

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

TIAGO SIGNORINI

**Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados
de isozimas**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO – 2012**

TIAGO SIGNORINI

Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Erasmo Renesto.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO – 2012**

À minha família, por estar ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta e por tantas oportunidades concedidas.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela estrutura física e humana oferecida para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM) e a todos os professores e colaboradores.

À Universidade Federal do Piauí pela doação do material biológico utilizado na pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão de bolsa de estudos.

Ao professor doutor Erasmo Renesto, pela valiosa orientação, pela amizade e pelo excelente bom humor.

Às professoras doutora Claudete Aparecida Mangolin, doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado e doutora Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki, pela Coorientação nos momentos de necessidade.

Às professoras doutora Eleniza de Victor Adamowiski, pelo incentivo no mestrado; doutora Jussara Ricardo de Oliveira, pelos ensinamentos e pela introdução na pesquisa científica; e doutora Suzi Monte da Cruz, por me apresentar ao mundo da biologia.

Aos colegas do Laboratório de Genética Animal, Laboratório de Citogenética de Peixes e do Laboratório de Cultura de Tecidos e Eletroforese Vegetal: Bruno, Carlos, Greicy, Henrique, Juliana, Katlin, Lígia, Rosinete, Sérgio, Simone e Tiara, pelo companheirismo no dia a dia e por todos os favores prestados.

À amiga Danielle das Neves Besspalhok, por sempre estar ao meu lado em quase todas as atividades do mestrado e pela amizade que perdurará até a eternidade.

Aos colegas Paulo e Eliane, pela ajuda com as plantas.

A todos os que não foram citados, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

TIAGO SIGNORINI, filho de Arcangelo Signorini e Salete Trevisan Signorini, nasceu no dia 21 de julho de 1987, na cidade de Juína, estado do Mato Grosso.

No ano de 1994, iniciou o Ensino Fundamental, no Instituto Educacional Portal do Saber, finalizando-o no Colégio Salesiano São Gonçalo, em Juína, Mato Grosso, no ano de 2001. Ainda no Colégio Salesiano São Gonçalo, no período compreendido entre 2002 a 2004, cursou o Ensino Médio.

Concluiu Licenciatura em Ciências Biológicas, no ano de 2009, na Universidade Paranaense, Campus de Umuarama. Participou de quatro projetos de Iniciação Científica ligados à Biologia Floral, Polinização e Produção Animal, além de outros projetos de ensino e extensão.

Em 2010, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, com a linha de pesquisa Variabilidade Genética de Populações Naturais, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Genética Vegetal.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O gênero <i>Capsicum</i>	4
2.2. Conservação de recursos genéticos de <i>Capsicum</i>	8
2.3. Melhoramento genético.....	12
2.4. Utilização de isoenzimas na família Solanaceae	13
2.5. Eletroforese de isoenzimas	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Produção das plantas	19
3.2. Extração das enzimas.....	21
3.3. Preparação do gel, aplicação das amostras e eletroforese	21
3.4. Análises das isoenzimas	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Caracterização das populações, espécies, acessos e número de indivíduos analisados em cada população (Pop-1 *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2 *C. chinense*; Pop-3 *C. baccatum* var. *pendulum*).....19
- Quadro 2 – Nome, número de Comissão de Enzima (nº. E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido.....22
- Quadro 3 – Estimativas de freqüências alélicas das populações de *Capsicum*. (Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*). Nº: número de indivíduos analisados.....25
- Quadro 4 – Heterozigosidade esperada e observada (H_e e H_o); percentagem de *loci* polimórficos (P) e número de alelos por *locus* (K). Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*). Entre parênteses está o desvio padrão de H_e e K.....27
- Quadro 5 - Estatísticas F de Sewall Wright para cada *locus* das três populações de *Capsicum* analisadas27
- Quadro 6 – Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1972), entre as três populações de *Capsicum*. Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*).....29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplos de frutos de *Capsicum* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí (BAGC) utilizados neste trabalho. Acessos: BAGC 11, BAGC 36, BAGC 59 e BAGC 67 caracterizam a Pop-1 *C. annuum* var. *glabriusculum*. Acessos: BAGC 06, BAGC 07, BAGC 23 e BAGC 24 caracterizam a Pop-2 *C. chinense*. Acesso: BAGC 26 caracteriza a Pop-3 *C. baccatum* var. *pendulum*.....20
- Figura 2 – Produção de mudas de *Capsicum*, bem como a formação das populações analisadas.....20
- Figura 3 – Zimograma dos cinco sistemas enzimáticos analisados em gel de amido, com seus respectivos alelos, presentes nas populações (P1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; P2: *C. chinense*; P3: *C. baccatum* var. *pendulum*).....23
- Figura 4 – Dendograma de UPGMA calculado a partir da distância genética de Nei (1978) entre as três populações de *Capsicum*. Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*.....29

RESUMO

SIGNORINI, Tiago. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2012. **Diversidade genética de espécies de *Capsicum* com base em dados de isozimas.** Professor Orientador: Erasmo Renesto. Professores Conselheiros: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

O gênero *Capsicum* compreende um rico gênero em aspectos morfológicos e genéticos. Estudos de diversidade genética ligada a este gênero são necessários para maior compreensão sobre as espécies, além de descobertas sobre novas informações em bancos de germoplasma de *Capsicum*. Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética de três espécies do *Capsicum* (9 acessos) oriundas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí – BAGC. Para isso, utilizou-se da técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de amido para a análise de cinco sistemas isoenzimáticos (ACP, GPI, IDH, MDH e PGM). Foram detectados sete *loci* enzimáticos e 13 alelos, sendo que cinco alelos foram exclusivos, três presentes na população de *C. annuum* var. *glabriusculum* (*Gpi(c)*, *Idh(a)* e *Acp(b)*) e os demais na população de *C. baccatum* var. *pendulum* (*Pgm-1(b)* e *Pgm-2(b)*). Todas as populações apresentaram *loci* polimórficos. O número médio de alelos por *locus* variou entre 1,4286 e 1. Os dados da estatística de Wright não foram compilados devido somente à presença de indivíduos homozigotos nas três populações analisadas. As identidades e as distâncias genéticas de Nei (1972) calculadas demonstraram uma diferenciação entre as espécies. O dendrograma de UPGMA construído demonstrou que as populações foram agrupadas em dois conjuntos: *C. annuum* var. *glabriusculum*+*C. chinense* e *C. baccatum* var. *pendulum*. Concluímos, portanto, que a diversidade genética dos acessos analisados é baixa e que os métodos utilizados nesta pesquisa são eficazes na diferenciação de espécies de *Capsicum*, comprovando assim a grande diversidade presente no gênero *Capsicum*.

Palavras-chave: aloenzimas, *Capsicum*, variabilidade genética.

ABSTRACT

SIGNORINI, Tiago, M. Sc., Universidade Estadual de Maringá, March 2012. **Genetic diversity of species of *Capsicum* based on allozymes data.** Adviser: Erasmo Renesto. Committee members: Claudete Aparecida Mangolin e Maria de Fátima Pires da Silva Machado.

The genus *Capsicum* comprises a rich genus in morphological and genetic aspects. Studies of genetic diversity about this kind of genus are necessary to a further understanding about species, besides discoveries about new information in *Capsicum* germplasm banks. The objective of this study aimed to analyze the genetic variability of three species of *Capsicum* (9 accesses) coming from the Active Germplasm Bank of the Federal University of Piauí - BAGC. We used the technique of isozyme electrophoresis in starch gel for the analysis of five isozyme systems (ACP, GPI, IDH, MDH and PGM). As a result seven enzymatic *loci* and 13 alleles were detected, considering that, five alleles were exclusives, three were in the *C. annuum* var. *glabriusculum* (*Gpi(c)*, *Idh(a)* and *Acp(b)*) sample, and the others were found in the *C. baccatum* var. *pendulum* (*Pgm-1(b)* and *Pgm-2(b)*) sample. All samples had polymorphic *loci*. The average number of alleles per *locus* varied between 1,4286 and 1. The statistical data of Wright was not compiled due to the presence of homozygotes in all three analyzed samples. The calculated identities and genetic distances of Nei (1972) showed a differentiation among the species. The constructed UPGMA dendrogram showed that the samples were grouped in to two sets: *C. annuum* var. *glabriusculum*+*C. chinense* and *C. baccatum* var. *pendulum*. Therefore we conclude that the genic diversity in the analyzes access is low and the methods used in this study are effective in differentiate species of *Capsicum*, proving the great diversity present in the genus *Capsicum*.

Key words: allozyme, *Capsicum*, genetic variability.

1. INTRODUÇÃO

As pimentas são todas as espécies e variedades do gênero *Capsicum* com frutos geralmente menores que os pimentões, com diferentes formatos, frequentemente de paladar pungente, embora haja pimentas doces (Carvalho et al., 2003). O gênero *Capsicum* pode ser associado à medicina tradicional humana, ao combate de enfermidades em criações domésticas. Entretanto, é mais fortemente relacionado a produtos condimentares, devido aos alcalóides (capsaicinóides) contidos em seus frutos. Além disso, as pimentas deste gênero também são excelentes fontes de β -caroteno, vitaminas A e C (Barbosa, et al., 2002). Em alguns casos, elas também são utilizadas como ornamentais, em razão da folhagem variegada, do porte anão e dos frutos com diferentes cores no processo de maturação (Carvalho et al., 2003).

As pimentas do gênero *Capsicum* são amplamente cultivadas pelo mundo, sendo utilizadas como matéria-prima para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Yamamoto e Nawata, 2005; Bento et al., 2007). As pimentas são especiais para a produção de condimentos, devido a características como cor dos frutos e princípios ativos, que lhes conferem aroma e sabor. Do ponto de vista social, o agronegócio de pimenta tem importância, principalmente, em função de requerer grande quantidade de mão-de-obra, em especial durante a colheita. Além disso, o mercado de pimenta abrange a comercialização de frutos para consumo *in natura* e conservas caseiras até a exportação da páprica, pó de pimentão ou pimenta doce madura vermelha. Os frutos de pimentas picantes podem ser desidratados e comercializados inteiros, em flocos (calabresa) e em pó (páprica picante) ou, ainda, em conservas e em molhos líquidos (Moreira et al., 2006).

As pimentas são de grande importância agrícola, utilizadas como constituintes de saladas e temperos. Países latino-americanos, como Peru e México, são reconhecidos pela utilização destes frutos em sua culinária tradicional (Tofanelli et al., 2003). Os frutos das pimentas picantes estão cada vez mais presentes na dieta dos países das regiões tropicais das Américas, da África e da Ásia. As pimentas doces são preferidas por consumidores das regiões temperadas, como a Europa e a América do Norte. *C. annuum* é provavelmente a mais cultivada das espécies do

gênero. Nesta espécie, incluem-se os pimentões e cultivares de pimentas, algumas das quais ornamentais (Pickersgill, 1997).

No mundo, de toda a área cultivada com pimentas, aproximadamente 89% estão no Continente Asiático, com as principais áreas de cultivo localizadas na Índia, Coréia, Tailândia, Vietnã, Srilanka e Indonésia. Os Estados Unidos e o México respondem por cerca de 7% do total mundial e, por último, 4% da área cultivada estão nos países da Europa. África e Oriente Médio (Rufino e Penteado, 2006).

O cultivo de pimenta no Brasil é de grande importância ressaltada Rufino e Penteado (2006), tanto pelas características de rentabilidade, principalmente quando o produto agrega valor ao produto, quanto pela importância social, por empregar elevada mão de obra. A produção vem crescendo muito nos últimos anos, com cultivos em regiões de clima subtropical, como no Sul, ou tropical, como no Norte e Nordeste. Os principais estados produtores são Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul. O cultivo de *Capsicum* ocorre praticamente em todas as regiões do Brasil e é um dos melhores exemplos de agricultura familiar e de integração de pequeno agricultor-indústria. Para que seja possível o crescimento deste agronegócio, é fundamental o aumento da produtividade agrícola, mediante o desenvolvimento de cultivares de diferentes tipos de pimenta com resistência a múltiplas doenças e com características agrônômicas e industriais de interesse (Ribeiro et al., 2003).

Na Amazônia brasileira, o cultivo de pimentas do gênero *Capsicum* é uma importante fonte alternativa de geração de divisas para as populações agrícolas da região (indígena e não-indígena), uma vez que o Brasil e, principalmente, a Amazônia, são um importante centro secundário de espécies domesticadas desse gênero. As pimentas são muito utilizadas, principalmente na alimentação das populações indígenas na “damorida”, um caldo à base de água, proteína animal e pimenta (Reifschneider, 2000).

Tem aumentado a demanda por novas cultivares que associem resistência às pragas e doenças, qualidade e produtividade, sobretudo para atender ao processamento industrial (Bento et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi o de analisar a variabilidade genética de três espécies do gênero *Capsicum*, oriundas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas,

para assim, propor, informações sobre as possíveis diferenças entre as espécies em nível gênico e fornecer subsídios para o melhoramento genético destas espécies.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O gênero *Capsicum*

A família Solanaceae apresenta cerca de 90 gêneros e aproximadamente 3000 espécies. São plantas cosmopolitas e amplamente distribuídas nas regiões tropicais e nas zonas temperadas (Barroso, 1991). Dentre os gêneros desta família alguns se destacam pelo uso na alimentação humana: *Solanum* (batata, jiló e berinjela), *Lycopersicum* (tomate), *Capsicum* (pimentas e pimentões) e *Cyphomandra* (tomate francês originário da América Central) (Joly, 1987).

Ainda não há um consenso quanto ao número de espécies classificadas de acordo com o nível de domesticação. Foram mencionadas 20 espécies (Carvalho et al., 2003), aproximadamente 25 espécies (Eshbaugh, 1993) e cerca de 33 espécies (Reiifschneider, 2000).

O gênero *Capsicum* é um dos mais importantes dessa família, apresentando cerca de 25 espécies, sendo apenas cinco cultivadas: *C. annuum* L., *C. baccatum*, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. e *C. pubescens*. Essas cinco espécies formam três Complexos de *Capsicum*: Complexo *C. annuum*, Complexo *C. baccatum*, e Complexo *C. pubescens*. Um complexo de espécies inclui aquelas que podem hibridizar, embora algumas vezes com dificuldades. O Complexo *C. annuum* inclui três espécies proximamente relacionadas: *C. annuum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, e constitui o complexo mais amplamente distribuído nas Américas e no mundo inteiro. O Complexo *C. baccatum* consiste em pelo menos três espécies, *C. baccatum*, *C. praetermissum* e *C. tovarii*. O Complexo *C. pubescens* contém: *C. pubescens* Ruiz & Pav., *C. cardenasii* Heiser & Smith e *C. eximium* Hunz (Pikergill, 1997; Tong e Bosland, 1999).

A espécie mais cultivada é *C. annuum* e inclui as variedades mais comuns do gênero, como pimentões, pimentas doces e algumas ornamentais. A espécie *C. baccatum* é representada pelas pimentas dedo-de-moça e chapéu-de-frade, são os tipos mais comuns e cultivados dessa espécie no Brasil. *C. chinense*, a mais brasileira das domesticadas, tem como tipos mais conhecidos a pimenta-de-cheiro, a pimenta-bode e a murici. *C. frutescens* inclui as famosas pimentas malaguetas, que são extremamente picantes (Reiifschneider, 2000).

No Brasil, somente *C. pubescens* não é produzida (Lins et al., 2001). A maioria dessas espécies tem como centro de origem países da América do Sul, com exceção de *C. annuum*, cuja origem é o México e a América Central. Todas as espécies cultivadas possuem espécies selvagens afins com as quais podem permutar genes. No Brasil, são encontradas algumas espécies selvagens, com destaque para três: *C. praetermissum*, *C. buforum*, *C. schottianum* (Casali e Couto, 1984).

A espécie *C. annuum* foi domesticada nas terras altas do México. Ela inclui a maioria das pimentas mexicanas, pimentas quentes da África e Ásia, e muitas das cultivares de pimentas doces crescidas em países temperados. No entanto, ela não está bem adaptada a planícies úmidas dos trópicos, onde, ao menos na América Latina, ela é substituída por *C. frutescens* e *C. chinense* (Pikergill, 1997).

A espécie *C. frutescens*, segundo Yamamoto e Nawata (2005), encontra-se distribuída por toda a América Central e planícies da América do Sul e também em outras regiões tropicais e subtropicais, tais como Ásia, África, e ilhas do Pacífico. *C. frutescens* é geralmente muito picante e tem um sabor característico que realça o gosto dos alimentos locais nos trópicos. *C. frutescens* apresenta as seguintes características: são plantas perenes e de maturação tardia; altura varia de 1,5-2,0 m; corola branco-esverdeada; anteras púrpura e azul, às vezes, amarelas; nós com um a três pedúnculos eretos; frutos imaturos variando de verde a branco amarelado; fruto maduro vermelho a laranja escuro; caules e folhas glabros a muitos pubescentes; folhas maleáveis e mais largas do que as de *C. annuum*; sementes cor creme a amarelo.

A espécie *C. chinense* foi originalmente encontrada na bacia do rio Amazonas, mas está comercialmente distribuída por todo o Sul e Norte do Brasil, devido a sua adaptabilidade a diferentes solos e climas e seu popular aroma crítico. Os frutos desta espécie apresentam uma enorme variabilidade em tamanho, forma e cor, com diferentes intensidades, indo desde o amarelo até o vermelho, quando maduros (Reiifschneider, 2000; Lannes et al., 2007). O centro de origem da espécie *C. chinense* é o mesmo de *C. frutescens*, sendo que a maior diversidade de *C. chinense* existe na Bacia Amazônica. Nesta espécie, são conhecidas as pimentas “de cheiro”, de “bode”, “murupi” e “olho de peixe”, sendo possivelmente a espécie cultivada mais importante da região andina e da América do Sul (IBPGR, 1983).

A espécie *C. baccatum* possui ampla distribuição geográfica, enquanto *C.*

baccatum var. *praetermissum* é exclusiva do Brasil, ou seja, é endêmica. A ocorrência de *C. baccatum* var. *pendulum* abrange o noroeste da América do Sul, incluindo Colômbia, Equador, Peru, e Bolívia, e sudoeste do Brasil. *C. baccatum* var. *baccatum* possui flores brancas com duas manchas esverdeadas na base, enquanto *C. baccatum* var. *praetermissum*, além das cores da outra variedade, apresenta uma característica faixa lilás-violeta na margem das pétalas (Reiifschneider, 2000). A espécie *C. baccatum* var. *pedulum* tem manchas amarelas e corola branca, anteras amarelas, caule ereto, uma flor por nó, fruto largo, alongado e persistente. O fruto maduro é laranja (Tong e Bosland, 1999).

Uma característica exclusiva do gênero *Capsicum* é a pungência atribuída à presença de capsaicinóides. Tais alcalóides acumulam-se na superfície da placenta e são liberados quando o fruto sofre qualquer dano físico (Carvalho et al., 2003). As diferentes espécies e variedades de pimentas podem ser discriminadas por características morfológicas dos frutos e, principalmente, das flores (Moreira et al., 2006). O gênero *Capsicum* tem sido separado de acordo com a cor de suas corolas em dois grandes grupos: branco e púrpura. As espécies domesticadas do gênero apresentam esses dois tipos de cor da corola, ao que se pode claramente diferenciar entre as espécies *C. baccatum* e *C. pubescens*: a primeira apresenta corola branca e anteras amarelas, já a segunda tem corola púrpura e anteras púrpuras ou violetas. A dificuldade se apresenta entre as espécies *C. annum*, *C. chinense* e *C. frutescens*, pois nas três a cor da corola varia de branco a amarelo esverdeado e as anteras de púrpura a violeta. O que diferencia, ao nível de chaves taxonômicas, é o número de flores por nó e a constrição do cálice (Guerra, 2001). Além dessas características, as principais espécies domesticadas do gênero podem ser identificadas pela posição da flor e do pedicelo, presença ou ausência de manchas nos lobos das pétalas e margem do cálice (Carvalho e Bianchetti, 2003).

Geralmente, as pimentas e pimentões são plantas autógamas, com flores hermafroditas e autocompatíveis, apresentando número diplóide de cromossomos $2n=2x=24$ (Kimber e Riley, 1963; Pickersgill 1991). De modo geral, Casali e Couto (1984) apontam que as pimentas apresentam flores hermafroditas e sistema reprodutivo do tipo autofecundação sendo, portanto, autocompatível. Entretanto, os níveis de polinização cruzada variam entre e dentro das espécies (0,5 a 70%), o que possibilita colocá-las no grupo intermediário entre alógamas e autógamas. Já Tanksley (1984b) afirma que esta taxa pode variar de 0% a 83%, sendo facilitada

por alterações morfológicas na flor, pela ação de insetos polinizadores, por práticas de cultivo entre outros fatores. Nas espécies domesticadas, o estigma encontra-se no mesmo nível das anteras aumentando a possibilidade de autopolinização, enquanto nas espécies selvagens o estigma está acima das anteras facilitando a fecundação cruzada (Casali e Couto, 1984). A autoincompatibilidade observada neste gênero está restrita apenas à algumas espécies ou exemplares centralizadas na Bolívia e áreas adjacentes e é do tipo gametofítica (Pickersgill, 1991). Considerando a existência de alogamia entre essas espécies, é possível que exemplos discrepantes, observados no processo de caracterização morfológica, sejam produtos do cruzamento entre diferentes espécies, pois apresentam a maior parte das características pertinentes a uma espécie, juntamente com características de outra (Carvalho et al., 2003).

Há entre as pimentas uma grande variabilidade, Inoue e Reifschneider (1989) descreveram 91 acessos na coleção do banco de germoplasma do CNPH (Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças), verificando grande diversidade entre as espécies estudadas. Dentre as espécies de *Capsicum*, a que possui maior diversidade é *C. annum* e a que possui menor variabilidade é *C. frutescens* (Casali e Couto, 1984).

O gênero *Capsicum* é amplamente cultivado em vários países do mundo e é uma das culturas que movimentam agricultura familiar em várias regiões do Brasil. No mundo inteiro, são plantados mais de 3.000.000 ha ao ano. No Brasil, a área de produção é estimada em 13.000 ha, com produção anual em torno de 280.000 t./ano. Pimentas deste gênero cultivadas em Roraima possuem uma enorme diversidade de formas, cor e nível de ardência. As pimentas malaguetas, murupi e olho-de-peixe são as usadas com maior intensidade e volume nas comunidades indígenas locais. Os plantios variam de 2.000 a 5.000 pés ha, sempre em unidades familiares. A produção é vendida no mercado local *in natura* ou na forma de molhos e, também, em pó. O agronegócio tem crescido muito entre feirantes, demonstrando ser atraente para produtores, vendedores e consumidores. A demanda de mercado é cada vez maior, o que impulsiona os novos plantios. Por serem muito cultivadas, as pimentas apresentam problemas sanitários dentre as quais existem doenças bacterianas, fúngicas, viróticas, entre outras. É necessário melhoramento genético dessas plantas visando a produção de novas variedades que apresentem resistência contra algumas dessas doenças (Farias Filho, 2006).

2.2. Conservação de recursos genéticos de *Capsicum*

A conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um dos tópicos mais proeminentes na atualidade. Com elevadas taxas de distribuição das comunidades naturais, a extinção de espécies é eminente, acarretando assim com perda de diversidade biológica (Farias Filho, 2006). Há muito tempo, a conservação dos recursos genéticos tem sido reconhecida como um componente essencial do melhoramento de plantas. As duas formas básicas para a conservação desses recursos, *in situ* e *ex situ*. Na conservação *in situ* a espécie é mantida em seu ambiente natural permitindo a continuidade dos processos evolutivos, quando a conservação *in situ* não pode ser implementada, recorre-se a conservação *ex situ*. Porém acredita-se que na conservação *ex situ* a variabilidade genética ainda está muito longe de contemplar uma amostra significativa da variabilidade da espécie (Witters e Willians, 1999).

Os recursos genéticos representam a matéria-prima para criar novas variedades mais produtivas, melhor adaptadas para as regiões de cultivo e mais resistentes às pragas e doenças de plantas economicamente importantes. Junto com os parentes silvestres, eles representam o repositório de variabilidade genética potencial para programa de melhoramento de espécies cultivadas (Almeida, et al., 2005) e por essa razão a conservação dos recursos genéticos é hoje considerada uma das questões mais importantes para a sobrevivência da humanidade e tem recebido a atenção dos governantes (Ramalho, et al., 2004).

Os recursos genéticos são componentes da biodiversidade, importantes ao desenvolvimento sustentável da agricultura e da agroindústria. Esses recursos são estratégicos para as pesquisas, principalmente em locais tidos como centro de biodiversidade de determinadas espécies. Os estudos de caracterização e avaliação de germoplasma são essenciais para o uso e a conservação dos recursos genéticos. De um modo geral, a caracterização pode ser morfológica, agrônômica, bioquímica, citogenética e molecular (Valois et al. 2001).

A conservação *ex situ* consiste em manter a biodiversidade fora do ambiente original ou natural (Nass et al., 2001) em estruturas denominadas bancos de germoplasma, entendendo-se como “germoplasma” a base física do cabedal genético que reúne o conjunto de materiais hereditários de uma espécie (Valois et al., 1996). As estratégias de conservação *ex situ* são atrativas para melhoristas e

instituições que desenvolvam trabalhos visando o melhoramento de plantas (Olorode, 2004). Então para que sejam desenvolvidas variedades com as quais se possam contar no futuro Marques et al., (2005) ressaltam que é necessário disponibilizar os recursos genéticos das plantas cultivadas para programas de melhoramento.

A manutenção de bancos de germoplasma em condições de campo pode causar muitas injúrias: a planta é exposta ao ataque de pragas e variação de clima, além de necessitar de grandes áreas e muita mão-de-obra. A manutenção de culturas *in vitro* vem se mostrando uma excelente ferramenta para a conservação dos recursos genéticos de plantas, uma vez que requer espaços menores, e pouca mão-de-obra. Entretanto, esse tipo de conservação é muito delicado sendo também vulnerável, o material pode facilmente ser perdido devido à contaminação microbiana, acidentes ou falhas nos equipamentos, além da variação somaclonal. A técnica de conservação *in vitro* que vem sendo cada vez mais utilizada é a criopreservação em nitrogênio líquido (-196° C), nessa temperatura, todos os processos metabólicos, como a respiração e a atividade enzimática, são inativados (Witters e Willians, 1999).

Os dados sobre divergência genética ao nível de coleção de germoplasma podem aumentar a eficiência de esforços de melhoramento para a cultura (Galeta et al., 2005). De acordo com Cruz (2001) esta divergência pode ser avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, dentre outras. As informações múltiplas de casa cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade que há no conjunto de acessos estudados.

O germoplasma de *Capsicum* pode ser preservado *ex situ*, ou seja, fora do ambiente de ocorrência natural, estando imediatamente mais acessível (Votava et al., 2002). De acordo com Lopes (2002) as coleções de *Capsicum* existentes no país necessitam de enriquecimento, caracterização genética e organização do dados.

Segundo Bianchetti et al. (2005), a coleta e manutenção de pimentas são de grande importância porque abrem espaço para um melhor conhecimento do potencial de adaptação e resistências deste gênero. Parte do germoplasma de *Capsicum* tem sido conservada em bancos de germoplasma pertencentes a diversas instituições tais como, a Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Centro Tecnológico da Zona da Mata (CTZM), a Empresa de Pesquisa Agropecuária de

Minas Gerais (EPAMIG) e a Embrapa Hortaliças. Entretanto, para que haja maior uso desses recursos é de fundamental importância o conhecimento e a organização dessa variabilidade genética (Moreira et al., 2006), pois infelizmente o germoplasma é coletado e depositado em bancos, sem um grande conhecimento da informação, acerca dos acessos individuais (Votava et al., 2002).

As relações evolutivas entre e dentro de populações e a variabilidade genética de pimentas têm sido investigadas em muitos estudos utilizando características morfoagronômicas (Rêgo, 2001; Matos, 2004), eletroforese de proteínas (Odeigah et al, 1999; Hernández-Verdugo et al., 2001) e via marcador molecular (Paran et al., 1998).

Muitos esforços têm sido efetuados por diversas instituições de pesquisas, como é o caso da Embrapa Clima Temperado que está integrada ao programa de melhoramento genético de pimenta, com atividades de seleção das raças locais de *C. baccatum*, em parceria com a Embrapa Hortaliças. As atividades são voltadas para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes às doenças, com melhor forma, cor e sabor para o comércio de frutos frescos e produção de pimentas desidratadas. Os genótipos em estudo são avaliados molecularmente para existência de diversidade genética por meio da análise utilizando marcador molecular RAPD. *C. baccatum* var. *pendulum* está sendo avaliada para o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, principalmente focalizadas em antracnoses, causadas por *Colletotrichum* spp. (Embrapa Clima Temperado, 2007).

Estudos de divergência genética são importantes para o conhecimento da variabilidade das populações e possibilitam o monitoramento de bancos de germoplasma, pois geram informações úteis para preservação e uso dos acessos e sua utilização no auxílio nos programas de melhoramento. Esses estudos auxiliam a identificação de possíveis duplicatas e fornecem parâmetros para escolha de progenitores que, ao serem cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie, ou seja, aumentam as chances de obtenção de genótipos superiores em gerações segregantes. Tais estimativas são de grande utilidade nos programas de melhoramento e também na escolha de progenitores para mapeamento de genes (Paran et al., 1998; Cruz e Carneiro, 2003).

A avaliação da variabilidade genética entre cultivares para fins de conservação de recursos genéticos é útil para saber se dois indivíduos com fenótipos semelhantes exibem uma combinação gênica similar (Lefbreve et al.,

2001). Os estudos de distância genética são de grande importância na diferenciação de populações e acessos de bancos de germoplasma, assim como na identificação de genitores adequados à obtenção de híbridos, com maior efeito heterótico e que proporcionem maior segregação em recombinações, possibilitando o aparecimento de transgressivos (Cruz e Carneiro, 2003). Dessa forma, o conhecimento da diversidade genética entre os acessos permite recomendações corretas de cultivo e uso (Cintra et al., 2005).

Os estudos de sistemática e variabilidade genética das pimentas e pimentões têm sido baseados, principalmente, em características morfológicas, cruzamentos interespecíficos e fertilidade dos híbridos interespecíficos (Rêgo, 2001; Rêgo et al., 2001; Rêgo et al., 2003). Pouco se sabe sobre as espécies silvestres brasileiras, sua variabilidade genética e relações filogenéticas com as espécies conhecidas de *Capsicum*. O conhecimento biológico deste germoplasma é importante para o entendimento do gênero em sua totalidade, bem como para o desenvolvimento de estratégias apropriadas de coleta e conservação de espécies. Adicionalmente, é provável que este germoplasma contenha genes de importância agrônômica como aqueles relacionados ao controle de resistência de doenças, produtividade e qualidade de fruto, de grande valor para o melhoramento genético vegetal.

Um pré-requisito para o uso eficiente dos recursos genéticos nos programas de melhoramento de plantas é o conhecimento detalhado da extensão e distribuição da variação genética disponível nas espécies cultivadas e seus parentes silvestres. A necessidade de ampliar a base genética dos programas de melhoramento das plantas cultivadas tem aumentado o interesse no estudo da estrutura genética de populações na filogenia e na mensuração da variabilidade genética de plantas silvestres (Nass et al., 2001).

Em recente revisão sobre as pimentas utilizados por diferentes comunidades do estado de Roraima, Barbosa et al. (2002) descreveram o uso e o cultivo das quatro espécies produzidas no Brasil. A caracterização morfológica de acessos de pimentas no estado de Roraima foi realizada por Matos (2004), que realizou um estudo caracterizando 69 acessos do banco de germoplasma da UFRR (Universidade Federal de Roraima). Em estudo realizado sobre a diversidade genética e importância de caracteres de pimenta por Matos et al. (2003) e Portela et al. (2003), as características que menos contribuíram com a divergência genética

observada foram o comprimento do pedúnculo e o menor diâmetro do fruto e as que mais contribuíram foram o maior diâmetro do fruto e o peso médio do fruto.

2.3. Melhoramento genético

Segundo Luz et al. (2006), os povos indígenas das Américas foram os primeiros a selecionar variedades de pimentas, a partir de ancestrais silvestres. O conhecimento sobre esta cultura sempre esteve presente na dieta dos silvícolas americanos e, logo, adquiriu uma grande relevância na culinária asiática com o passar do tempo.

No Brasil, apesar do uso comum, algumas espécies de *Capsicum* são desconhecidas ou ainda não caracterizadas morfológica e agronomicamente (Luz, 2007). Bianchetti (1996) coloca que estas espécies representam um material genético que pode potencialmente ser empregado em programas de melhoramento.

O melhoramento das pimentas é similar àquele utilizado em outras solanáceas. A espécie pode ser cruzada facilmente. A busca de variedades resistente a doenças, principalmente viroses, tem sido o alvo preferencial dos melhoristas de *Capsicum*. Maior ênfase tem sido dada aos tipos “doce” em comparação aos pungentes. Híbridos F₁, plantas haplóides e poliplóides e, inclusive, plantas apresentando macho-esterilidade citoplasmática, são ferramentas reais ou potenciais à disposição dos melhoristas de pimenta. A base genética do gênero *Capsicum* não é tão estreita como em muitas outras culturas e um grande número de variedades tropicais ainda não foi explorada (Heiser, 1979).

O melhoramento de espécies de pimentas tem sido realizado por meio de seleção massal, por meio da seleção inconsciente, na qual as plantas mais adaptadas a uma determinada região geográfica são selecionadas para a obtenção de sementes. Hoje em dia, os programas de melhoramento dessas espécies vêm introduzindo o uso da biotecnologia, a qual objetiva a obtenção de variedades mais produtivas e mais resistentes a doenças e pragas (Bosland e Votava, 2000).

Embora haja um forte apelo para o melhoramento visando à resistência a viroses e outras doenças, um considerável interesse tem sido expresso na busca de novas cultivares, tendo os frutos como foco principal (tamanho, forma, teor de capsaicina, cor, firmeza, teor de vitaminas, uniformidade na maturação), além da adaptação da planta para a colheita mecânica (Luz, 2007).

Reifschneider (2000) conclui que o melhoramento de pimentas no Brasil nunca atingiu a relevância atribuída à outra espécie do gênero *Capsicum*, o pimentão. A cultivar Agrônômico 11, tipo “Americana”, e a cultivar Ubatuba, tipo “Cambuci”, seriam exceções, por serem resultados de um programa de melhoramento desenvolvido pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC). Outro exemplo é um programa na Embrapa Hortaliças que teve como foco o desenvolvimento de cultivares de pimenta picante, do tipo “Jalapeño”, para o processamento industrial.

2.4. Utilização de isoenzimas na família Solanaceae

O Brasil é considerado o centro de variabilidade secundária de *Capsicum*, apresentando várias espécies desconhecidas ou ainda não utilizadas e/ou caracterizadas (Bianchetti, 1996), que potencialmente podem ser empregadas em programas de melhoramento e, devido a isso, existe a expectativa de que muitas espécies a serem descritas possuam genes úteis que possam conferir adaptação a diferentes ambientes e/ou resistência a doenças, além de outras características de interesse econômico (Ramos et al., 2000).

Os padrões isoenzimáticos estabelecidos têm revelado um grande número de marcadores genéticos, os quais têm sido utilizados com sucesso na identificação e caracterização de cultivares em plantas (Souza e Contel, 2001). O polimorfismo para isoenzimas esterases tem sido descrito em inúmeros trabalhos e caracterizado como um dos sistemas mais polimórficos (Orasmo e Machado, 2003; Oliveira-Collet et al., 2005; Orasmo, 2006).

Comumente, muitas enzimas existem em múltiplas formas moleculares, mas apresentando a mesma especificidade. Desde a sua resolução pelos métodos histoquímicos (Hunter e Markert, 1957), após a introdução da eletroforese em gel de amido, as isoenzimas têm sido extremamente importantes para a pesquisa na área biológica. Houve uma virtual explosão de investigações que se utilizaram da eletroforese nos mais variados tipos de organismos. Como cita Lewontin (1991), até 1984, experimentos com eletroforese em mais de 1100 espécies foram realizados com o objetivo de detectar variação intra-específica. Em plantas, as isoenzimas têm sido utilizadas principalmente em genética de populações, evolução e caracterização

de germoplasma (Gottlieb, 1981; Tanksley e Orton, 1983; Pasteur et al., 1988; Soltis e Soltis, 1989; Hillis e Mortiz, 1990).

Além da caracterização da diversidade genética de populações naturais e genéticos cultivados, as isoenzimas têm sido utilizadas com bastante frequência em outros estudos. Ligação entre sistemas isoenzimáticos ou destes com outros *loci* tem aumentado a resolução de mapas genéticos em várias espécies, tais como em *C. annuum* (Tanksley, 1984a).

Onus e Pickersgill (2000), analisando isoenzimas de acessos de *C. baccatum*, *C. eximium*, *C. cardenasii* e dois híbridos interespecíficos (*C. baccatum* X *C. eximium* e *C. baccatum* X *C. cardenasii*), observaram que *C. baccatum* pode ser identificado por padrões de isoenzimas dos sistemas ACO, GOT, PGI e SKDH, embora não tenha sido possível distinguir *C. eximium* de *C. cardenasii*, podendo ser discriminados por meio de descritores morfológicos.

Schuelter et al. (1999), analisando o polimorfismo da enzima malato desidrogenase (MDH) em pimenta-silvestre (*C. flexuosum* Sendt.), descreveram a ocorrência de sete perfis eletroforéticos, sendo que cinco *loci* gênicos foram possíveis de detectar, dos quais um monomórfico e quatro polimórficos. Dentre os *loci* polimórficos, um revelou estrutura quaternária monomérica e outro com estrutura dimérica. Porém, para um quarto *locus*, não foi possível definir a estrutura quaternária, sendo provável que mais de um gene estejam controlando a expressão deste *locus*.

Em pesquisas com batatas (*Solanum tuberosum* L.), Fazolo (2008), propôs determinar a qualidade de processamento em clones diplóides visando a futuros cruzamentos interespecíficos e a identificar o estágio mais adequado para a análise isoenzimática, observando a existência de associação das enzimas Peroxidase (PRX) e Glutamato Oxaloacetato (GOT) com características de qualidade industrial para o processamento. Os clones diplóides apresentaram boas características para o processamento e o estágio mais adequado para a análise isoenzimática foi o de plena floração. Para as características de qualidade, tanto a PRX quanto a GOT não apresentaram indicações de associação com a massa seca, coloração dos chips (alimento processado) e açúcares redutores.

Ruschel et al. (2008) trabalharam com diversidade genética em populações antropizadas de fumo brabo (*Solanum mauritianum*) e estabeleceram padrões isoenzimáticos para doze enzimas (GOT, DIA, EST, FEST PGM, PGI, IDH, MDH,

EM, PRX, 6PGDH, SKDH), gerando 18 *loci* passíveis de identificação, sendo 72,2% dos *loci* polimórficos, média de 2,72 alelos por *locus* e heteroziguidade observada média de 0,265.

2.5. Eletroforese de isoenzimas

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico. A eletroforese pode ser desenvolvida em suportes como papel-filtro, sílica-gel, membranas de acetato de celulose e géis de agarose, de amido ou de poliacrilamida. O suporte deve ser química e fisicamente inerte de modo a não interferir na mobilidade das moléculas (Sargent e George, 1975).

A eletroforese visa à separação de moléculas em função de suas cargas elétricas, de seus pesos moleculares e de suas conformações, em suportes porosos e tampões apropriados, sob influência de um campo elétrico contínuo. Eletroforese representa, portanto, a migração de íons submetidos à corrente elétrica. Seu princípio é simples: moléculas com carga negativa migram para o pólo positivo e moléculas de carga positiva migram para o pólo negativo. A evidenciação de proteínas e ácidos nucleicos pela eletroforese é precisa e valiosa para estudos taxonômicos, filogenéticos, fisiológicos e genéticos em plantas, animais, microrganismos e partículas virais (Alfenas, 2006).

Por meio da técnica de eletroforese, podemos supor quando ocorre substituição de um aminoácido numa molécula de proteína a qual é detectada por razão da alteração de sua carga elétrica ou mudanças na sua formação, que altera a sua taxa de migração. Algumas das mutações em regiões do DNA, que codifica uma determinada enzima, poderão expressar-se como moléculas de enzima, deferindo em sua mobilidade eletroforética (Shields et al., 1983; Thorpe e Solé-Cava, 1994). Pode ocorrer também a subestimativa da variabilidade genética, uma vez que nem toda mutação do DNA altera a estrutura protéica correspondente e nem toda a substituição de aminoácidos altera a mobilidade eletroforética da enzima (Torres et al., 2004).

Smith (1976) afirma que a técnica da eletroforese pode ser conduzida ora sob voltagem, ora sob amperagem (corrente) ou, então, wattagem (potência) constantes reguladas pela fonte elétrica. À medida que as moléculas migram no

campo elétrico, a resistência geralmente aumenta. Então, a amperagem diminui sob voltagem constante, ou esta aumenta sob amperagem constante. As variações na intensidade da corrente ou na voltagem podem ser detectadas na fonte de energia, anotando-se os respectivos valores no início e final da corrida eletroforética. A escolha da voltagem, amperagem ou wattagem é feita empiricamente.

A temperatura elevada tende a desnaturar as proteínas, o que acarreta, não raramente, alguma perda de atividade enzimática. Quando mais alta a voltagem ou intensidade da corrente, maior será também o calor emanado. Visando a manter a temperatura baixa durante a eletroforese, o gel é resfriado com auxílio de uma coluna de água fria em dispositivo apropriado inserido na cuba ou efetuando-se a corrida em geladeira (Alfenas, 2006).

O termo isoenzima, também encontrado na literatura como isozima, foi introduzido por Markert e Moller em 1959 para designar formas moleculares múltiplas de enzimas que ocorrem em um mesmo organismo e em membros da mesma espécie (Markert, 1975). Os organismos geralmente sintetizam formas moleculares múltiplas de enzimas com a mesma especificidade enzimática (Borém e Caixeta, 2009). Existem vários métodos bioquímicos que detectam, isolam e distinguem as isoenzimas: cromatografia, filtração gélida, eletroforese e outros. Entretanto, a eletroforese é a mais eficiente técnica analítica disponível para separar isoenzimas, seja pelas contínuas pesquisas e inovações da área, seja pela simplificação dos equipamentos utilizados (Pierce e Brewbaker, 1973; Brown, 1978).

As isoenzimas, denominadas marcadores bioquímicos, começaram a ser utilizados como marcadores genéticos a partir de meados da década de 60. A literatura sobre estudo de isoenzimas em plantas é muito extensa, o que mostra sua utilidade em diversas investigações, como: caracterização da variabilidade genética de populações naturais e de espécies cultivadas, estudos de evolução e dispersão de espécies e análises filogenéticas. A grande maioria dos sistemas enzimáticos já revelados em géis de amido ou poliacrilamida apresenta, geralmente, mais de uma enzima. Como consequência, muitos sistemas isoenzimáticos são potencialmente informativos. A propriedade mais expressiva das isoenzimas como marcadores genéticos é a herança mendeliana simples, com co-dominância entre alelos, na maioria dos *loci*. As outras vantagens são as seguintes: é uma técnica relativamente barata e operacionalmente acessível; a determinação genotípica dos *loci* pode ser feita em qualquer parte do planeta; mesmo em número limitado, vários *loci*

isoenzimáticos podem ser analisados simultaneamente em géis de amido; e não são detectados efeitos deletérios, epistáticos ou pleiotrópicos associados aos alelos isoenzimáticos (Borém e Caixeta, 2009).

As isoenzimas são controladas geneticamente por um ou vários genes, situados em um mesmo *locus* ou *loci* diferentes (Scandalios, 1969; Markert, 1975). Quando elas representam a expressão fenotípica de alelos situados em um mesmo *locus*, são denominadas alozimas (Conkle et al., 1982). As isoenzimas podem ser produtos de diferentes sítios genéticos ou resultar de alterações secundárias na estrutura de espécie polipeptídicas únicas. As isoenzimas podem ser geradas, ainda, pela duplicação do gene, com mutações subseqüentes nos *loci*. Assim, mais de um gene contribui para a estrutura de alguma enzima composta por mais de um tipo de subunidade. Formas múltiplas de enzimas podem surgir, também, pela ação de agentes, físicos ou químicos, não-genéticos (Scandalios, 1975).

A eletroforese de isoenzimas fornece um meio de avaliação da variação genética. O resultado da presença de mais de um gene, codificado para cada uma das enzimas, indica que são controlados geneticamente por um ou vários genes, situados num mesmo *locus* ou diferentes *loci*, respectivamente (Alfenas, 1998).

A técnica de eletroforese de isoenzimas é uma ferramenta que pode ser utilizada não só como método para estimar os níveis de variabilidade genética, mas também para identificar o fluxo gênico em populações naturais, no estudo da dispersão de espécies, na análise de filogenias e hibridização natural, bem como no melhoramento genético de espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Alfenas, 2006).

As freqüências gênicas e genotípicas que podem ser obtidas a partir da eletroforese de enzimas para indivíduos tomados ao acaso nas populações naturais podem ser transformadas em uma série de índices que permitem estimar o nível de similaridade ou distância genética entre diferentes espécies e populações (Solferini e Selivon, 2001).

Para medir a variabilidade genética de uma população, dois parâmetros são bastante utilizados. O primeiro é a heterozigosidade observada (H_o), que é a porcentagem de heterozigotos detectada para um determinado *locus* gênico. Outro é a heterozigosidade esperada (H_e) ou em equilíbrio, que é a proporção de heterozigotos que deveria haver se a população estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Solé-Cava, 2001).

A estatística F_{ST} de Wright é outro índice que reflete a proporção da variabilidade genética encontrada em populações, devido à subdivisão populacional. Segundo Wright (1978), valores de F_{ST} entre 0,15 e 0,25 indicam uma estrutura populacional moderadamente alta, enquanto valores acima de 0,25 refletem estruturação muito alta.

Deste modo, o papel das isoenzimas como marcadores genéticos possui valor indiscutível para as diversas áreas básicas de pesquisa genética. Logo, as isoenzimas apresentam um potencial enorme para serem utilizadas juntamente com marcadores moleculares monitorando o mapeamento de características quantitativas (Zawadzki et al., 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção das plantas

As três espécies de *Capsicum* envolvidas neste estudo pertencem à rica coleção (demonstrada na Figura 1) do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* (BAGC) de propriedade da Universidade Federal do Piauí e foram gentilmente cedidas à Universidade Estadual de Maringá a fins de pesquisas (Quadro 1).

Após a coleta das sementes nos frutos, as mesmas foram secas, naturalmente, identificadas e armazenadas por um período sob refrigeração, para uma melhor taxa de germinação das mesmas. As amostras de sementes foram semeadas em bandejas de isopor de 128 células cada, preenchidas com substrato comercial, sendo posto apenas uma semente por célula. Até esta etapa, as mudas foram mantidas em casa de vegetação e receberam água diariamente. Com cinquenta dias de semeadas as mudas foram transplantadas em vasos plásticos contendo terra comum e adubação orgânica.

Foram acondicionadas quatro plantas da mesma espécie por vaso, identificadas com o auxílio de placas de identificação. Nos vasos, as plantas foram expostas a ambiente natural e receberam água sempre que necessário, conforme demonstra a Figura 2

Quadro 1 – Caracterização das populações, espécies, acessos e número de indivíduos analisados em cada população (Pop-1 *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2 *C. chinense*; Pop-3 *C. baccatum* var. *pendulum*)

Populações	Espécie	Acessos	Indivíduos analisados
Pop-1	<i>C. annuum</i> var.	BAGC 11, BAGC 36,	48
	<i>glabriusculum</i>	BAGC 59, BAGC 67	
Pop-2	<i>C. chinense</i>	BAGC 06, BAGC 07,	48
		BAGC 23, BAGC 24	
Pop-3	<i>C. baccatum</i> var.	BAGC 26	20
	<i>pendulum</i>		

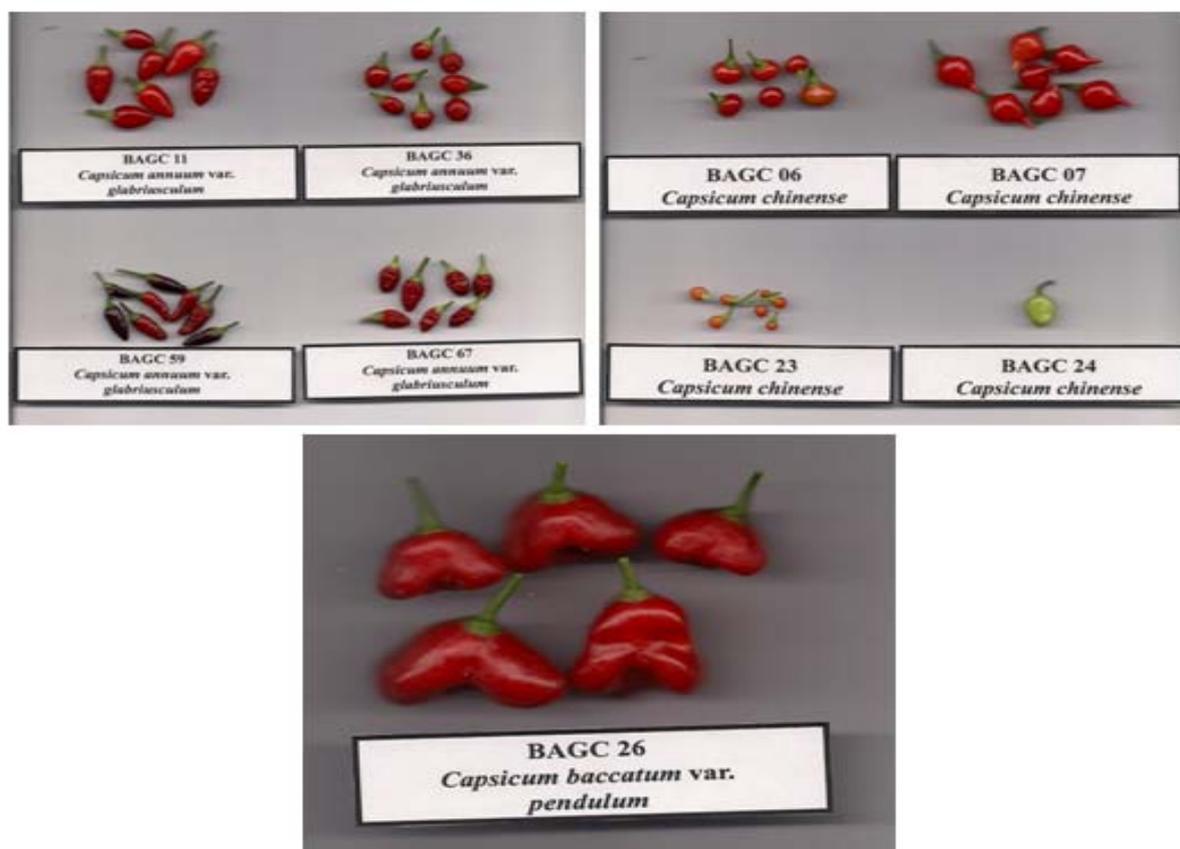


Figura – 1 - Exemplos de frutos de *Capsicum* pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí (BAGC) utilizados neste trabalho. Acessos: BAGC 11, BAGC 36, BAGC 59 e BAGC 67 caracterizam a Pop-1 *C. annuum* var. *glabriusculum*. Acessos: BAGC 06, BAGC 07, BAGC 23 e BAGC 24 caracterizam a Pop-2 *C. chinense*. Acesso: BAGC 26 caracteriza a Pop-3 *C. baccatum* var. *pendulum*.



Figura – 2 Produção de mudas de *Capsicum*, bem como a formação das populações analisadas.

3.2. Extração das enzimas

As amostras (folhas) foram acondicionadas em tubos Eppendorf (1,5ml) para a homogeneização. Foi utilizada uma solução de extração: Tampão Fosfato 1M; pH 7,0, PVP-40 5%, EDTA 1,0 mM, β -mercaptoetanol 0,5%. Foi acrescentado 60 μ L de solução de extração em cada tubo e, com o auxílio de um bastão de vidro, as amostras foram maceradas sob gelo. Os tubos foram centrifugados a 12.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

3.3. Preparação do gel, aplicação das amostras e eletroforese

Foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de amido horizontal em um sistema contínuo. Obteve-se a análise de cinco sistemas isoenzimáticos, utilizando-se de dois tampões: Tris Citrato (TC), pH 7,0: Tris 0,35 M, Ácido Cítrico 0,043 M; TEM, pH 7,4: Tris 0,1 M, Ácido Maleico 0,1 M, EDTA 0,01 M, Cloreto de Mg 0,01 M, na cuba de eletroforese e os mesmos tampões foram diluídos 15 vezes para a preparação dos géis (Quadro 2).

Preparou-se uma solução com amido de milho (Penetrose 50), água destilada e uma solução tampão. A solução foi aquecida até o ponto de fervura e, após, foi vertida em uma placa de vidro previamente aquecida com bordas de 0,6 cm. O gel foi resfriado por 24 horas para futura aplicação das amostras.

O extrato protéico (sobrenadante) separado pela centrifugação foi aplicado no gel com o auxílio de pequenas tiras de papel-filtro (4 mm x 8 mm) Whatman 3MM[®] embebidas com o sobrenadante. Em seguida, foi submetida à eletroforese sob refrigeração, durante 17 horas. A corrente elétrica medida nas extremidades dos géis foi de aproximadamente 30-40V, sendo 300V na fonte.

Após a corrida eletroforética, o gel foi cortado horizontalmente em fatias, as quais foram incubadas em soluções histoquímicas específicas e desejadas para cada sistema isoenzimático, seguindo protocolo de Murphy et al. (1996).

Posteriormente a um período de incubação do gel ao escuro, sob uma temperatura de 37°C, aguardou-se a visualização das bandas nos géis, sendo estes colocados em uma solução conservante: Metanol/água/Ácido Acético (5:5:1) por 24 horas e, em seguida, fotografados e analisados.

3.4. Análises das isoenzimas

Os cinco sistemas isoenzimáticos analisados em gel de amido estão descritos no Quadro 2. A nomenclatura das enzimas utilizadas foi proposta por Murphy et al. (1996). A interpretação genética foi baseada na estrutura quaternária das enzimas segundo Ward et al. (1992). As estimativas foram obtidas pelo programa Pop gene 3.1 (Yeh et al., 1997), tais como variabilidade genética estimada pelo cálculo da heterozigosidade (H_e e H_o), de acordo com Nei (1978), parâmetros estatísticos de fixação (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}), de Wright (1978), frequências alélicas, identidade (I) e distância genética (D), de Nei (1972). A partir da identidade e da distância genética, foi construído um dendrograma (método de agrupamento pelo algoritmo UPGMA – Unweighted Pair Group With Arithmetic Means) das populações estudadas.

Quadro 2 - Nome, número de Comissão de Enzima (nº. E.C.) e estrutura quaternária (E.Q.) das enzimas analisadas em gel de amido

Enzima (Abreviação)	nº. E. C.	E.Q.
Glicose 6 - fosfato isomerase (Gpi)	5.3.1.9	Dimérica
Isocitrato desidrogenase (ldh)	1.1.1.14	Dimérica
Fosfatase ácida (Acp)	3.1.3.2	Monomérica
Malato desidrogenase (Mdh)	1.1.1.37	Dimérica
Fosfoglucomutase (Pgm)	5.4.2.2	Monomérica

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão enzimática dos alelos detectados neste estudo está ilustrada nos zimogramas representados pela Figura 3. Observa-se que o alelo *a* para os *loci* *Mdh-1*, *Mdh-2* e *Gpi* e o alelo *b* para os *loci* *Gpi* e *Idh* foram os únicos que estiveram presentes em todas as populações. Ainda nesta, figura é possível observar que apenas o sistema isoenzimático MDH foi o que revelou todos os alelos para todas as populações. Visualiza-se também que a enzima GPI foi a que apresentou um maior número de alelos por *locus* (três alelos), enquanto a enzima MDH foi a que apresentou um menor número de alelos por *locus* (1 alelo para cada *locus*).

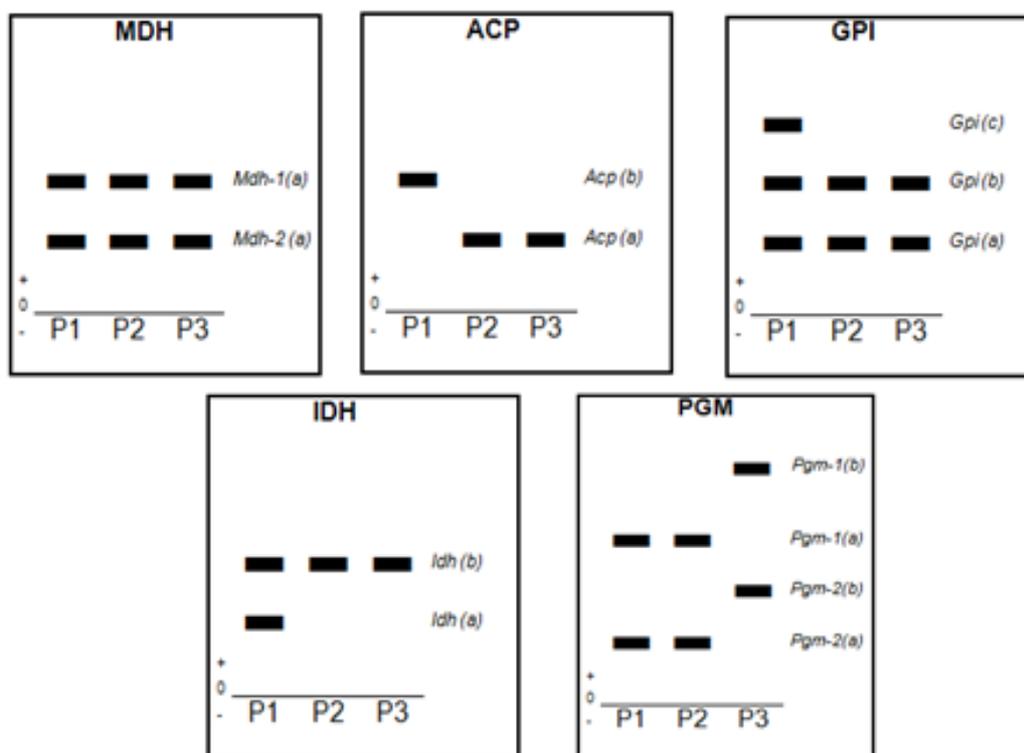


Figura 3 – Zimograma dos cinco sistemas enzimáticos analisados em gel de amido, com seus respectivos alelos, presentes nas populações (P1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; P2: *C. chinense*; P3: *C. baccatum* var. *pendulum*).

Das análises eletroforéticas obtidas, foi possível identificar sete *loci* e 13 alelos, dentre os cinco sistemas isoenzimáticos estudados nas três populações de *Capsicum* (Quadro 2). Destes 13 alelos detectados, observou-se que a espécie *C. annuum* var. *glabriusculum* (Pop-1), comparada às demais populações, foi a única que apresentou o alelo *Gpi(c)*, o alelo *Idh(a)* e o alelo *Acp(b)*. O alelo *Pgm-1(b)* e

Pgm-2(b) só foi detectado na espécie *C. baccatum* var. *pendulum* (Pop-3) em relação às demais populações analisadas (Quadro 3). Este é um aspecto interessante para o material biológico depositado no banco de germoplasma, pois os alelos exclusivos podem ser utilizados como marcadores dos acessos dentro do banco. A diversidade genética alta é um aspecto importante para a conservação de bancos de germoplasma, mas encontrar alelos exclusivos também tem importância prática na identificação do genótipo, para monitorar a estabilidade fenotípica por ocasião do uso destas amostras para o cultivo e produção de mudas e também para o melhoramento da espécie.

Apenas dois *loci* para a enzima MDH é incomum, pois pelo menos três *loci* podem ser descritos em diversas espécies de plantas: um *locus* para MDH mitocondrial, um para MDH citosólica e um para MDH perixissomal (Taiz e Zeiger, 2004). Detectar menos *loci* que três deve estar relacionado com a menor eficiência da extração das enzimas do material biológico. Logo, o tampão utilizado para homogeneizar e extrair as proteínas é um fator crítico para proteger as enzimas e permitir a sua identificação no gel.

Objetivando a padronização das condições eletroforéticas das isoenzimas Malato Desidrogenase (MDH) e Fosfatase Ácida (ACP) em *Conyza canadensis* L. e *Conyza bonariensis* L., Bassi et al. (2010) testaram quatro soluções de extração para solubilizar as folhas de *Conyza* sp., sendo uma delas a mesma solução utilizada neste trabalho (0,05g PVP-40, 10 μ l EDTA 1mM, 5 μ l β -mercaptoetanol e 1mL Tampão Fosfato 1M, pH 7,0) e duas soluções tampão, uma contendo Tampão Tris (0,0103M) e Ácido Cítrico (0,0028M) pH7,0 e a outra Tampão Tris 0,1M pH8,8. Revelou-se que as diferentes soluções de extração não apresentaram diferenças significativas no processo de extração das isoenzimas MDH e ACP, pois a resolução e a intensidade das bandas mantiveram-se uniformes para todas as soluções testadas. Já para a isoenzima MDH extraída de tecidos de *Cereus peruvianos* (Cactaceae) nas análises de Machado et al. (1993) o que demonstrou mais eficácia foi o preparado com Tris (0,0103M) e Ácido Cítrico (0,0028M) pH7,0. Sendo assim, as variações das condições eletroforéticas de isoenzimas geralmente ocorrem devido à especificidade e a particularidades de cada material biológico analisado. Mangolin e Machado (1997), também trabalhando com isoenzimas de tecidos de *Cereus peruvianus*, com o objetivo de testar sete tipos de soluções de extração para as enzimas ADH, MDH, IDH, SDH, ACP, EST e PER, concluíram que as devidas

soluções resultaram na mesma intensidade e coloração de bandas nos géis. Porém, algumas pequenas diferenças puderam ser observadas, como é o caso da isoenzima MDH, a qual apresentou um *locus* a mais em uma devida solução testada. Logo, prova-se que a escolha e a padronização de uma solução de extração é um fator crítico e limitante nos trabalhos que envolvam a utilização de isoenzimas.

O Quadro 3 mostra as freqüências alélicas de cada *locus* em cada população. Os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. De acordo com a observação das freqüências alélicas, foi possível ainda identificar cinco alelos exclusivos. Três destes alelos foram encontrados na Pop-1 (*C. annuum* var. *glabriusculum*) *Gpi*-(c), *Idh*-(a) e *Acp*-(b) com freqüências de 0,0213, 0,9512 e 1,0000, respectivamente, enquanto a Pop-3 (*C. baccatum* var. *pendulum*) apresentou o alelo *Pgm*-1-(b) e *Pgm*-2-(b), com freqüências de 100% em ambos.

Quadro 3 – Estimativas de freqüências alélicas das populações de *Capsicum*. (Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*). N^o: número de indivíduos analisados

<i>Locus</i>	alelo	Pop-1	Pop-2	Pop-3
<i>Gpi</i>	a	0,9574	0,9787	0,9000
	b	0,0213	0,0213	0,1000
	c	0,0213	-	-
<i>Idh</i>	a	0,9512	-	-
	b	0,0488	1,0000	1,0000
<i>Acp</i>	a	-	1,0000	1,0000
	b	1,0000	-	-
<i>Mdh-1</i>	a	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Mdh-2</i>	a	1,0000	1,0000	1,0000
<i>Pgm-1</i>	a	1,0000	1,0000	-
	b	-	-	1,0000
<i>Pgm-2</i>	a	1,0000	1,0000	-
	b	-	-	1,0000
N ^o		48	48	20

Os trabalhos de Hernández-Verdugo et al. (2001) em *C. annuum*, ao proporem padrões para nove enzimas (GOT, APX, ME, PGI, IDH, MDH, 6-PGD, ACPH, MNR), revelaram doze *loci* polimórficos e um total de 35 alelos. O *locus Idh-2* apresentou cinco alelos, as freqüência alélicas variaram de acordo com cada alelo

(alelo 1 (0-0,500), alelo 2 (0-0,846), alelo 3 (0-0,526), alelo 4 (0-0,844) e o alelo 5 (0-0,855)), o *locus Mdh-2* apresentou três alelos, com as respectivas freqüências (alelo 1 (0,058-0,194), alelo 2 (0,523-0,808) e o alelo 3 (0,135-0,392)) e o *locus Mdh-4* apresentou também três alelos com as seguintes freqüências (alelo 1 (0-0,436), alelo 2 (0,462-0,917) e o alelo 3 (0-0,250)).

De acordo com o Quadro 3, o qual mostra as estimativas das freqüências alélicas, as mesmas foram utilizadas em um teste de qui quadrado de homogeneidade para demonstrar a diferenciação entre as populações. Neste estudo, dos sete *loci* analisados, quatro (*Idh*, *Acp*, *Pgm-1* e *Pgm-2*) apresentaram freqüências alélicas diferentes ($p < 0,05$) e apenas três (*Gpi*, *Mdh-1* e *Mdh-2*) apresentaram freqüências alélicas semelhantes ($p > 0,05$). Sendo assim, segundo Frankel et al. (1995), a maior proporção de *loci* com freqüências alélicas diferentes ($p < 0,05$) podem indicar que a diversidade genética deve ser maior entre as populações do que dentro das mesmas.

Vidigal et al. (2009), trabalhando com *C. annuum* L., objetivando acompanhar o desenvolvimento fisiológico durante a maturação de sementes, por meio de análises enzimáticas, obtiveram apenas um *locus* para as enzimas Malato Desidrogenase (MDH), Álcool Desidrogenase (ADH) e Peroxidase (PO) e dois *loci* para Superóxido Dismutase (SOD). A MDH desempenha papel significativo no ciclo de Krebs, uma vez que catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, produzindo NADH, que é um produto fundamental na produção de ATP e de compostos intermediários essenciais ao funcionamento das células (Taiz e Zeiger, 2004).

Loaiza-Figueroa et al. (1989), observaram em *C. annuum* um *locus* com seis alelos, representando 66,77% da variação nos acessos pesquisados para a enzima IDH, quatro *loci* para MDH (*Mdh-1* com três alelos, *Mdh-2* com dois alelos, *Mdh-3* com quatro alelos e *Mdh-4* com três alelos revelados). Para PGM, três *loci* foram observados (*Pgm-1* com quatro alelos, *Pgm-2* com seis alelos e *Pgm-3* com cinco alelos).

No que se diz respeito à proporção de *loci* polimórficos, observou-se no presente estudo que as três populações analisadas demonstraram possuírem *loci* polimórficos, destacando-se a Pop-1 (*C. annuum* var. *glabriusculum*) com 28,57%, sendo esta a maior percentagem (Quadro 4).

Quanto ao número médio de alelos por *locus* verificou-se uma variação de 1,4286 a 1,0, sendo o maior número de alelos encontrados na Pop-1 (*C. annuum* var. *glabriusculum*).

Os dados sobre heterozigosidade esperada e observada estão dispostos no Quadro 4. Sob uma visão geral, é possível concluir que a heterozigosidade observada (H_o) foi 0 (zero) para todas as populações devido a todos os indivíduos da amostra serem homozigotos. O predomínio de fenótipos homozigotos observado nas amostras de pimentas analisadas é esperado em razão da autocompatibilidade descrita para estas espécies (Casali e Couto, 1984). A autofecundação tem sido descrita como regra no gênero *Capsicum* (Onus e Pickersgill, 2004). A heterozigosidade esperada (H_e) também foi baixa quando comparada a outras espécies de plantas.

Quadro 4 – Heterozigosidade esperada e observada (H_e e H_o); percentagem de *loci* polimórficos (P) e número de alelos por *locus* (K). Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*). Entre parênteses está o desvio padrão de H_e e K

Populações	H_e	H_o	P%	K
Pop-1	0,0253 (0,4333)	0	28,57%	1,4286 (0,7868)
Pop-2	0,0060 (0,0159)	0	14,29%	1,1429 (0,3780)
Pop-3	0,0264 (0,0698)	0	14,29%	1,1429 (0,3780)

Os dados de parâmetros populacionais F_{IS} e F_{IT} (estatística de Wright) apresentados no Quadro 5 mostram que há um excesso muito grande de homozigotos em todas as populações analisadas neste estudo, enquanto os valores de F_{ST} mostram que as três populações são bem diferentes geneticamente.

Quadro 5 - Estatísticas F de Sewall Wright para cada *locus* das três populações de *Capsicum* analisadas

<i>Locus</i>	N	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Gpi</i>	114	1,0000	1,0000	0,0249
<i>Idh</i>	103	1,0000	1,0000	0,9286
<i>Acp</i>	111	****	1,0000	1,0000
<i>Mdh-1</i>	109	****	****	0,0000
<i>Mdh-2</i>	110	****	****	0,0000
<i>Pgm-1</i>	114	****	1,0000	1,0000
<i>Pgm-2</i>	114	****	1,0000	1,0000
Mean	110,5	1,0000	1,0000	0,9284

A polinização cruzada tem sido sugerida em função da heterogeneidade alta observada em plantas de *C. annuum* e *C. chinense* na análise de *loci* para isoenzimas alfa e beta esterases (resultados ainda não publicados). As isoenzimas esterases também têm sido descritas como o sistema enzimático mais polimórfico em espécies de *Capsicum* (Barrera et al., 2005). Mas, considerando os sistemas enzimáticos investigados neste estudo (ACP, GPI, IDH, MDH e PGM), o padrão homozigoto é prodominante.

A identidade genética (I) indica a proporção dos produtos dos genes, que não são diferenciados por procedimentos eletroforéticos (Dobzhansky et al., 1977) e seu valor varia de 0 a 1. Thorpe e Solé-Cava (1994) concluíram que 85% dos valores da identidade genética entre espécies do mesmo gênero excedem 0,35 e 97% dos valores estão abaixo de 0,85. Entre espécies de gêneros diferentes, este valor, em 77% dos casos, é menor que 0,35, enquanto para populações da mesma espécie 98% excede 0,85. Os valores de identidade genética e distância genética colhidos neste experimento estão descritos no Quadro 6.

Quadro 6 – Valores de identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1972), entre as três populações de *Capsicum*. Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*

Pop.	Pop-1	Pop-2	Pop-3
Pop-1	*****	0,7236	0,4269
Pop-2	0,3236	*****	0,7088
Pop-3	0,8512	0,3441	*****

O dendrograma ilustrado na Figura 4 aponta a formação de dois grupos: Pop-1+Pop-2 (*C. annuum* var. *glabriusculum*+*C. chinense*) e Pop-3 (*C. baccatum* var. *pendulum*), o que comprova o proposto por Pickersgill (1991) ao afirmar que o gênero *Capsicum* pode ser dividido em três grandes Complexos, de acordo com um possível cruzamento entre as espécies: Complexo *annuum*, Complexo *baccatum* e Complexo *pubescens*. O Complexo *annuum* é representado pelas espécies: *C. annuum* (variedades *annuum* e *glabriusculum*), *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapagoensei* e *C. chinense*. As espécies *C. baccatum* (variedades *baccatum*,

pendulum e *pratermissum*) e *C. tovari* representam o Complexo *baccatum*. O Complexo *pubescens* compreende as espécies: *C. cardenassi*, *C. eximium* e *C. pubescens*.

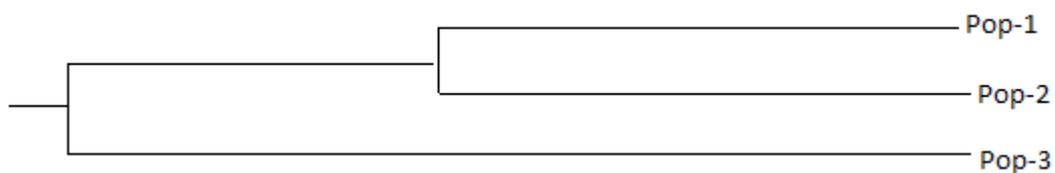


Figura 4 – Dendrograma de UPGMA calculado a partir da distância genética de Nei (1978) entre as três populações de *Capsicum*. Pop-1: *C. annuum* var. *glabriusculum*; Pop-2: *C. chinense*; Pop-3: *C. baccatum* var. *pendulum*.

5. CONCLUSÕES

A partir das análises bioquímicas das três populações de *Capsicum* envolvidas neste trabalho, foram destacadas as seguintes conclusões:

a) As três espécies analisadas possuem uma baixa diversidade genética comprovada pelos baixos valores de H_e .

b) As população de *C. annuum* var. *glabriusculum* e *C. chinense* mantiveram-se unidas no dendrograma, comprovando assim o Complexo *annuum*. Já a população *C. baccatum* var. *pendulum* manteve-se isolada afirmando assim não pertencer ao Complexo *annuum* e sim ao Complexo *baccatum*.

c) Encontrar de alelos exclusivos é de total importância para a marcação do acesso nas populações analisadas.

d) As populações mantiveram-se em homogeneidade, fator esse atribuído às altas taxas de cruzamentos entre as plantas.

e) Estudos adicionais com demais marcadores podem evidenciar uma maior diversidade genética nas populações analisadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins-fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 2006. 627p.
- ALMEIDA, C.M.V.; DIAS, L.A.S.; OKABE, E.T.; MEDEIROS, J.R.P. Variability in genetic resources of cacao in Rondônia, Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:318-324, 2005.
- BARBOSA, R.I.; LUIZ, F.J.F.; NASCIMENTO FILHO, H.R.; MADURO, C.B. Pimentas do gênero *Capsicum* cultivadas em Roraima, Amazônia brasileira: Espécies domesticadas. **Acta Amazônica**, 32:177-192, 2002.
- BARRERA, L.Q.; GARCIA, M.C.; GIRALDO, M.C.; MELGAREJO, L.M. Caracterización por isoenzimas de accesiones de *Capsicum* pertenientes a La colección Amazonica Colombiana. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 2:59-65, 2005.
- BARROSO, G.M. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV, 1991. 326p.
- BASSI, D.; MANGOLIN, C.A.; OLIVEIRA JR., R.S.; MACHADO, M.F.P.S.; FREGONEZI, A.M.D.T.; OLIVEIRA-COLLET, S.A. Padronização das condições eletroforéticas das isoenzimas Malato Desidrogenase e Fosfatase Ácida de *Conyza canadensis* (L.) e *Conyza bonariensis* (L.). In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS. Ribeirão Preto, 2010. **Resumos Expandidos...** Ribeirão Preto, 2010. p. 436-440.
- BENTO, C.S.; SUDRE, C.P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; PEREIRA, M.G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, 8:149-156, 2007.
- BIANCHETTI, L.B.; CARVALHO, S.I.C. Subsídios à coleta de germoplasma de espécies de pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* (Solanáceas). In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B. (eds.). **Fundamentos para a coleta de germoplasma**

vegetal: teoria e prática. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 355-385.

BIANCHETTI, L.B. **Aspectos morfológicos, ecológicos e biogeográficos de dez táxons de *Capsicum* (Solanaceae) ocorrentes no Brasil.** Brasília: Universidade de Brasília, 1996. 174p. Dissertação (Mestrado em Botânica).

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares.** Viçosa: UFV, 2009. 374p.

BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E.J. **Peppers: vegetable and capsicums.** Las Cruces: CABI Publish, 2000. 86p.

BROWN, A.D.H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, 52:145-147, 1978.

CARVALHO, S.I.C.; BIANCHETTI, L.B.; BUSTAMANTE, P.G.; SILVA, D.B. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.) da Embrapa Hortaliças.** Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 49p.

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

CINTRA, M.M.D.F.; PINHEIRO, J.B.; SIBOV, S.T. Genetic divergence among *Curcuma longa* L. acessions. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5:410-417, 2005.

CONKLE, M.T.; HODGSKISS, P.D.; NUNNALLY, L.B.; HUNTER, S.C. **Start gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual.** Berkeley: CA USDA, 1982, 18p.

CRUZ, C.D. **Programa Genes** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001, 648p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa: UFV, 2003. 585p.

DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L.; VALENTINE, J.W. **Evolution.** San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1977. 572p.

EMBRAPA. **Potato and pepper research group.** Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br>. Acesso em: 20, julho, 2011.

ESHBAUGH, W.H. **History and exploitation of a serendipitous new crop discovery.** In: JANICK, J.; SIMON, J.E. (eds.). New York: New crops, 1993. p. 132-139.

FARIAS FILHO, L.P. **Calogênese em anteras e diversidade genética de acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima com base em marcador RAPD.** Boa Vista: Universidade Federal de Roraima, 2006. 54p. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais).

FAZOLO, T. **Qualidade de processamento e marcadores isoenzimáticos em genótipos diplóides e tetraplóides de batata (*Solanum tuberosum* L.).** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. 57p. Dissertação (Mestrado em Agronomia).

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

GALETA, L.F.; LABUSCHAGNE, M.T.; VILJOEN, C. Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. **Biodiversity and Conservation**, 14:2361-2375, 2005.

GOTTLIEB, L.D. Electrophoretic evidence and plant populations. **Progr Phytochem**, 7:1-46, 1981.

GUERRA, N.A. Estudios cromossômicos de cuatro selecciones de *Capsicum chinense* Jacq. **Revista UDO Agrícola**, 1:34-41, 2001.

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

HERNÁNDEZ-VERDUGO, S.; LUNA-REYES, R.; OYAMA, K. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. **Plant System Evolution**, 226:129-142, 2001.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C. **Molecular systematic.** Sinauer: Sunderland, 1990. 234p.

HUNTER, R.L.; MARKERT, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, 125:1294-1295, 1957.

INOUE, A.K.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. Caracterização da coleção de germoplasma de *Capsicum* do CNPH. **Horticultura Brasileira**, 7:10-18, 1989.

INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **Genetic resources of *Capsicum*, a global plan and action**. IBPGR: Roma, 1983. 43p.

JOLY, A.B. **Botânica – Introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1987. 778p.

KIMBER, G.; RILEY, R. Haploid angiosperms. **The Botanical Review**, 29:480-531, 1963.

LANNES, S.D.; FINGER, F.L.; SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, 112:266-270, 2007.

LEFREBVRE, V.; GOFFINET, B.; CHAUVET, J.C.; CAROMEL, B.; SIGNORET, P.; BRAND, R.; PALLOIX, A. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:741-750, 2001.

LEWONTIN, R.C. Twenty-five years ago in Genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or Millstone? **Genetics**, 128:657-662, 1991.

LINS, T.C.L.; LOURENÇO, R.T.; TAVARES, H.M.F.; REIFSCHNEIDER, F.B.; FERREIRA, M.; BUSO, G.S.C. Caracterização molecular e análise da diversidade genética de acessos de *Capsicum* utilizando marcadores moleculares. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Goiânia, 2001. **Resumos...** Goiânia: SBMP, 2001, p.1-3.

LOAIZA-FIGUEROA, F.; RITLAND, K.; CANCINO, J.A.L.; TANKSLEY, S.D. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico. **Plant Systematics and Evolution**, 165:159-188, 1989.

LOPES, C.A. **Uso da diversidade genética de pimentas e pimentão para o desenvolvimento de genótipos de interesse do agronegócio brasileiro.** Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/projetos/capsicum/Indexf-3sub1.htm>. Acesso em 20, julho, 2011.

LUZ, F.J.F. **Caracterizações morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.).** São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2007. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia).

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

MACHADO, M.F.P.S.; PRIOLI, A.J.; MANGOLIN, C.A. Malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical Genetics**, 31:569-575, 1993.

MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme extraction from shoot tissue of *Cereus peruvianus* (Cacataceae) for electrophoretic analysis. **Biochemical Genetics**, 35:205-210, 1997.

MARKERT, C.L. Biology of isozymes. In: MARKERT, C.L. **Isozymes molecular structure.** New York: Academic Press, 1975. p. 1-9.

MARQUES, A.S.A.; GUIMARÃES, P.M.; SANTOS, J.P.; VIEIRA, T.M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, 30:527-531, 2005.

MATOS, I.W.F. **Parâmetros genéticos e caracterização de frutos de pimenteiras (*Capsicum*).** Boa Vista: Universidade Federal de Roraima, 2004. 35p. Monografia (Especialização em Recursos Naturais).

MATOS, I.W.F.; RÊGO, E.R.; PORTELA, A.L.; RÊGO, M.M.; SOUZA F.A.; POSSAMAI, E.V. Diversidade genética e importância de caracteres de pimenta (*Capsicum* spp.) In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Porto Seguro, 2003. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003.

- MOREIRA, G.R.; CALIMAN, F.R.B.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO, C.S.C. Espécies e variedades de pimenta. **Informe Agropecuário**, 27:16-29, 2006.
- MURPHY, R.W.; SITES JR., J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLE, C.H. Proteins: isozyme electrophoresis. In: HILLS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (eds.). **Molecular systematic**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 51-120.
- NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183p.
- NEI, M. Estimation of average of heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, 106:238-292, 1972.
- ODEGAH, P.G.C.; OBOH, B.; AGHALOKOPE, I.O. The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. **Genetics Resources and Crop Evolution**, 46:127-131, 1999.
- OLIVEIRA-COLLET, S.A.; MACHADO, M.F.P.S. COLLET, M.A. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, 33:691-703, 2005.
- OLORODE, O. Conservation of Plant Genetic Resources. **African Journal Traditional CAM**, 1:4-14, 2004.
- ONUS, A.N.; PICKERSGILL, B. A study of selected isozymes in *Capsicum baccatum*, *Capsicum eximium*, *Capsicum cardenasii* and two interespecific F₁ hybrids in *Capsicum* species. **Turkey Journal of Botany**, 24:311-318, 2000.
- ONUS, A.N.; PICKERSGILL, B. Unilateral incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae) occurrence and taxonomic distribution. **Annual Botany**, 94:289-295, 2004.
- ORASMO, G.R. **Caracterização genética e bioquímica de esterases em cultivares de videira (Vitaceae)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006. 65p. Tese (Doutorado em Agronomia).

ORASMO, G.R.; MACHADO, M.F.P.S. Isozyme diversity in RB (Republic of Brazil) surgarcane (*Sccharum* spp.) varieties. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. 25:213-219, 2003.

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

PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F.; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Ellis Horwood, Chichester, 1988. 132p.

PICKERSGILL, B. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. In: TSUCHIA, T.; GUPTA, P.K. (eds.). **Chromosome engineering plants: genetics, breeding evolution**. Amsterdam, 1991. p. 139-160.

PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, 96:129-133, 1997.

PIERCE, L.C.; BREWBAKER, J.L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Horticultural Science**, 8:17-22, 1973.

PORTELA, A.; RÊGO, E.R.; MATOS, I.W.F.; POSSAMAI, E.V.; SOUZA, F.A. Parâmetros genéticos em pimenteiras (*Capsicum* spp.). In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Porto Seguro, 2003. **Trabalhos técnicos...** Porto Seguro: SBMP, 2003.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**. Lavras: UFLA, 2004. 472p.

RAMOS, S.R.R.; RODRIGUES, R.; PEREIRA, T.N.S. Divergência genética em acessos de pimentas coletadas no Rio de Janeiro. **Horticultura Brasileira**, 18:673-674, 2000.

RÊGO, E.R. **Diversidade, herança e capacidade de análise combinatória em pimenta (*Capsicum baccatum*)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 118p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

RÊGO, E.R.; RÊGO, M.M.; CRUZ, C.D. Herança de caracteres quantitativos em pimenta (*Capsicum baccatum*). In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE

MELHORAMENTO DE PLANTAS. Porto Seguro, 2003. **Trabalhos Técnicos**. Porto Seguro: SBMP, 2003.

RÊGO, E.R.; RÊGO, M.M.; CRUZ, C.D.; FINGER, F.L. Correlações entre caracteres morfoagronômicos e produção de *Capsicum baccatum*. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Goiânia, 2001. **Resumos...** Goiânia: SBMP, 2001. Disponível em CD Room.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum: pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2000. 113p.

RIBEIRO, C.S.C.; SOUZA, O.B.; LOPES, D.; REIFSCHNEIDER, F.B. Programa de melhoramento genético de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças para processamento industrial. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. Porto Seguro, 2003. **Trabalhos Técnicos**. Porto Seguro: SBMP, 2003. Disponível em CD-ROM.

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

RUSCHEL, A.R.; PEDRO, J.; NODARI, R.O. Diversidade genética em populações antropizadas de fumo brabo (*Solanum mauritianum*) em Santa Catarina, Brasil. **Scientia Forestalis**, 36:63-72, 2008.

SARGENT, J.R.; GEORGE, S.G. **Methods in zone electrophoresis**. Poole: BDH Chemicals, 1975. 219p.

SCANDALIOS, J.G. Genes, isozymes and evolution. In: MARKERT, C. L. **Isozymes: genetics and evolution**. New York: Academic Press, 4:1-7, 1975.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plant: a review. **Biochemical Genetics**, 3:37-79, 1969.

SCHUELTER, A.R.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L. Inheritance of malate dehydrogenase in wild pepper. **Bragantia**, 58:1-6, 1999.

SHIELDS, C.R.; ORTON, T.J.; STUBER, C.W. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant

tissue. In: TANSKLEY, S.D.; ORTON, T.J. (eds.). **Isozymes in plant genetics and breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 443-468.

SMITH, I. Principles of Zone electrophoresis. In: SMITH, I. **Chromatographic and electrophoretic techniques**. Bath: William Heinemann Medical Books, 1976. p. 1-15.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (eds.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 172-192.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isozimas. In: MATIOLI, S.R. (eds.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 137-142.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. Dioscorides: Portland, 1989. 210p.

SOUZA, R.F.; CONTEL, E.P.B. Análise da variabilidade de isoenzimas em acessos e cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36:771-779, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Califórnia: Cummings, 2004, 719p.

TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Elsevier: Amsterdam, 1983. 94p.

TANKSLEY, S.D. Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. **Chromosoma**, 89:352-360, 1984a.

TANKSLEY, S.D. High rates of cross-pollination in Chile pepper. **HortScience**, 19:580-582, 1984b.

THORPE, J.O.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. **Zoologica Scripta**, 23:3-18, 1994.

TOFANELLI, M.B.D.; AMAYA-ROBLES, J.E.; RODRIGUES, J.D.; ONO, E.O. Ácido giberélico na produção de frutos partenocárpicos de pimenta. **Horticultura Brasileira**, 2:116-118, 2003.

TONG, N.; BOSLAND, P.W. *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. **Euphytica**, 109:71-77, 1999.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais. **Ciências Biológicas e Saúde**, 10:27-37, 2004.

VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L.; GÓES, M. (2001) Conservação ex situ de recursos vegetais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-IGLIS, M.C. (eds.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 123-149.

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa, 1996. 62p.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; PINHO, E.V.R.; DIAS, L.A.S. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, 31:129-136, 2009.

VOTAVA, E.J.; NABHAN, G.P.; BOSLAND, P.W. Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an *in situ* population and *ex situ* accessions of chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). **Conservation Genetics**, 3:123-129, 2002.

WARD, R.D.; SKIBINSKI, D.O.F.; WOODWARK, M. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, 26:73-159, 1992.

WITTERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/CBAB, 1999. p. 297-330.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. 465p.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**, 59:18-28, 2005.

YEH, F.C.; YANG, R-C, BOYLE, T.B.J.; YE, Z-H.; MAO, J.X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. [1997]. Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/faq.htm>. Acesso em: 20, julho, 2011.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; REIS, R.E.; MOURA, M.O.; MATEUS, R.P. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu Reservoir, upper Rio Paraná basin, Brazil. **Genetic**, 123:271-283, 2005.