo, utilizando dados de marcadores moleculares e morfológicos quantitativos, observaram correlação moderada a alta entre as matrizes da análise conjunta (marcadores moleculares e quantitativa) e as matrizes quantitativa e molecular.

A correlação baixa e negativa entre as matrizes de distâncias estimadas via marcadores moleculares e variáveis fenotípicas (qualitativas e quantitativas) pode ser explicada pelo fato da análise molecular fornecer uma amostra mais ampla do genoma, comparada à análise morfológica, abrangendo, assim, uma parte do genoma não sujeita à seleção natural ou artificial. Por outro lado, as características fenotípicas são sujeitas à seleção, e fortemente influenciada pelo ambiente. Além disso, não é sempre que dois fenótipos idênticos são determinados pelos mesmos genes, isto é, genes distintos podem levar a fenótipos semelhantes. Assim, é evidente que essas correlações são maiores quando há uma associação entre os locos que controlam características morfológicas (Vieira et al., 2007).

O agrupamento baseado no algoritmo de Gower teve menor número de grupos, quando comparado ao dendrograma formado por dados qualitativos ou moleculares. Entretanto, houve concordância nas distâncias genéticas entre os genótipos nos diferentes métodos estudados. A correlação de Mantel foi significativa entre a matriz de dados conjuntos e as matrizes de qualitativos e

moleculares, sendo, assim, possível a análise conjunta desses dados. As baixas correlações envolvendo a matriz de dados quantitativos, podem ser explicadas pelo baixo número de caracteres quantitativos estudados, quando comparado aos demais variáveis e pelo seu tipo de herança.

Apesar de, neste estudo, a análise conjunta de diferentes tipos de caracteres não ter tido a capacidade de distinguir as linhas recombinadas, essa técnica é uma ferramenta útil na caracterização e avaliação da distinguibilidade entre os genótipos a serem protegidos, principalmente quando diferenciação entre os acessos não for completa com a análise individualizada dos dados. Quando as diferentes metodologias de análise de divergência genética mostram resultados semelhantes, essa técnica auxilia, também, na interpretação dos dados, evidenciando que os cálculos da divergência genética, obtidos pelos diferentes procedimentos, levam a conclusões similares.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O gênero *Capsicum*, por sua elevada capacidade de geração de emprego e renda, posiciona-se dentro da agricultura brasileira como uma cultura de grande valor socioeconômico. A produção de *C. annuum* está sujeita a uma série de limitações, sendo a mancha-bacteriana uma das doenças mais destrutivas para a cultura. A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) possui um programa de melhoramento com o objetivo de se obter cultivares de *C. annuum* resistentes à mancha-bacteriana. Este trabalho teve como objetivo realizar ensaios preliminares de distinguibilidade e homogeneidade, seguindo as diretrizes do Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), caracterizando oito linhas endogâmicas recombinadas e diferenciando-as entre si e de cultivar comercial, por meio de caracteres quantitativos, multicategóricos, marcadores moleculares (ISSR), e resistência à mancha-bacteriana (RMB).

Foi instalado um experimento de campo para a avaliação dos descritores fenotípicos (quantitativos e qualitativos) com delineamento de blocos casualizados com três repetições. Outro experimento foi instalado em casa de vegetação, com delineamento inteiramente ao acaso com dez repetições para estudar a RMB e coletar amostras para análise molecular. Foram analisados seis variáveis quantitativas e 47 descritores multicategóricos em oito linhas recombinadas, o genitor UENF 1381 e a cultivar Casca Dura Ikeda. A avaliação da RMB foi realizada por meio de escala de notas (NOTA) e pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Para os dados quantitativos e para RMB, foi

realizada análise de variância para cada delineamento individualmente. As médias foram agrupadas pelo teste proposto por Scott Knott. A análise molecular foi realizada no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, e foram utilizados 15 pares de iniciadores. Foram obtidas matrizes de dissimilaridade para cada classe de características estudada (quantitativa, qualitativa e molecular), e, posteriormente, foi utilizado o algoritmo de Gower para reunir todos os dados em uma única análise. Para cada matriz obtida, foi realizado um agrupamento pelo método da ligação média entre grupo (UPGMA) e pelo método de Tocher. Foram analisados o coeficiente de correlação cofenético e a correlação de Mantel entre as matrizes de dissimilaridade.

Os dados obtidos permitiram concluir que as LRs testadas tiveram ampla variabilidade quanto à produção e o formato de frutos, o que permite associar alta produção, tipologia de fruto e RMB. Destacaram-se, entre as pimentas, as linhas 6 e 8, por apresentarem alto NTF, PMF de, aproximadamente, 7,5 g, frutos de formato cônico, características desejadas para o consumo *in natura* ou para conservas. As linhas LR 1, 2, 6 e 8 foram resistentes pelo dois métodos de avaliação. Assim, além da LR 6 e 8, as linhas 1 e 2 deverão ser mantidas na continuidade do programa de melhoramento da UENF por serem resistentes à mancha-bacteriana.

Dezoito descritores multicategóricos foram idênticos para todos os genótipos analisados, representando ausência de distinguibilidade entre os genótipos para tais caracteres. Há características capazes de distinguir as cultivares estudadas. Dentre os descritores com capacidade de distinção, estão: a pigmentação antociânica na altura dos nós; o comprimento da lâmina foliar; a pilosidade da folha; a profundidade da depressão peduncular do fruto; a intensidade da coloração dos frutos antes da maturação; a forma do ápice; o comprimento de fruto; o diâmetro do fruto; e a reação à mancha-bacteriana. Em 28 dos 47 descritores avaliados, foi observada a homogeneidade, como determina o SNPC, para todos os genótipos analisados. As linhas recombinadas 1 e 8 foram as mais homogêneas. As linhas 2, 5, 6 e a cultivar Casca Dura Ikeda tiveram o mesmo número de descritores heterogêneos.

Para os dados quantitativos, o dendrograma (UPGMA) formou dois grupos, sendo o Grupo I formado pela cultivar comercial, e o Grupo II formado por todos os outros genótipos. Esse dendrograma era esperado, uma vez que a 'Casca

Dura Ikeda' foi significativamente diferente dos demais genótipos testados para a maioria das variáveis. O coeficiente de correlação cofenético foi de 96 %. A formação dos grupos pelo método de Tocher foi semelhante ao agrupamento pelo UPGMA.

Para os dados qualitativos, o agrupamento pelo método hierárquico UPGMA formou quatro grupos. O valor do coeficiente de correlação cofenética foi de 0,8243. Foi observado que os descritores qualitativos multicategóricos permitiram uma melhor diferenciação entre as linhas estudadas em relação aos descritores quantitativos. Também para estes dados, a formação dos grupos pelo método Tocher foi idêntico ao UPGMA.

Foram observadas 82 bandas polimórficas e oito bandas monomórficas. O poder de resolução variou de 1,0 a 3,8, sendo considerados baixos. A análise do agrupamento pelo método UPGMA levou a formação de cinco grupos. A análise molecular permitiu a diferenciação das linhas 1, 2, 3 e 5, que ficaram isoladas em grupos. O coeficiente de correlação cofenética para esse agrupamento também foi alto (0,85). No agrupamento pelo método de Tocher, também há formação de cinco grupos, entretanto, com algumas alterações.

No agrupamento baseado no algoritmo de Gower, foi observada a formação de três grupos distintos: o Grupo I foi formado pelas LR 2 e 3; o Grupo II pelas LR 1, 5 e pela 'Casca Dura Ikeda'; e o Grupo III pelas LR 6, 8, 11, 13 e o genitor UENF 1381. Assim, a análise conjunta dos dados foi menos eficiente na distinção dos genótipos, quando comparada aos dados qualitativos ou moleculares. Apesar de não ter a maior capacidade de distinção, o agrupamento obtido pela análise conjunta dos dados foi concordante com os demais dendrogramas e com alto coeficiente de correlação cofenética (0,83). As correlações entre a matriz de dissimilaridade obtida pelo algoritmo de Gower (conjunta) e as obtidas a partir de dados qualitativos e moleculares foram significativas ($p > 0,01$) pelo teste de Mantel. As baixas correlações envolvendo a matriz de dados quantitativos podem ser explicadas pelo baixo número de caracteres quantitativos estudados, quando comparado aos demais variáveis e pelo seu tipo de herança.

Com este estudo, foi possível observar que as linhas recombinadas 1, 2, 6 e 8 foram resistentes à mancha-bacteriana. Além disso, as oito linhas endogâmicas recombinadas obtidas no programa de melhoramento da UENF possuem diferenças, entre si e da cultivar Casca Dura Ikeda, para variáveis

quantitativas, 29 descritores multicategóricos, e em nível molecular, sendo possível a dar a estas linhas a capacidade de distinção requerida no procedimento de proteção de cultivares. As LR 1, 2, 5, 6 e 8 foram as mais homogêneas, porém não no nível exigido pela SNPC.

Assim, para a continuidade do programa de melhoramento de *Capsicum* da UENF, deve-se proceder mais gerações de autofecundação para as linhas 1, 2, 6 e 8, que foram resistentes e à mancha-bacteriana e homogêneas, a fim de obter a homogeneidade para todos os descritores. Além disso, uma relação mais estreita com a equipe do SNPC, orientando a condução dos testes de DHE, será necessária, para que a realização dos trabalhos seja feita com a maior expertise possível, dando confiabilidade e certeza do cumprimento das exigências para a efetivação da proteção dos cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AgriTempo (2012) Sistema de monitoramento agrometeorológico. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/>, em 20 jan. 2012. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Aguiar, L.A., Kimura, O., Castilho, A.M.C., Castilho, K.S.C., Ribeiro, R.L.D., Akiba, F., Carmo, M.G.F. (2000) Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia*, 34:78-82.
- Allard, R.W. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. São Paulo: Edgard Blucher, 381p.
- Amaral Júnior, A.T., Thiébaud, J.T. L. (1999) *Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais*. Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, CCTA, 55p.
- Araujo, J.S.P., Gonçalves, K.S., Oliveira, B.C., Ribeiro, R.L.D., Polidoro, J.C. (2005) Efeito do acibenzolar-S-methyl sobre murcha-bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, 23(1):05-08.

- Aviani, D.M., Santos, F.S., Carvalho, I.M., Machado V.L.S., Pacheco, L.G.A., Carpi, V.A.F. (2008) Abordagem sobre registro e proteção de cultivares. *In: Faleiros, F.G, Farias Neto, A.L., Ribeiro Junior, W.Q. Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: uma abordagem estratégica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 152-168.*
- Becher, S.A., Steinmetz, K., Weising, K., Boury, S., Peltier, D., Renou, J.P., Kahl, G., Wolff, K. (2000) Microsatellites for cultivar identification in *Pelargonium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101:643-651.
- Bento, C.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R., Riva, E.M., Pereira, M.G. (2007) Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. *Scientia Agraria*, 8(2):149-157.
- 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*, 122:146-152.
- Blat, S.F., Costa, C.P., Vencovsky, R., Sala, F.C. (2005) Reação de acessos de pimentão e pimentas ao oídio (*Oidiopsis taurica*). *Horticultura Brasileira*, Brasília, 23(1):72-75.
- Blum, E., Liu, K., Mazourek, M., Yoo, E.Y., Jahn, M., Paran, I. (2002) Molecular mapping of the C locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome*, 45:702-705.
- Bnejdi, F., Saadoun, M., Allagui, M.B., El Gazzah, E. (2009) Epistasis and heritability of resistance to *Phytophthora nicotianae* in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 167:39-44.
- Bornet, B., Branchard, M. (2001) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19:209-215.

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, seção1.

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 (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proteção de Cultivares no Brasil. Brasília, DF: Mapa/ACS, 202 p.

Brasil (2012) *Lista de cultivares protegidas*. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/registros-autorizacoes/protECAO-cultivares/cultivares-protegidas>, em 13 jan. 2012. Página mantida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Cabral, P.D.S, Soares, T.C.B, Gonçalves, L.S.A., Amaral Junior, A.T., Lima, A.B.P., Rodrigues, R., Matta, F.P. (2010) Quantification of the diversity among common bean accessions using Ward-MLM strategy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(10):1124-1132.

Caixeta, E.T.; Oliveira, A.C.B.; Brito, G.G.; Sakiyama, N.S. (2006) Tipo de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E.T. (eds.) *Marcadores Moleculares*. Viçosa: UFV, p. 09-78.

Cargnelutti Filho, A. Guadagnin, J.P. (2011) Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de milho. *Ciência Rural*, 41(9):1503-1508.

Cargnelutti Filho, A., Ribeiro, N.D., Burin, C. (2010) Consistência do padrão de agrupamento de cultivares de feijão conforme medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(3):236-243.

- Carmo, M.G.F., Macagnan, D., Carvalho, A.O. (2001) Progresso da mancha bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não de oxiclreto de cobre. *Horticultura Brasileira*, 19(3):342-347.
- Carmo, M.G.F., Zerbini Júnior, F.M., Maffia, L.A. (2006) Principais doenças da cultura da pimenta. *Informe Agropecuário*, 27(235):87-98.
- Carraro, I.M. (2005) *A empresa de sementes no ambiente de proteção de cultivares no Brasil*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Pelotas – RS, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, 95f.
- Carvalho, H.H., Wiest, J.M., Cruz, F.T. (2010) Atividade antimicrobiana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxinfecantes alimentares. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(1):8-12.
- Carvalho, S.M.P., Salles-Filho, S.L., Paulino, S.R. (2007) Propriedade intelectual da P&D vegetal: evidências preliminares da implementação de Lei de Proteção de Cultivares. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 45(1):09-26.
- Carvalho, S.I.C., Bianchetti, L.B., Reifschneider, F.J.B. (2009) Registro e proteção de cultivares pelo setor público: a experiência do programa de melhoramento de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. *Horticultura Brasileira*, 27(2):135-138.
- Casali, V.W.D. (1997) O impacto da lei de propriedade industrial e de proteção de cultivares na olericultura brasileira. *Horticultura Brasileira*, 15:154-156 (suplemento).
- Castro, C.C. (2006) *A influência da incerteza no desenvolvimento de pesquisas com organismos geneticamente modificados no Brasil*. Tese (Doutorado em Agronegócios) – Porto Alegre – RS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, 252f.
- Coelho Netto, R.A., Pereira, B.G., Noda, H. & Boher, B. (2004) Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatologia Brasileira*: 29:021-027.

- Costa, C.S.R., Henz, G.P. (2007) Pimenta (*Capsicum* spp.) – Sistemas de plantio. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html, em 04 jan. 2012. Página mantida pela Embrapa Hortaliças.
- Costa, R.A., Rodrigues, R., Sudré, C.P. (2002) Resistência genética à mancha bacteriana em genótipos de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20(1):86-89.
- Costa, F.R., Pereira, T.N.S., Sudré, C.P., Rodrigues, R. (2009) Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões. *Ciência Rural*, 38:1-9.
- Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento de plantas*. v.2. Viçosa: UFV, 585p.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. UFV: Imprensa Universitária, 390 p.
- Cruz, C.D. (2006) Programa Genes: Análise multivariada e simulação. Editora UFV. Viçosa (MG). 175p.
- Cuppels, D.A., Louws, F.J., Ainsworth, T. (2006) Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Disease*, 90(4):451-458.
- De Masi, L., Siviero, P., Castaldo, D., Cautela, D., Esposito, C., Laratta, B. (2007) Agronomic, chemical and genetic profiles of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) *Molecular Molecular Nutrition & Food Research*, 51:1053-1062.
- De Polli, H. (1988) *Manual de Adubação para o Rio de Janeiro*. Seropédica: Ed. Universidade Rural.

- Derera, F. (2000) *Condiment Paprika: Breeding, Harvesting & Commercialisation*. 33p.
- Faria Junior, L.R., Bendini, J.N., Barreto, L.M.R. (2008) Eficiência polinizadora de *Apis mellifera* L. e polinização entomófila em pimentão variedade Cascadura Ikeda. *Bragantia*, 67(2):261-266.
- Filgueira, F.A.R. (2008) *Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Cultura e comercialização de hortaliças*. 3 ed. Viçosa: UPV, 421p.
- Geleta, L.F., Labuschangne, M.T. (2004) Comparative performance and heterosis in single, three-way and double cross pepper hybrids. *The Journal of Agricultural Science*, 142:659-663.
- Giancola, S., Poltri, S.M., Lacaze, P., Hopp, H.E. (2002) Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica*, 127:95-113.
- Glosier, B.R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G.S., Sisco, D.R., Prince, J.P. (2008) A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica*, 162:23-30.
- Gomes, R.L.F., Vello, N.A., Azevedo Filho, J.A. (2004) Genetic analysis of F6 and F6:7 soybean generations. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:35-42.
- Gomes, F.P., Garcia, C.H. (2002) *Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos*. Piracicaba-SP: FEALQ-USP, 309p.
- Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Karasawa, M., Sudré, C.P. (2008) Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. *Genetics and Molecular Research*, 7(4):1289-1297.

- Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R. Amaral Júnior, A.T., Karasawa, M., Sudré, C.P. (2009) Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. *Genetics and Molecular Research* 8 (1):364-374.
- Goulão, L., Oliveira, C.M. (2001) Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, 122:81-89.
- Gower, J.C. (1971) A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27(4):857-874.
- Hamza, A.A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Pruvost, O. (2010) Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease*, 94:993-999.
- Heiser, C.B., Pickersgill, B. (1969) Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon*, 18:277-283.
- IBPGR (1983) Genetic resources of *Capsicum*. Rome.
- Inoue-Nagata, A.K., Fonseca, M.E.N., Lobo, T.O.T.A., De Ávila, A.C., Monte, D.C. (2001) Analysis of the nucleotide sequence of the coat protein and 3'-untranslated region of two Brazilian *Potato virus Y* isolates. *Fitopatologia Brasileira*, 26:45-52.
- Inoue-Nagata, A.K., Fonseca, M.E.N., Resende, R.O., Boiteux, L.S., Monte, D.C., Dusi, A.N., De Ávila, A.C., Van der Vlugt, A.A.A. (2002) Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweetpepper, *Capsicum annuum*. *Archives of Virology*, 147: 849-855.
- Isla (2012) ISLA Sementes Ltda. *Pimentão 'Casca Dura Ikeda'*. Disponível em: http://www.isla.com.br/cgi-bin/detalhe.cgi?id=209&grupo_secao=&id_subgrupo=19&div=, em 06 jan. 2012.

- ISTA (2009) Associação internacional para testes em sementes – ISTA. .
Disponível em: www.seedtest.org, em 08 jan. 2009.
- Jones, J.B., Stall, R.E., Bouzar, H. (1998) Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 36:41-58.
- Jones, J.B., Bouzar, H., Stall, R.E., Almira, E.C., Roberts, P.D., Bowen, B.W., Sudberry, J., Strickler, P.M., Chun, J. (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1211-1219.
- 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*, 27:755-762.
- Kimura, O. (1984) Enfermidades bacterianas do pimentão. *Informe Agropecuário*, 10(113):39-41.
- Kopp, M.M., Souza, V.Q., Coimbra, J.L.M., Luz, V.K., Marini, N., Oliveira, A.C. (2007) Melhoria da correlação cofenética pela exclusão de unidades experimentais na construção de dendrogramas. *Revista da FZVA*, 14(2):46-53.
- Kumar, L.D., Kathirvel, M., Rao, G.V., Nagaraju, J. (2001) DNA profiling of diputed chilli sample (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR markers assay. *Forensic Science International*, 116: 63-68.
- Kurozawa, C., Pavan, M.A. (1997) Doenças das solanáceas (berinjela, jiló, pimentão e pimenta). In: Kimati, H., Amorim, L., Bergamim Filho, A.B., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. (eds.) *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo, 2:665-675, 3ed.

- Kwon, Y.S., Lee, J.M., Yi, G.B., Yi, S.I., Kim, K.M., Soh, E.H., Bae, K.M., Park, E.K., Song, I.H., Kim, B.D. (2005) Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Molecules and Cells*, 19(3):428-435.
- Lee, C.J., Yoo, E.Y., Shin, J.H., Lee, J., Hwang, H.S., Kim, B.D. (2005) Non-pungent *Capsicum* contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allow early detection of pungency with SCAR markers. *Molecules and Cells*, 19(2):262-267
- Lippert, L.F.; Bergh B.O.; Smith, P.G. (1965) Gene list for the pepper. *Journal of Heredity*, 56:30-34.
- Lopes, C.A., Ávila, A.C. (2002) Informações inadequadas sobre a resistência a doenças em catálogos de cultivares de hortaliças: um exemplo para tomate e pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 20(2):130-132.
- Marcuzzo, L.L., Becker, W.F., Fernandes, J.M.C. (2009a) Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. *Summa Phytopathologica*, 35(2):132-135.
- Marcuzzo, L.L., Fernandes, J.M.C, Becker, W.F. (2009b) Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. *Summa Phytopathologica*, 35(3): 229-230.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2):209-220.
- Maramba, F., Fininsa, C., Singh, H., Dessalegne, L., Andersson, A., Sigvald, R. (2010) Occurrence of aphid vector and genetic tolerance to infection by potyvirus in hot pepper. *Euphytica*, 172: 77-91.
- Marinho, C.D., Martins, F.J.O., Amaral, S.C.S., Amaral Junior, A.T., Gonçalves, L.S.A., Mello, M.P. (2011). Revisiting the Brazilian scenario of registry and

- protection of cultivars: an analysis of the period from 1998 to 2010, its dynamics and legal observations. *Genetics and Molecular Research*, 10(2):792-809.
- Matos, J.W., Ramalho, M.A.P., Abreu, A.F.B. (2007) Trinta e dois anos do programa de melhoramento genético do feijoeiro comum em Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(6):1749-1754.
- Mello, S.C.M., Lopes, C.A., Takatsu, A. (1996) Avaliação da virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ao tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 21(1):39-43.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M. (2006) Na SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Molecular Breeding*, 18:157-169.
- Miranda, J.E.C., Costa, C.P., Cruz, C.D. (1988) Correlações genotípica, fenotípica e de ambiente entre caracteres de fruto e planta de pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Revista Brasileira de Genética*, 11(2):457-467.
- Mohammadi, S.A., Prassana, B.M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43:1235-1248.
- Mongkolporn, O., Taylor, P.M.J. (2011) *Capsicum*. In: Kole, C. (ed.) *Wild crop relatives: genomic and breeding resources vegetables*. Berlin: Springer-Verlag, p. 43-57.
- Monteiro, E.R., Bastos, E.M., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Nunes, J. A.R. (2010). Diversidade genética entre acessos de espécies cultivadas de pimentas. *Ciência Rural*, 40(2):288-293.
- Moreira, G.R., Caliman, F.R.B., Silva, D.J.H., Ribeiro, C.S.C. (2006) Espécies e variedades de pimenta. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 27(235):16-29.

- Moreira, S.O. (2008) *Reação à mancha-bacteriana e desempenho agrônômico de linhas recombinadas de Capsicum annuum L.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 115f.
- Moreira, S.O., Rodrigues, R., Araújo, M.L., Sudré, C.P. Riva-Souza, E.M. (2009) Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de pimenta em dois sistemas de cultivo. *Ciência Rural*, 39(5):1387-1393.
- Moreira, S.O., Rodrigues, R., Araújo, M.L., Riva-Souza, E.M., Oliveira, R.L. (2010a) Desempenho agrônômico de linhas endogâmicas recombinadas de *Capsicum annuum* L. em sistema orgânico sob cultivo protegido. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(4):886-891.
- Moreira, S.O., Silva, M.G.M., Rodrigues, R., Viana, A.P., Pereira, M.G. (2010b) Breeding methods and history of bean cultivars released in CBAB - Crop Breeding and Applied Biotechnology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10(4):345-350.
- Moretti, C., Amatulli, M.T., Buonauro, R. (2009). PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Letters in Applied Microbiology*, 49:466–471
- Moscone, E.A., Escaladaferro, M.A., Gabrielle, M., Cecchini N.M., García, Y.S., Jarret, R., Daviña J.R., Ducasse, D.A., Barboza, G.E., Ehrendorfer, F. (2007) The evolution of the chili pepper (*Capsicum* – Solanaceae): a cytogenetic perspective. *Acta Horticulture*, 745:137-169.
- Moura, M.C.C.L., Gonçalves, L.S.A., Sudré, C.P., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Pereira, T.N.S. (2010). Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. *Horticultura Brasileira*, 28(2):155-161.

- Neitzke, R.S., Barbieri, R.L., Rodrigues, W.F., Corrêa, I.V., Carvalho, F.I.F. (2010). Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental. *Horticultura Brasileira*, 28: 47-53.
- Noda, H., Machado, F.M., Martins, A.L.U. (2003) Seleção de genótipos de pimentão resistentes à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. sob diferentes condições naturais de infecção. *Acta Amazônica*, 33(3):371-380.
- Passos, A.R., Silva, S.A., Cruz, P.J., Rocha, M.M., Cruz, E.M.O., Rocha, M.A.C., Bahia, H.F., Saldanha, R.B. (2007) Divergência genética em feijão-caupi. *Bragantia*, 66(4):579-586.
- Peixoto, J.R., Ramos, R.S., Farias Júnior, B., Silva, C.M., De Angelis, B. (1999) Avaliação de genótipos de pimentão no período de inverno em Araguari, MG. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(10):1865-1869.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrilo, S., Holst, I., Pearsall, D.M., Piperno, D.R., Berman, M.J., Cooke, R.G., Rademaker, K., Ranere, A.J., Raymond, J.S., Sandweiss, D.H., Scaramelli, F., Tarble, K., Zeidler, J.A. (2007) Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315:986-988.
- Pickersgill, B. (1997) Genetic resource and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96:129-133.
- Pinto, C.M.F., Puiatti, M., Caliman, F.R.B., Moreira, G.R., Mattos, R.N. (2006) Clima, época de semeadura, produção de mudas, plantio e espaçamento na cultura da pimenta. *Informe Agropecuário*, 27(235):40-49.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:107-112.

- Priolli, R.H.G., Mendes-Junior, C.T., Arantes, N.E., Contel, E.P.B. (2002) Characterization of brazilian soybean cultivars using microsatellites markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25(2):185-193.
- 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*, Brasília, 22(1):80-86.
- R Development Core Team. (2006) *A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: www.r-project.org, 13 de mar. de 2008.
- Ramalho, M.A.P., Ferreira, D.F., Oliveira, A.C. de (2005) *Experimentação em genética e melhoramento de plantas*. 2 ed. Lavras: UFLA, 322p.
- Reddy, M.P., Sarla, N., Siddiq, E.A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.
- Ribeiro, C.S. da C., Cruz, D.M.R. (2004) Pimentão: tendência de mercado. *Cultivar hortaliças e frutas*, Rio Grande do Sul, 14(3):16-19.
- Ribeiro, S.F.F., Carvalho, A.O., Cunha, M., Rodrigues, R., Cruz, V.M.M., Vasconcelos, I.M., Melo, E.J.T., Gomes, V.M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 50 (5): 600–611
- Riek, J. Calsyn, E., Everaert, I., Bockstaele, E.V., Loose, M.D (2001) AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 103:1254-1265.
- Riva, E.M., Rodrigues, R., Pereira, M.G., Sudré, C.P., Karasawa, M., Amaral Junior, A.T. (2004a) Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4(4):490-494.

- Riva, E.M., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Karasawa, M., Pereira, M.G. (2004b) Three recessive genes controlling bacterial spot resistance in pepper. *Anais do 17th International Pepper Conference*, Naples, USA., p.21.
- Riva, E.M. (2006) *Uso dos métodos genealógico e "single seed 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-Souza, E.M.; Rodrigues, R.; Sudré, C.P.; Viana, A.P.; Amaral Júnior, A.T. (2007) Obtaining pepper F_{2:3} lines with resistance to the bacterial spot using the pedigree method. *Horticultura Brasileira*, 25(4):561-565.
- Riva-Souza, E.M., Rodrigues, R., Sudré, C.P., Pereira, M.G., Bento, C.S., Matta, F.P. (2009) Genetic parameters and selection for resistance to bacterial spot in recombinant F₆ lines of *Capsicum annum*. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9:108-115.
- Robbins, M. D., Darrigues, A., Sim, S.-C., Masud, M. A. T., and Francis, D. M. (2009) Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. *Phytopathology*, 99:1037-1044.
- Rocha, M. C., Gonçalves, L.S.A., Corrêa, F.M., Rodrigues, R., Silva, S.L., Abboud, A.C.S., Carmo, M.G. F. (2009) Descritores quantitativos na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. *Ciência Rural*, 39(3):664-670.
- Rocha, M. C., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Silva, P.R.A., Carmo, M.G., Abboud, A.C.S. (2010). Uso do algoritmo de Gower na determinação da divergência genética entre acessos de tomateiro do grupo cereja. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3):423-431.

- Rodrigues Neto, J., Malavolta Júnior, 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
- Romero, A.M., Kousik, C.S., Ritchie, D.F. (2001) Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease*, 85:189-194.
- Ruanet, V.V., Kochieva, K.Z., Ryzhora, N.N. (2005) The use of a self-organizing feature map for the treatment of the results of RAPD and ISSR analyses in studies on the genomic polymorphism in the genus *Capsicum* L. *Russian Journal of Genetics*, 41(2):269-278.
- Rufino, J.L.S., Penteado, D.C.S. (2006) Importância econômica, perspectivas e potencialidades do mercado para a pimenta. *Informe Agropecuário*, 27(235):7-15.
- Sahin, F., Miller, S.A. (1996) Characterization of the Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 80:773-778.
- Sahin, F., Miller, S.A. (1998) Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Pepper Race 6. *Plant Disease*, 82:794-799.
- Santos, H.S., Goto, R. (2004) Enxertia em plantas de pimentão no controle de murcha de fitóftora em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, 22(1):45-49.
- Santos, M.M., Vieira-da-Motta, O., Vieira, I.J., Braz-Filho, R., Gonçalves, P.S., Maria, E.J., Terra, W.S., Rodrigues, R., Souza, C.L. (2011) Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. *Journal Natural Medicines*, 60:1-3.
- Schuster, I., Vieira, E.S.N., Padilha, L. (2006) Tipo de marcadores moleculares. In: Borém, A.; Caixeta, E.T. (eds.) *Marcadores moleculares*. Viçosa: UFV, p. 205-230.

- Scivittaro, W.B., Melo, A.M.T., Azevedo Filho, J.A., Carvalho, C.R.L., Ramos, M.T.B. (1999) Caracterização de híbridos de pimentão em cultivo protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 17(2):147-150.
- Scott, A.J., Knott, M. (1974) A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30(3):313-315
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., Tang, F., Chu, B. (2006) Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(3):420-422.
- Shimoya, A., Pereira, A.V., Ferreira, R.P., Cruz, C.D., Carneiro, P.C.S. (2002) Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. *Scientia Agricola*, 59(2):227-234.
- Silva, D.A.G., Rocha, M.C., Carvalho, A.O., Fernandes, M.C.A., Carmo, M.G.F (2006) Efeito de produtos químicos e biológicos sobre a mancha-bacteriana, flora microbiana no filoplano e produtividade de pimentão. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 24(2):134-140.
- Silva A.R., Cecon, P.R., Rêgo, E.R., Nascimento, M. (2011). Avaliação do coeficiente de variação experimental para caracteres de frutos de pimenteiras. *Revista Ceres*, 58(2):168-171.
- Silva-Lobo, V.L., Lopes, C.A., Giordano, L.B. (2005a) Componentes da resistência à mancha-bacteriana em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 30(4):343-349.
- Silva-Lobo, V.L., Lopes, C.A., Giordano, L.B. (2005b) Herança da resistência à mancha-bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 30(1):17-20.
- Singh, D. (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian Journal of Genetic and Plant Breeding*, 41(2):237-245.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon*, 11:30-40.
- Souza, J.A., Maluf, W.R. (2003) Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Scientia Agricola*, 60(1):105-113.
- Stewart Jr, C., Mazourek, M., Stellari, G.M., O'Connell, M., Jahn, M. (2007) Genetic control of pungency in *C. Chinense* via the *pun1* locus. *Journal of Experimental Botany*, 58(5):979-991.
- Sudré, C.P. (2003) *Divergência genética e avaliação de resistência à mancha bacteriana em acessos de Capsicum spp.* Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 112p.
- Sudré, C.P., Rodrigues, R., Karasawa, M., Amaral Júnior, A.T. (2005) Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas. *Horticultura Brasileira* 23(1): 22-27.
- Sudré, C.P., Leonardecz, E., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Moura, M.C.L., Gonçalves, L.S.A. (2007) Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science. *Horticultura Brasileira*, 25:496-503.
- Sudré, C.P., Gonçalves, L.S.A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Riva-Souza, E.M., Bento, C.S. (2010). Genetic variability in domesticated *Capsicum* spp as assessed by morphological and agronomic data in mixed statistical analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9(1):283-294.
- Thul S.T., Lal, R.K., Shasany A.K., Darokar, M.P., Gupta A.K., Gupta, M.M., Verma, R.K., Khanuja, S.P.S. (2009). Estimation of phenotypic divergence in a collection of *Capsicum* species for yield-related traits. *Euphytica*, 8:189–196.

- Todorov, J., Csilléry, G. (1990) Natural cross-pollination data from Bulgaria. *Capsicum and Eggplant Newsletter*,8:25.
- Torres, J.C., Ventura, J.A. (1991) AVACPD: um programa para calcular a área e o volume abaixo da curva de progresso da doença. *Fitopatologia Brasileira*, 16(2):207.
- UPOV (1991) União Internacional para a proteção de obtenções vegetais. *Act of 1991*. Disponível em: <http://www.upov.int/en/publications/conventions/1991/content.htm>, em 15 jan. 2012.
- UPOV (2009) União Internacional para a proteção de obtenções vegetais. Disponível em: www.upov.int, em 07 jan. 09.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Bacteriology*, 45(3):472-489.
- Vieira, E.S.N. (2004) *Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café*. Tese (Doutorado em Agronomia) – Lavras – MG – Universidade Federal de Lavras – UFLA, 137p.
- Vieira, E.A., Carvalho, F.I.F., Bertan, I., Kopp, M.M., Zimmer, P.D., Benin, G., Silva, J.A.G., Hartwig, I., Malone, G., Oliveira, A.C. (2007) Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2):392-399.
- Villas Boas, H.D.C. (2008) *A empresa pública de pesquisa e os marcos legais na indústria de sementes*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Pelotas – RS, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, 203f.
- Viñals, F.N., Ortega, R.G., Garcia, J.C. (1996) *El cultivo de pimientos, chiles y ajies*. Madrid: Mundi-Prensa, 607p.

Wagner, C.M. (2003) *Variabilidade e base genética da pungência e de caracteres do fruto: implicações no melhoramento numa população de Capsicum annuum L.* Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo - ESALQ-USP, 104f.

Wilkinson, J., Castoldi, P.G. (2000) *A transnacionalização da indústria de sementes no Brasil: biotecnologias, patentes e biodiversidade.* Rio de Janeiro, RJ: ActionAid Brasil, 141p.

APÉNDICE

Tabela 1A. Dados meteorológicos do período de execução do experimento. Campos dos Goytacazes, RJ, UENF, 2012

Mês	Temperatura Média (°C)		Precipitação total (mm)	Evapotranspiração (mm)
	Máxima	Mínima		
Abril	30,9	21,6	39,0	4,53
Maio	29,0	19,5	31,2	4,34
Junho	27,2	16,6	26,5	3,94
Julho	27,8	18,6	53,2	3,45
Agosto	29,5	17,1	7,2	5,28
Setembro	29,9	19,3	8,8	6,27
Outubro	29,2	20,4	99,8	5,92
Novembro	29,9	21,4	127,4	4,72
Dezembro	32,7	23,8	82,2	7,58

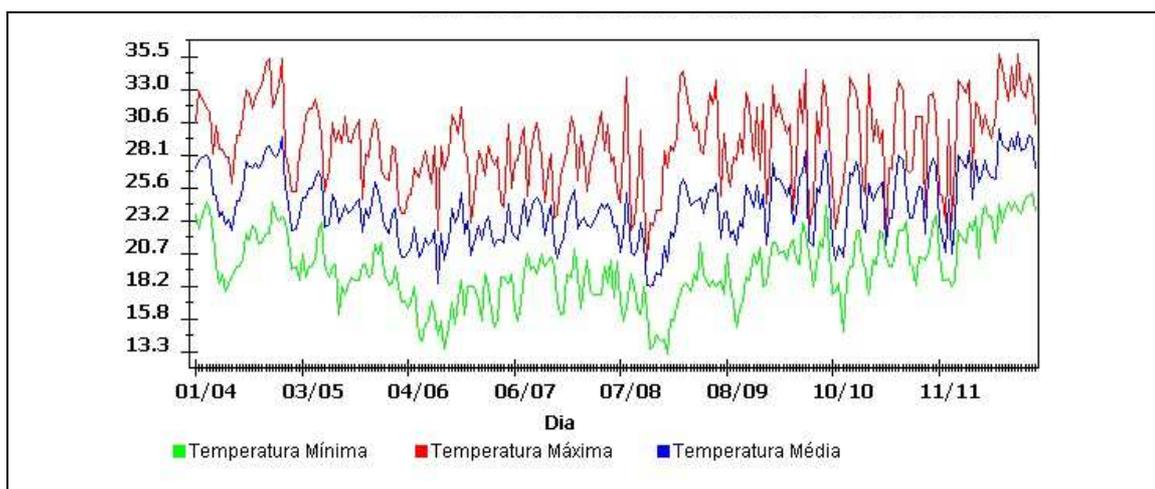


Figura 1A. Dados de temperatura mínima, máxima e média diária no período de abril a dezembro de 2010. Agritempo – MAPA (2012).

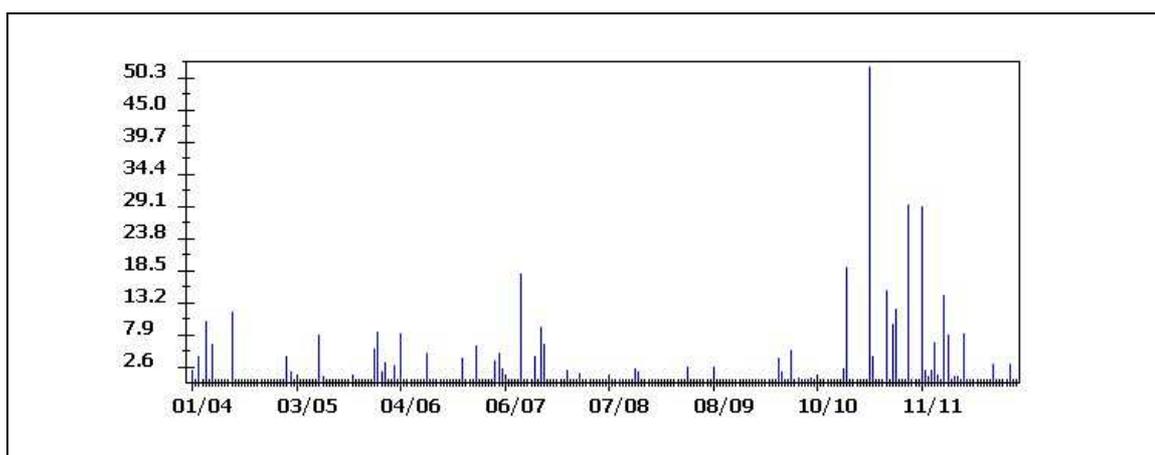


Figura 2A. Dados de precipitação diária no período de abril a dezembro de 2010. Agritempo (2012).

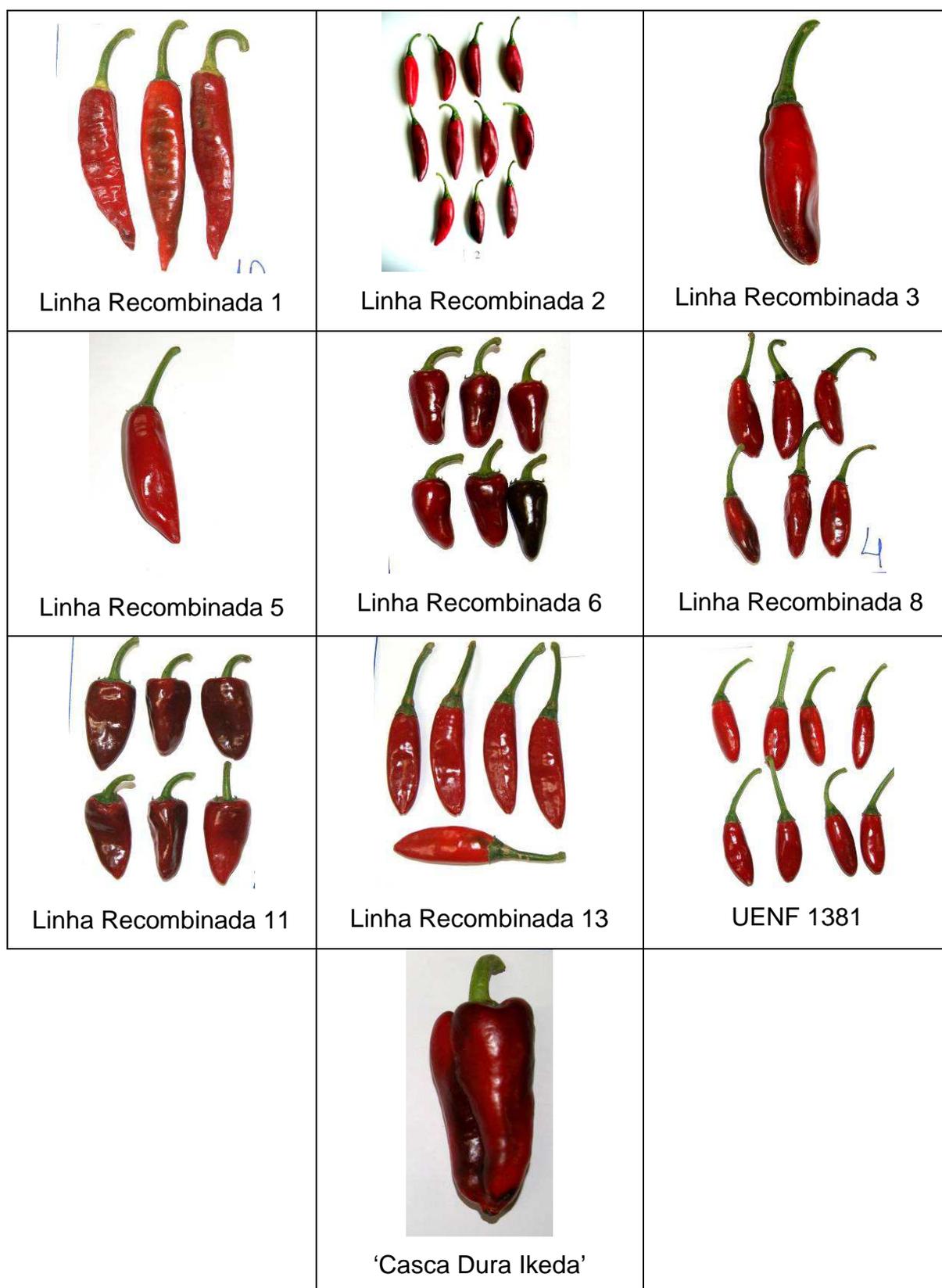


Figura 3A. Linhas recombinadas, genitor UENF 1381 e cultivar Casca Dura Ikeda, caracterizadas com base em descritores morfológicos, marcadores moleculares e resistência à mancha-bacteriana. Campos dos Goytacazes, RJ, UENF 2012.